

ISSN 0555-1099

Том 60, Номер 1

Январь - Февраль 2024



ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ и МИКРОБИОЛОГИЯ



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 60, номер 1, 2024

Антибиопленочное и пробиопленочное действие наноматериалов на микроорганизмы (обзор) Ю. Г. Максимова, А. С. Зорина	3
Применение технологии DETECTR для селективной детекции бактериального фитопатогена <i>Dickeya solani</i> с использованием рекомбинантной CRISPR-нуклеазы Cas12a, полученной одностадийной хроматографической очисткой Л. К. Курбатов, С. П. Радько, С. А. Хмелева, К. Г. Птицын, О. С. Тимошенко, А. В. Лисица	20
Сравнение эффективности различных промоторов для продукции секретируемой β -маннаназы <i>Bacillus subtilis</i> клетками метилотрофных дрожжей <i>Ogataea hagerorum</i> Д. А. Подплетнев, А. Р. Лаптева, С. П. Синеокий, М. Г. Тарутина	29
Окислительные повреждения и антиоксидантный ответ бактерий <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Pseudomonas putida</i> и <i>Rhodococcus erythropolis</i> при обработке антибиотиками И. С. Сазыкин, А. А. Плотников, О. Д. Лановая, К. А. Онасенко, А. Е. Полиниченко, А. С. Мезга, Т. Н. Ажогина, А. Р. Лицевич, М. А. Сазыкина	39
Метаболический потенциал конверсии хлорфеноксиуксусных кислот штамма <i>Serratia</i> sp. 22S Н. В. Жарикова, Е. Ю. Журенко, В. В. Коробов, Л. Г. Анисимова, Г. Э. Актуганов	48
Дозозависимые эффекты лектина азоспирилл на рост проростков пшеницы в условиях солевого стресса С. А. Аленькина, М. А. Купряшина	59
Свойства внеклеточной протеазы — регулятора гемостаза, образуемой микромицетом <i>Aspergillus tabacinus</i> В. Н. Лавренова, В. Г. Крейер, Ж. Савкович, А. А. Осмоловский	66
Исследование влияния протеаз различных классов на функционально-технологические свойства изолятов белка гороха И. В. Кравченко, В. А. Фуралев, Е. В. Костылева, А. С. Середа, Е. И. Курбатова, Н. В. Цурикова, Е. С. Пшенникова, Т. В. Бояринцева, В. О. Попов, А. Н. Федоров	72
Оценка содержания стероидных фитогормонов в гуминовых препаратах Р. П. Литвиновская, А. Л. Савчук, Д. В. Денисюк, Д. Г. Переход, Г. В. Переход, В. А. Хрипач	84
Оценка нутриентного и метаболического профиля кеты тихоокеанской (<i>Oncorhynchus keta</i>) Л. С. Абрамова, А. В. Козин	90
Пищевая и потенциальная лечебно-профилактическая ценность овариальной жидкости сибирского осетра (<i>Acipenser baerii</i>) и стерляди (<i>Acipenser ruthenus</i>) М. В. Михайлова, К. В. Золотарёв, А. Н. Михайлов, В. И. Наход, В. Г. Згода, Е. Н. Харенко	101
Зависимость групповой специфичности иммуноферментного определения пенициллинов в молоке от температуры и продолжительности перекрестных реакций антибиотиков с поликлональными антителами О. С. Куприенко, И. И. Вашкевич, А. И. Зильберман, О. В. Свиридов	110

CONTENTS

Vol. 60, No. 1, 2024

Antibiofilm and Probiofilm Effects of Nanomaterials on Microorganisms <i>Yu. G. Maksimova, A. S. Zorina</i>	3
Application of Detectr for Selective Detection of Bacterial Phytopathogen <i>Dickeya Solani</i> Using Recombinant CRISPR-Nuclease Cas12a Obtained by Single-Stage Chromatographic Purification <i>L. K. Kurbatov, S. P. Radko, S. A. Khmeleva, K. G. Ptitsyn, O. S. Timoshenko, A. V. Lisitsa</i>	20
Comparison of the Efficiency of Various Promoters for the Production of Secreted β -Mannanase by <i>Bacillus subtilis</i> by Cells of the Methylophilic Yeast <i>Ogataea haglerorum</i> <i>D. A. Podpletnev, A. R. Lapteva, S. P. Sineoky, M. G. Tarutina</i>	29
Oxidative Damage and Antioxidant Response of <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Pseudomonas putida</i> and <i>Rhodococcus erythropolis</i> Bacteria during Antibiotic Treatment <i>I. S. Sazykin, A. A. Plotnikov, O. D. Lanovaya, K. A. Onasenkov, A. E. Polinichenko, A. S. Mezga, T. N. Azhogina, A. R. Litsevich, M. A. Sazykina</i>	39
Metabolic Potential of <i>Serratia</i> sp. 22S for Chlorophenoxyacetic Acids Conversion <i>N. V. Zharikova, E. I. Zhurenko, V. V. Korobov, L. G. Anisimova, G. E. Aktuganov</i>	48
Dose-dependent Effects of Azospirilla Lectin on the Growth of wheat Seedlings under Salt Stress <i>S. A. Alen'kina, M. A. Kupryashina</i>	59
Properties of Extracellular Protease — Regulator of Hemostasis Produced by Micromycete <i>Aspergillus tabacinus</i> <i>V. N. Lavrenova, V. G. Kreyer, Z. Savkovic, A. A. Osmolovskiy</i>	66
Effect of Different Classes of Proteases on Techno-functional Properties of Pea Protein Isolates <i>I. V. Kravchenko, V. A. Furulyov, E. V. Kostyleva, A. S. Sereda, E. I. Kurbatova, N. V. Tsurikova, E. S. Pshennikova, T. V. Boyarintseva, V. O. Popov, A. N. Fedorov</i>	72
Evaluation of the Content of Steroid Phytohormones in Humic Preparations <i>R. P. Litvinovskaya, A. L. Sauchuk, D. V. Denisiuk, D. G. Perakhod, R. V. Perakhod, V. A. Khripach</i>	84
Assessment of the Nutrient and Metabolic Profile of the Chum Salmon (<i>Oncorhynchus keta</i>) <i>L. S. Abramova, A. V. Kozin</i>	90
Nutritional and Possible Medicinal Value of Siberian Sturgeon (<i>Acipenser baerii</i>) and Sterlet (<i>Acipenser ruthenus</i>) Ovarian Fluid <i>M. V. Mikhailova, K. V. Zolotarev, A. N. Mikhailova, V. I. Nakhoda, V. G. Zgoda, E. N. Kharenko</i>	101
Dependence of the Group Specificity of Immunoenzyme Determination of Penicillins in Milk on the Temperature and Duration of Antibiotic Cross Reactions with Polyclonal Antibodies <i>O. S. Kuprienko, I. I. Vashkevich, A. I. Zilberman, O. V. Sviridov</i>	110

УДК 579.22+579.26+579.66+661.666

АНТИБИОПЛЕНОЧНОЕ И ПРОБИОПЛЕНОЧНОЕ ДЕЙСТВИЕ НАНОМАТЕРИАЛОВ НА МИКРООРГАНИЗМЫ

© 2024 г. Ю. Г. Максимова^{1, 2, *}, А. С. Зорина¹

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН —

филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь, 614081 Россия

²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, 614990 Россия

*e-mail: yul_max@mail.ru

Поступила в редакцию 10.04.2023 г.

После доработки 12.07.2023 г.

Принята к публикации 03.09.2023 г.

В обзоре обобщена и проанализирована информация, касающаяся влияния наночастиц (НЧ) металлов, оксидов металлов и углерода на биопленкообразующую способность и зрелые биопленки микроорганизмов. В качестве механизмов действия НЧ на биопленки рассматривается воздействие на жизнеспособность единичных микробных клеток, включающее прямое нарушение поверхностных структур клетки и окислительный стресс, связанный с образованием активных форм кислорода (АФК), а также влияние на продукцию экзополимерного матрикса и на систему кворум-сенсинга. Более подробно описано воздействие НЧ серебра, золота, некоторых оксидов металлов и углеродных наноматериалов на микробные биопленки. Сравнивается действие металлических и углеродных НЧ на микробные биопленки. Отмечается как антибиопленочное, так и пробиопленочное действие НЧ в зависимости от их природы, рассматривается перспектива их применения как антимикробных агентов и носителей для получения микробных биопленок биотехнологического значения.

Ключевые слова: наноматериалы, наночастицы, микробные биопленки, экзополисахаридный матрикс, кворум-сенсинг, углеродные нанотрубки, окислительный стресс, биокатализатор, микробные топливные элементы

DOI: 10.31857/S0555109924010015, **EDN:** HDFNBN

В последние десятилетия активно развивается синтез и использование наночастиц (НЧ) в различных отраслях науки, промышленности и народного хозяйства. К наноматериалам относятся металлические и углеродные наночастицы размером менее 100 нм: металлы и их оксиды, углеродные нанотрубки (УНТ), квантовые точки, графен [1, 2].

За счет своих уникальных свойств НЧ нашли широкое применение во многих отраслях промышленности, в том числе в электронике, оптике, робототехнике, химии, медицине и биологии. Малые размеры НЧ, близкие к биомакромолекулам, обеспечивают быструю диффузию, высокую удельную поверхность, реакционную способность в жидкой или газовой фазе. В свою очередь эти качества могут привести к неконтролируемому воздействию на окружающую среду и живые организмы [3, 4]. Соответственно, широкое применение НЧ поднимает вопрос об их влиянии на окружающую среду и биосферу, в том числе на микроорганизмы.

Влияние НЧ на микроорганизмы изучается давно. Основной упор в исследованиях был сделан на использование НЧ в качестве противомикробных агентов, поскольку инфекционные заболевания

и резистентность микроорганизмов к антибиотикам остаются одной из самых серьезных проблем здравоохранения во всем мире. Перспективным направлением исследований является разработка альтернативных стратегий лечения бактериальных заболеваний, среди которых большое внимание уделяется наноразмерным материалам. Такие материалы могут не только сами бороться с бактериями, но и выступать в качестве носителей антибиотиков и природных противомикробных соединений [5–18].

В соответствии с современными представлениями, сложившимися в микробиологии, основной формой существования микроорганизмов являются полимикробные агрегаты, такие как пленки, маты и флоксы. Биопленка — прикрепленное к поверхности мультивидовое сообщество, погруженное в вырабатываемый им полимерный матрикс. Внеклеточный экзополисахаридный матрикс иммобилизует клетки биопленки, удерживая их в непосредственной близости друг к другу, что обеспечивает межклеточные взаимодействия и формирование синергических связей в микроконсорциуме. Влияние различных веществ, в том

числе биоцидов, антибиотиков и антисептиков на клетки микроорганизмов в составе биопленки, существенно отличается от их воздействия на одиночные неадгезированные клетки. Внеклеточное полимерное вещество защищает биопленки от высыхания, окислителей, заряженных биоцидов, некоторых антибиотиков и катионов металлов, ультрафиолетового излучения, многих простейших хищников и иммунной защиты макроорганизма [19]. Следовательно, воздействие наноматериалов на отдельные (планктонные) и находящиеся в составе биопленок клетки будет отличаться.

Биопленки микроорганизмов являются серьезной проблемой в медицине и различных отраслях хозяйственной деятельности человека, так как вызывают персистирующие инфекции, биокоррозию, колонизацию технологического и медицинского оборудования, сокращают сроки хранения пищевых продуктов [20, 21]. НЧ рассматривают как новое средство борьбы с биопленками болезнетворных микроорганизмов [22, 23]. Борьба с микробными обрастаниями заключается в модификации поверхности, например, путем включения НЧ в состав композитных материалов [24]. Однако потенциал использования НЧ в биотехнологии

гораздо шире. Так, НЧ могут служить носителями для иммобилизации биокатализаторов на основе ферментов, отдельных микробных клеток или их биопленок [25–27].

Целью обзора являлось обобщение и анализ научных результатов, касающихся взаимодействия микробных биопленок с металлическими и углеродными НЧ. Рассмотрены общие механизмы воздействия НЧ на микробные биопленки. Мишенью этого воздействия являются: 1) клетки в составе биопленок; 2) выработка полимерного матрикса; 3) система кворум-сенсинга. Рассмотрены примеры воздействия металлических и углеродных НЧ на биопленки микроорганизмов.

МЕХАНИЗМЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ НА БИОПЛЕНКИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Наряду с антибиотиками и биоцидами НЧ рассматриваются как антибиопленочные агенты. НЧ способны нарушать целостность биопленки, взаимодействуя непосредственно с микробными клетками, влияя на выработку экзополимеров и на бактериальную коммуникацию — чувство кворума.

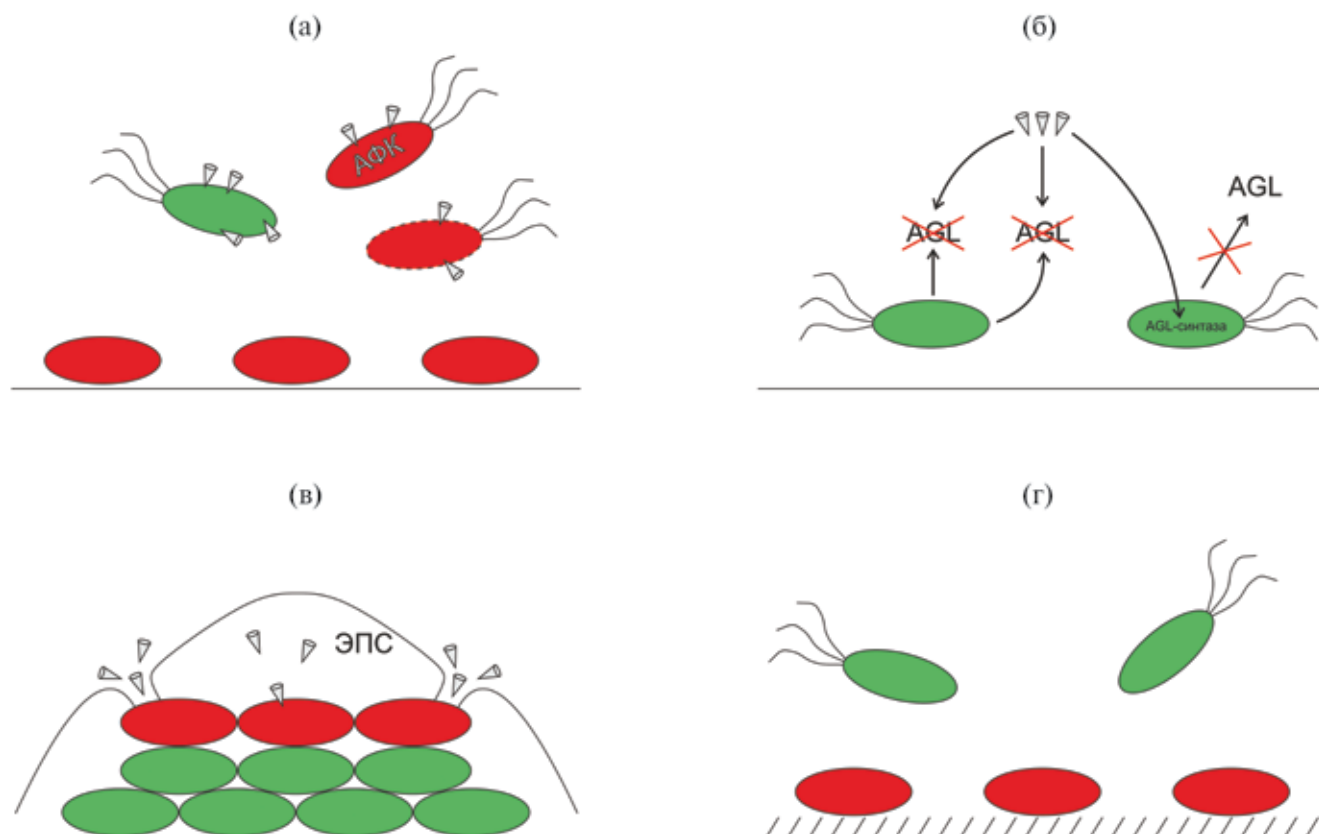


Рис. 1. Антибиопленочное действие НЧ: а — воздействие на индивидуальные клетки, нарушение клеточной мембраны и формирование АФК; б — воздействие на систему QS, сигнальные молекулы и их синтез; в — проникновение НЧ через матрикс биопленки и нарушение жизнеспособности клеток в сформированной биопленке; г — гибель адгезированных клеток на поверхности с НЧ.

Принцип воздействия НЧ на микробную клетку зависит от типа НЧ. Так, для металлических НЧ выделяют следующие механизмы, вызывающие гибель клеток: (1) связывание с бактериальной клеткой и повреждение клеточной мембраны, проницаемости и дыхательной цепи; (2) токсичность за счет высвобождения свободных ионов металлов с поверхности НЧ; (3) окислительный стресс за счет образования активных форм кислорода (АФК). При этом НЧ металлов влияют на синтез белка, ингибируют ферменты, нарушают работу АТФ-синтазы, ингибируют синтез клеточной стенки, разрушают ДНК и клеточную мембрану [23]. Цитотоксичность связана как с природой НЧ (токсичностью самих металлов и их ионов для клетки), так и с их наноразмерным состоянием. В этом случае возникает вопрос, будут ли эти механизмы распространяться на НЧ углерода.

Следует отметить, что НЧ проявляют антибиопленочную активность как в диспергированном состоянии, так и в составе композитных материалов (рис. 1). Антибиопленочная активность НЧ осуществляется посредством таких механизмов, как: (1) прямое взаимодействие с микробной клеткой, в том числе адсорбция на поверхности клетки, нарушение мембраны клетки, образование АФК, взаимодействие с ДНК и/или белками; (2) ингибирование образования биопленки (влияние на выработку внеклеточного матрикса, межклеточную коммуникацию); (3) запуск как врожденных, так и адаптивных иммунных ответов хозяина в случае, если речь идет о колонизации макроорганизма [28]. В то же время наноматериалы, особенно углеродные, могут способствовать образованию биопленок. Возможные механизмы пробиопленочного воздействия НЧ показаны на рис. 2.

Биопленкообразование зависит, прежде всего, от жизнеспособности отдельных клеток, адгезирующих на поверхности раздела фаз и образующих микроколонию, из которых в дальнейшем формируется биопленка. НЧ могут предотвратить колонизацию новых бактериальных клеток на уже существующей биопленке и замедлить развитие новой [29, 30]. Одной из возможных причин ингибирующего воздействия НЧ на образование биопленки может быть активное связывание НЧ с клетками бактерий [31]. Можно выделить три типа взаимодействий между НЧ и бактериями: 1) адсорбция НЧ на поверхности бактерий; 2) токсичность НЧ по отношению к клетке, имеющая неокислительную природу; 3) формирование окислительного стресса.

Воздействие НЧ на поверхностные структуры микробной клетки. Цитоплазматическая мембрана и клеточная стенка бактерий являются защитными барьерами при взаимодействии с окружающей средой, в том числе с такими объектами, как НЧ. Наружная мембрана клеточной стенки

грамотрицательных бактерий состоит из липопротеинов, фосфолипидов и липополисахаридов, которые образуют барьер, позволяющий проникнуть только определенным макромолекулам. Липополисахариды создают отрицательно заряженные области, электростатически притягивающие положительно заряженные НЧ. Адсорбируясь непосредственно на наружной клеточной мембране, НЧ изменяют ее вязкость и способность транспортировать вещества, влияют на ионные каналы [32]. В работе [30] выявлены различные механизмы ингибирования биопленок грамотрицательных и грамположительных бактерий на примере модельных бактерий *Enterobacter cloacae* и *Streptococcus mutans*. Из данных, полученных после анализа кривой роста и изображений со сканирующего электронного и конфокального лазерного сканирующего микроскопа, авторы сделали вывод, что уменьшение биомассы биопленки у *E. cloacae* связано с гибелью ее планктонных клеток вследствие разрушения мембран. Напротив, *S. mutans* обладает многослойным пептидогликаном, устойчивым к действию НЧ, и в этом случае ингибирование образования биопленки, по мнению авторов, обусловлено влиянием НЧ на уровне экспрессии генов.

Клеточная стенка большинства патогенных бактерий состоит из поверхностных белков, обеспечивающих адгезию и колонизацию, а также таких компонентов, как полисахариды и тейхоевая кислота, которые участвуют в защите от организма-хозяина. Эти компоненты представляют собой заряженные макромолекулы, основная функция и расположение которых могут быть нарушены при взаимодействии с группами на поверхности НЧ [33].

Углеродные и металлические НЧ могут оказывать прямое воздействие на жизнеспособность клеток, приводя к нарушению их мембраны и последующей гибели [34–36]. Значительное количество исследовательских работ посвящено воздействию на микроорганизмы НЧ совместно с другими внешними факторами. Так, отмечено снижение жизнеспособности клеток бактерий под воздействием металлических НЧ совместно с УФ-облучением [37–40], высокой температурой, повышенной аэрацией и низким уровнем pH [41]. Действие НЧ на микробные клетки усиливается адсорбированными на их поверхности антибиотиками [5–18, 42]; галогенами и оксидами азота [43, 44], пептидами, ферментами [45–50], фагами [51], эфирными маслами [52].

В ряде исследований взаимодействия НЧ металлов и углерода с микроорганизмами показана высокая антибактериальная активность этих наноматериалов [34, 35, 53–59]. Было обнаружено, что эти эффекты зависят от ряда факторов, которые условно подразделяются на “внутренние” и “внешние”. К “внутренним” факторам авторы относят концентрацию, размер, форму НЧ (например, у треугольной формы активность выше, чем у сферических

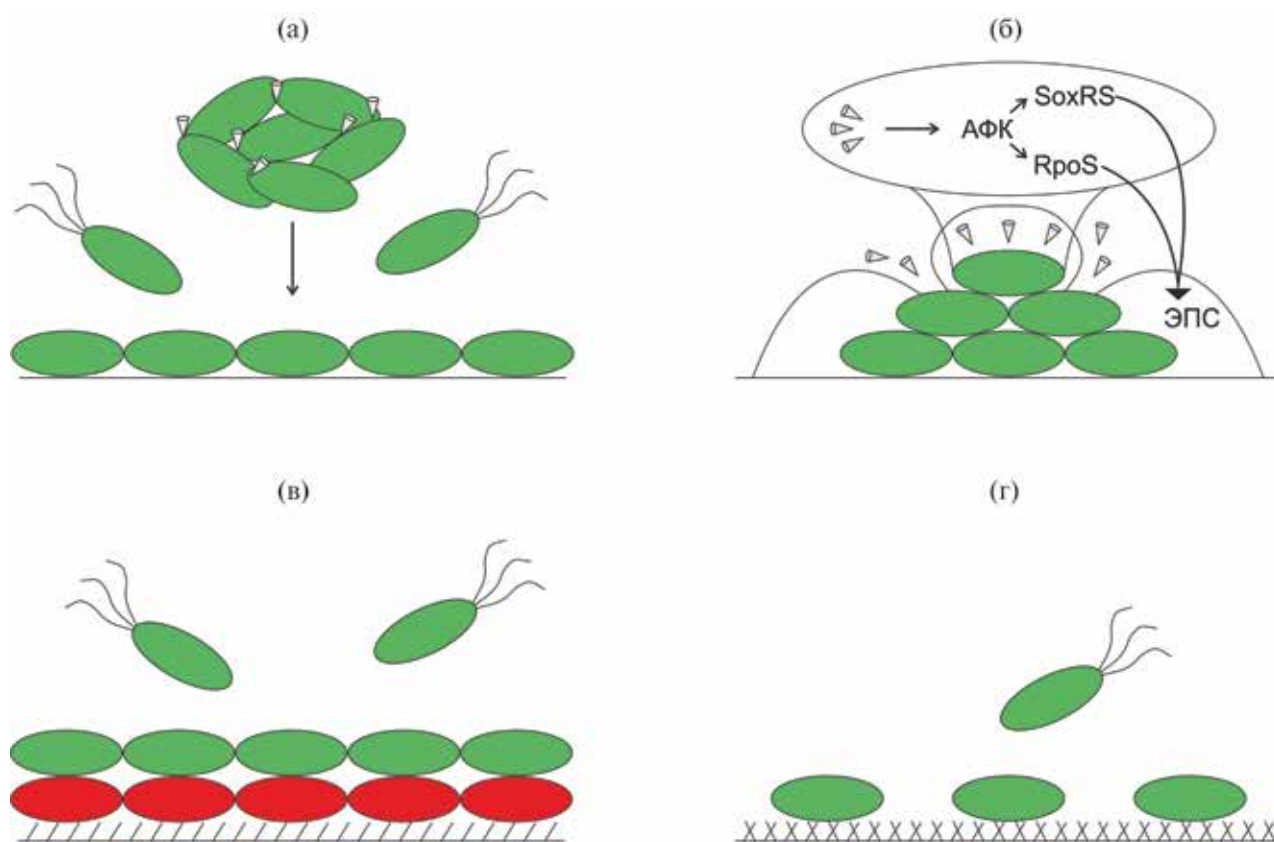


Рис. 2. Пробиопленочное действие НЧ на микроорганизмы: а — агрегация клеток с НЧ и усиление адгезии клеточных агрегатов под действием силы тяжести; б — активация генов RpoS и SoxRS регулона, приводящая к увеличению выработки ЭПС; в — формирование биопленки по принципу “живое на мертвом”; г — увеличение шероховатости, гидрофобности, пористости композитных материалов.

форм) и их химический состав. НЧ малого размера способны к транслокации через мембрану бактериальной клетки [60–62]. Более крупные НЧ (80–100 нм) не могут свободно перемещаться через мембрану, однако все же способны уничтожить бактерии [63–67]. В работе [68] показано, что адсорбция НЧ на поверхности клеток вызывает увеличение натяжения мембраны бактериальных клеток, что приводит к механической деформации мембраны и в конечном итоге к ее разрыву и гибели клеток. К “внешним” факторам авторы относят аэриобиоз или анаэриобиоз, pH, вид бактерий, от которого зависит структура клеточной стенки, скорость роста бактериальных клеток, фазу метаболизма и клеточного цикла [69]. Вопрос о разрушении мембраны углеродными НЧ остается спорным. Так, было показано, что повреждение поверхностных структур *E. coli* наблюдается только в присутствии содержащих металлические примеси углеродных наноматериалов низкой степени очистки [70]. Клетки *E. coli* не лизировались даже при обработке 200 мг/л карбоксилированных одностенных УНТ (ОУНТ) [71].

Формирование окислительного стресса под действием НЧ. Бактерицидное действие большинства НЧ связано с повреждением клеточной мембраны

и образованием АФК, индуцирующих окислительный стресс. АФК являются естественными побочными продуктами клеточного окислительного метаболизма и играют важную роль в модуляции выживания и гибели клеток, дифференцировке и клеточной сигнализации. У бактерий АФК образуются в результате аэробного дыхания, а их продукция уравнивается антиоксидантным механизмом защиты клетки, но при дополнительном повреждении избыточное образование АФК приводит к окислению биомолекул — липидных компонентов мембран, ДНК, белков, и, как следствие, к серьезному повреждению клеток [72].

Отмечается, что окислительный стресс — один из преобладающих механизмов воздействия НЧ на бактериальные клетки [73–76]. Известно, что основными регулонами окислительной защиты у *E. coli* являются регулон *oxyR* (ген *katG*), реагирующий на повышение внутриклеточной концентрации пероксида водорода, и регулон *soxRS* (ген *soxS*), экспрессия которого активируется супероксид-анионом. НЧ металлов являются общепризнанными окислителями, однако углеродные наночастицы также могут вызывать окислительный стресс. Первое упоминание об окислительном

стрессе как возможном механизме антибактериального действия УНТ встречается в работах С. Канг с соавт. [76]. Было обнаружено, что несколько генов, входящих в регулоны *soxRS* и *oxyR*, экспрессируются после воздействия на клетки ОУНТ и многостенных УНТ (МУНТ). С. М. Мартин с соавт. показали, что 24-часовое воздействие 100 мг/л ОУНТ и МУНТ приводило к образованию АФК и индуцировало окислительный стресс в клетках патогенных дрожжей *Candida albicans* и бактерий *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* [73]. В работе [77] показано, что функционализированные и немодифицированные УНТ могут проявлять фотореактивность, приводящую к образованию АФК. Карбоксилированные ОУНТ в присутствии кислорода на свету генерировали синглетный кислород, супероксидный анион и гидроксильные радикалы. При этом функционализированные нанотрубки могли выступать в роли доноров электронов или участвовать в переносе электронов от других доноров с помощью НАДН. Окислительный стресс может формироваться как за счет свойств самих углеродных НЧ, так и их способности стимулировать выработку АФК в клетках. В первом случае источниками окислительного стресса являются примеси переходных металлов, используемые в качестве катализаторов при производстве неметаллических НЧ, в том числе ОУНТ. Во втором случае это относительно стабильные свободнорадикальные интермедиаты, присутствующие на поверхности частиц, или окислительно-восстановительные группы, образующиеся в результате функционализации НЧ [4]. Увеличение доли ОУНТ, проявляющих свойство металлов, сопровождалось увеличением степени окисления глутатиона — медиатора окислительно-восстановительного состояния клетки [74]. В работе Максимовой с соавт. [71] были показаны достоверные различия в экспрессии гена *soxS* при воздействии УНТ и отсутствие таковых при экспрессии гена *oxyR*. Функционализированные ОУНТ приводили к продукции АФК в бактериальных клетках, а карбоксилированные и немодифицированные МУНТ снижали действие сильного окислителя параквата на клетки *E. coli*. Прооксидантный или антиоксидантный эффект зависел не столько от функциональной группы, сколько от диаметра УНТ. Известно, что ОУНТ сильнее повреждают бактериальные клетки, чем МУНТ. Было выдвинуто предположение, что окислительный стресс вызывается не самими УНТ, а является следствием повреждения мембран и разобщения дыхательной цепи, что приводит к избытку свободных радикалов в клетке. Таким образом, результаты проведенных исследований подтверждают, что окислительный стресс — один из основных механизмов воздействия НЧ на микробную клетку, и его формирование наблюдается под действием не только металлических, но и некоторых углеродных НЧ.

Следует отметить, что НЧ металлов также могут проявлять антиоксидантное действие. Мохамад с соавт. [78] установили, что НЧ оксида алюминия могут действовать как поглотители свободных радикалов и защищать клетки от окислительного стресса. Ряд исследований показал, что очищенные МУНТ не генерируют свободные радикалы, но являются эффективными поглотителями АФК. В работе [79] установлено, что МУНТ являются эффективными уловителями гидроксильных радикалов и супероксидных анионов, хотя точный молекулярный механизм этого явления неизвестен.

Взаимодействие НЧ и внеклеточного полимерного матрикса биопленок. Известно, что бактерии иммобилизуются в агрегаты, образуя биопленки посредством синтеза внеклеточного полимерного матрикса, который в большинстве случаев составляет 90% массы биопленки [19]. Внеклеточные полимерные вещества состоят из экзополисахаридов (ЭПС), внеклеточной ДНК и других макромолекулярных компонентов, таких как белки, липиды, биосурфактанты, жгутики и пили. Производство экзополимерного матрикса является одним из ключевых этапов в формировании биопленки. Матрикс не только составляет каркас для бактерий, агрегирующихся в биопленке, но и действует как барьер, защищая клетки от многих противомикробных препаратов [19, 80–82].

Известно, что именно экзополисахаридный матрикс защищает клетки биопленки от воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды. Взаимодействие УНТ с биопленкой начинается на уровне ЭПС, которые образуют высоковязкие водные растворы, мешающие транспорту наночастиц и прямому действию на клетки [83]. Для проникновения в матрицу биопленки важен размер НЧ, при этом химия их поверхности определяет взаимодействие с компонентами матрикса [84].

Известно, что доминирующим механизмом транспорта в биопленках и клеточных агрегатах является диффузия. Таким образом, подвижность и биодоступность НЧ в значительной степени будут зависеть от коэффициентов диффузии в матриксе. В ряде исследований показано, что НЧ способны диффундировать через биопленку, однако скорость диффузии напрямую связана с размером наночастицы [85–90]. Так, диффузия НЧ в биопленке тем выше, чем меньше размер НЧ и плотность биопленки: более крупные наночастицы медленнее диффундируют в биопленке, задерживаясь в порах матрикса и клеточных агрегатах [89]. Небольшие размеры НЧ позволяют им проникать в матрикс биопленки и контактировать с бактериальными клетками, ингибируя дальнейшее развитие биопленки [87, 88, 91].

Ключевым моментом в проникновении и перемещении НЧ внутри матрикса биопленок является наличие в нем каналов. Матрикс состоит

в основном из свободной воды, иммобилизованной в порах между каркасом полимерных молекул [92, 93]. Наночастицы перемещаются по водным каналам матрикса, которые предназначены для движения питательных веществ и продуктов жизнедеятельности клеток, и распространяются по слою ЭПС [94]. Учитывая, что небольшие молекулы и наночастицы часто свободно перемещаются в воде, лимитирующий фактор в их перемещении внутри матрикса напрямую связан со взаимодействием с полимерами.

Наиболее важными взаимодействиями являются электростатические, гидрофобные и стерические. Начальный этап проникновения в матрицу в основном определяется размером НЧ, тогда как взаимодействие с компонентами, входящими в состав матрицы, определяется поверхностными свойствами НЧ (заряд и функциональные группы). Влияние поверхностного заряда на проникновение в биопленку показывает, что положительно заряженные частицы хорошо проникают и взаимодействуют с веществами матрикса, имеющими отрицательный заряд [87]. Гидрофобные НЧ лучше проникают в биопленку, чем гидрофильные. Стерические препятствия со стороны матрицы биопленки не играют большой роли в диффузии НЧ и, следовательно, не влияют на скорость, с которой НЧ диффундируют через биопленку [88]. В то же время такие компоненты матрикса, как белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты, липиды и метаболиты, могут адсорбироваться на поверхности НЧ [95].

В целом, образование биопленки рассматривается как адаптивная ответная реакция микроорганизмов на стресс. На уровне экспрессии генов процесс образования биопленок достаточно сложен и зависит от многих факторов. Формирование бактериальной биопленки в основном зависит от двух ключевых регуляторных факторов, а именно от системы *Quorum sensing* (QS) и бис-(3'-5')-циклического димерного гуанозинмонофосфата (с-di-GMP), который является вторичным мессенджером и усиливает выработку внеклеточных полисахаридов [96, 97]. В результате голодания бактериальные клетки снижают количество с-di-GMP за счет активации фосфодиэстеразы, что способствует расселению клеток биопленки [98]. Также известно, что сигма-субъединица РНК-полимеразы RpoS играет большую роль в формировании биопленки. Во время формирования биопленок *E. coli* было показано, что активация гена *rpoS* способствует созреванию биопленки за счет возрастания уровня экспрессии генов, участвующих в адгезии и реакции на стресс, и подавления генов, участвующих в синтезе жгутиков и энергетическом метаболизме [99]. Показано, что в ответ на присутствие карбоксилированных УНТ в среде увеличивалась экспрессия *rpoS* в клетках *E. coli* [71]. При окислительном стрессе у бактерий увеличивалась экспрессия генов, связанных с секрецией

ЭПС, ростом биопленки и устойчивостью к антибиотикам [100].

Под воздействием НЧ может происходить разрушение или ингибирование синтеза матрикса биопленок. Так, Али с соавт. [101] показали, что под влиянием НЧ золота клетки *Pseudomonas aeruginosa* не могли колонизировать поверхности из-за их неспособности секретировать матрикс. Количество образующих биопленку клеток уменьшалось с увеличением концентрации НЧ. Авторы работ [102, 103] показали, что функционализация НЧ золота и диоксида кремния ферментом протеиназой К приводила к разрушению матрикса биопленок. Влияние функционализированных НЧ изучали на примере биопленки *P. fluorescens*. Было показано, что НЧ способны провоцировать значительные структурные изменения биопленок, такие как изменение толщины и шероховатости матрикса биопленки. Авторы работы [50] проанализировали влияние НЧ золота, функционализированных N-ацилированным гомосеринлактоном, на синтез ЭПС. Было обнаружено, что НЧ не только подавляют их синтез, что в свою очередь ингибирует образование биопленки, но и эффективно удаляют предварительно сформированные биопленки за счет разрушения уже сформированного матрикса.

Влияние НЧ на систему кворум-сенсинга. Бактерии регулируют проявление различных фенотипов, таких как образование биопленок, синтез токсинов, продукцию ЭПС и факторов вирулентности в зависимости от плотности популяции клеток. Это явление называется чувством кворума (*Quorum sensing*, QS), которое опосредуется химическими веществами — аутоиндукторами. Системы QS в бактериальных популяциях помогают бактериям «общаться» друг с другом посредством производства и обнаружения сигнальных молекул. С помощью молекул QS микроорганизмы в биопленках осуществляют межклеточную коммуникацию [104–106]. Используя межклеточную коммуникацию, бактерии могут определять плотность их локальной популяции и координировать экспрессию генов, реагируя на изменения в окружающей среде и приобретая тем самым конкурентное преимущество [104, 107, 108]. Функции, контролируемые QS, включают прикрепление к поверхности, производство матрикса, синтез биосурфактанта, спорообразование, биолюминесценцию, секрецию соединений, связывающих питательные вещества, секрецию антибиотиков и факторов вирулентности [109, 110].

В систему QS вовлечены различные классы аутоиндукторов, такие как олигопептиды, N-ацилгомосеринлактон (АГЛ) и семейство аутоиндукторов, называемых аутоиндуктором-2 [108, 109, 111]. Когда концентрация аутоиндукторов превышает определенный порог, клетки реагируют, модулируя свои функции. Система QS, по-видимому, участвует во всех фазах формирования биопленки,

регулируя плотность популяции и метаболическую активность в зрелой пленке [112].

АГЛ, синтезируемые грамотрицательными бактериями, могут ферментативно разлагаться ацилазой, лактоназой и оксидоредуктазой. Этот процесс ферментативного “тушения кворума” (*Quorum quenching*, QQ) интенсивно изучается для подавления биообрастания при мембранной фильтрации. Имобилизация кворум-тушащих ферментов на поверхности мембраны может быть прямым и эффективным средством против обрастания, для применения которого не требуется изменение конфигурации процесса и дополнительная обработка. Активность и стабильность ферментов QQ являются основными решающими факторами борьбы с биообрастанием. Однако коммерческие мембраны для обработки сточных вод, такие как поливинилиденфторид, полисульфон и полиэфирсульфон, не подходят в качестве носителя для имобилизации ферментов из-за отсутствия функциональных групп, таких как амино- и карбоксильные группы. В этом случае используют нанобиокаталитический подход, комбинируя ферменты и наноматериалы для их имобилизации. Ацилаза, один из ферментов QQ, была успешно имобилизована и стабилизирована на мезопористом кремнеземе и карбоксилированных полианилиновых нановолокнах, в результате чего эффективно предотвращалось образование биопленок на поверхности мембраны. Адсорбция фермента на УНТ, его осаждение и ковалентная сшивка глутаровым альдегидом позволили получить вододисперсный нанобиокатализатор на основе УНТ с повышенной нагрузкой фермента и стабильностью [113].

Следует отметить, что НЧ металлов и их оксидов могут влиять на QS, в результате чего подавляют образование биопленки и разрушают уже существующие биопленочные сообщества. Авторы работы [114] показали, что НЧ серебра успешно ингибируют регулируемые QS факторы вирулентности многих бактериальных патогенов. Авторы предполагают, что возможными механизмами воздействия НЧ серебра на систему QS могут быть ингибирование синтеза АГЛ, вмешательство в связывание АГЛ с рецепторными белками, а также антагонизм к регуляторным белкам и нарушение сборки ворсинок, что приводит к снижению биопленкообразования. Удаление аутоиндукторов из непосредственного бактериального окружения препятствует тому, чтобы молекула достигла своего родственного рецептора, тем самым ингибируя взаимодействие сигнал/рецептор и вмешиваясь в нижестоящую регуляцию. В другой работе [115] было показано, что НЧ серебра не только проникают внутрь клетки, нарушая ее физиологические функции, но и связываются с сигнальными молекулами QS, прерывая продукцию QS-опосредованных факторов вирулентности и оказывая

антибиопленочный эффект. Авторы предположили, что образование биопленки ингибируется за счет нейтрализации адгезивных веществ, необходимых для ее образования. Антибиопленочная активность НЧ серебра по отношению к *P. aeruginosa* была вызвана подавлением транскрипционной активности регулонов, кодирующих синтазы LasI и RhII, необходимые для продукции АГЛ, что нарушало образование и нормальное функционирование биопленки [116]. Еще одно исследование, описывающее ослабление АГЛ-опосредованного распознавания кворума под действием НЧ, представлено в работе [117]. Авторы показали нарушение образования биопленок *Listeria monocytogenes*, *P. aeruginosa* PAO1 и *E. coli* под влиянием НЧ цинка. Продукция ЭПС, способствующих первоначальному прикреплению и созреванию биопленки, была значительно снижена, что приводило к значительному снижению биомассы предварительно сформированных биопленок всех протестированных бактериальных патогенов при обработке субингибирующими концентрациями НЧ цинка.

Как показано в работе [118], НЧ оксида титана, функционализированные серебром, ингибировали систему QS, препятствуя проявлению активности АГЛ. Перспективной стратегией ингибирования биопленкообразования является использование НЧ, функционализированных β -циклодекстрином, который способен связывать АГЛ и подавлять бактериальные гены QS [119].

ПРИМЕРЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ И ИХ ОКСИДОВ НА БИОПЛЕНКИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Ингибирующее воздействие ионов металлов на микробные клетки и выработанные ими механизмы защиты достаточно глубоко изучены [120]. Известно, что повреждающее действие ионов металлов на клетку более выражено, чем их нулевалентной формы. Однако НЧ металлов обладают особыми свойствами, большей проникающей и повреждающей способностью по отношению к клеткам. Антимикробные свойства наиболее выражены у НЧ благородных металлов. НЧ оксидов металлов располагаются в следующем порядке убывания антибактериальных и антибиопленочных свойств: CuO–ZnO–MgO–TiO₂–Fe₃O₄–Al₂O₃ [121]. Примеры влияния НЧ различной природы на биопленки микроорганизмов обобщены в табл. 1.

НЧ серебра. Больше всего работ, изучающих влияние НЧ на жизнеспособность клеток бактерий, посвящено НЧ серебра. Серебро все чаще используется в качестве эффективного антибактериального и противогрибкового средства в медицинских устройствах, например катетерах [122–125], а также в фильтрующих материалах для обеззараживания воды [126]. Механизмы воздействия НЧ

Таблица 1. Влияние наноматериалов на биопленки микроорганизмов

НЧ	Микроорганизмы	Эффект	Ссылка
НЧ металлов и их оксидов			
Ag	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> O157: H7, <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. pyogenes</i> и <i>Streptococcus</i> sp.	Бактерицидное действие	[122]
	<i>E. coli</i>	Повреждение структуры мембраны, подавление активности мембранных ферментов	[140]
	<i>Enterococcus faecalis</i>	Нарушение структуры и целостности биопленки	[141]
	<i>Aquabacterium citratiphilum</i>	Снижение механической стабильности биопленок	[144]
	<i>P. aeruginosa</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Chromobacterium violaceum</i>	Воздействие на систему QS	[114]
	<i>P. aeruginosa</i>	Связывание с сигнальными молекулами QS	[115]
	<i>P. aeruginosa</i>	Ингибирование образования биопленки, продукции факторов вирулентности (протеазы LasA, эластазы LasB, пиоцианина, пиовердина, пиохелина, рамнолипида, альгината), снижение продукции АГЛ	[116]
	<i>Candida albicans</i> , <i>C. glabrata</i>	Уменьшение количества КОЕ, общей биомассы биопленки, влияние на состав матрикса	[135]
Au	<i>P. aeruginosa</i>	Ингибирование секреции матрикса	[101]
	<i>C. albicans</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , уропатогенные изоляты <i>E. coli</i>	Ингибирование образования биопленки, бактерицидная активность	[147]
	<i>C. albicans</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Ингибирование образования биопленки за счет связывания с клетками бактерий	[31]
ZnO	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>P. aeruginosa</i> PAO1, <i>E. coli</i>	Ингибирование QS, снижение продукции ЭПС	[117]
	<i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>S. aureus</i>	Повреждение мембран, бактерицидная активность	[148]
	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	Ингибирование формирования биопленки вследствие образования АФК	[72]
	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. faecalis</i>	Бактериостатический эффект	[33]
Cu	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Shigella flexneri</i>	Генерация АФК, окислительный стресс	[150]
Ag-Cu	Патогенные бактерии, вызывающие маститы коров (<i>S. agalactiae</i> , <i>S. dysgalactiae</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>C. albicans</i>)	Разрушение биопленки при концентрации 50 ppm	[169]
Bi	<i>Streptococcus mutans</i>	Подавление биопленкообразования	[152]
TiO ₂	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i>	Ингибирование синтеза экзополисахаридов, разрушение зрелых биопленок	[170]
NiO	<i>P. aeruginosa</i>	Ингибирование QS	[155]
Углеродные НЧ			
Восстановленный оксид графена	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	Формирование окислительного стресса	[160]
МУНТ	<i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. epidermidis</i>	Антиадгезионный эффект за счет нарушения контакта клеток с поверхностью, покрытой вертикально ориентированными МУНТ	[161]
МУНТ	<i>Alcaligenes faecalis</i> 2, <i>Acinetobacter guillouiae</i> 11h, <i>Achromobacter pulmonis</i> ПНОС, <i>Burkholderia dolosa</i>	Пробиопленочный эффект, отсутствие цитотоксического действия	[163]
МУНТ-СООН, МУНТ-ОН	БОС, <i>R. erythropolis</i> ИЛ БИО, <i>R. erythropolis</i> 11–2, <i>R. ruber</i> gt1	Снижение уровня метаболизма клеток в биопленке	[164]
ОУНТ		Отсутствие антибиопленочного и антибактериального действия	[166]
ОУНТ	<i>E. coli</i> K12	Воздействие на биопленки на ранней стадии развития	[83]

серебра в сравнении с ионами этого металла подробно освещены в обзоре [127]. Основным фактором бактерицидности НЧ серебра является увеличение внутриклеточной концентрации ионов этого металла и влияние их на процесс трансляции и синтез макромолекул [127, 128].

Показано также, что и сами НЧ серебра могут влиять на жизнеспособность бактерий. Лара с соавт. [122] установили, что минимальные ингибирующие концентрации и минимальные бактерицидные концентрации НЧ серебра для шести бактериальных штаммов (*Staphylococcus aureus*, *E. coli* O157: H7, *P. aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes* и *Streptococcus* sp.) находились в диапазоне от 30 до 100 мМ соответственно, причем НЧ серебра одинаково влияют на жизнеспособность как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий [122, 129, 130].

Было предложено несколько механизмов для объяснения ингибирующего действия НЧ серебра на бактерии. Предполагается, что высокое сродство серебра к сере и фосфору является ключевым элементом антимикробного действия. НЧ серебра могут реагировать с серосодержащими аминокислотами внутри или снаружи клеточной мембраны, а также взаимодействовать с фосфатными группами в ДНК, подавляя репликацию ДНК, или реагировать с серосодержащими белками, приводя к ингибированию функций ферментов [122, 131–135]. Такие взаимодействия НЧ с мембраной, ДНК и белками, в свою очередь влияют на жизнеспособность бактериальной клетки. Прикрепление НЧ серебра к серосодержащим белкам клеточных мембран приводит к увеличению проницаемости мембраны, что вызывает гибель бактерий [53, 136–138]. Взаимодействие НЧ серебра с нуклеиновыми кислотами также приводит к нарушению репликации ДНК и в конечном итоге к потере жизнеспособности клеток [139]. Ли с соавт. [140] на примере *E. coli* показали, что НЧ серебра могут не только повреждать структуру бактериальной клеточной мембраны, но также способны подавлять активность некоторых мембранных ферментов, что в конечном итоге приводит к гибели бактерий.

Антибиопленочная эффективность НЧ серебра зависит от способа применения этих наноматериалов. Ву с соавт. [141] продемонстрировали способность геля НЧ серебра устранять остаточные бактериальные биопленки. Авторы показали, что шприцевое орошение биопленок *Enterococcus faecalis* 0.1%-ным раствором НЧ серебра не влияло на разрушение биопленок и жизнеспособность клеток в них. Однако обработка 0.02%-ным гелем НЧ серебра существенно нарушала структуру и целостность биопленки, при этом количество жизнеспособных клеток было минимальным. Сухина с соавт. [142] исследовали влияние препарата НЧ серебра на биопленки 17 клинически значимых штаммов

бактерий и установили, что формирование и рост биопленок зависит от концентрации введенных в раствор НЧ. В присутствии НЧ серебра процесс формирования и роста биопленок значительно снижался, и при добавлении 150 мкг/мл НЧ происходило полное подавление роста бактериальных пленок, а также полное разрушение матрикса уже сформированных биопленок. Шмидт с соавт. [143] показали, что при воздействии НЧ серебра общее содержание белков и углеводов матрикса, а также биомасса биопленок на поверхности значительно снижались. Однако другой коллектив авторов получил противоположные данные. Так, в работе [144] описано, что воздействие НЧ серебра на биопленки *Aquabacterium citratiphilum* не приводило к снижению жизнеспособности клеток и биомассы биопленки, а также не влияло на содержание белков и ЭПС в матриксе биопленок. Авторы показали, что снижение механической стойкости биопленок связано с аккумуляцией НЧ размером 30 нм. Различия в действии НЧ серебра на биопленки связаны с неодинаковой восприимчивостью микроорганизмов [145].

НЧ золота. Большое внимание уделяется в настоящее время наночастицам золота, поскольку они являются нетоксичными, универсальными и при этом широко используются в химии, биологии, технике и медицине. В научной литературе описано два механизма антибактериального действия НЧ золота: первый заключается в изменении мембранного потенциала и ингибировании активности АТФ-синтазы, что приводит к снижению содержания АТФ в клетке и вызывает подавление метаболизма; второй — в ингибировании субъединицы рибосомы для связывания тРНК, что влияет на процесс трансляции белка [146]. Пиктел с соавт. [147] синтезировали НЧ золота различной формы: стержни, звезды, арахисоподобные и сферические пористые частицы, которые обладали мощной антибактериальной активностью против широкого спектра клинических штаммов *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* и уропатогенных изолятов *E. coli*. Авторы подчеркивают, что синтезированные ими НЧ золота обладали замечательной бактерицидной эффективностью при дозах в нанограммах. Кроме того, НЧ золота в форме стержней и арахиса проявляли также антибиопленочные свойства, ингибируя образование биопленки и убивая бактерии в уже сформировавшейся пленке. Интересно, что другой коллектив авторов также синтезировал НЧ золота, которые не обладали значительной токсичностью по отношению к тестируемым патогенам, таким как *C. albicans* и *P. aeruginosa* [30]. Однако при этом синтезированные НЧ значительно ингибировали образование биопленки за счет связывания с клетками бактерий.

НЧ окисляющихся металлов. Металлы, не относящиеся к благородным, окисляются кислородом

воздуха, поэтому на микроорганизмы будут действовать НЧ их оксидов. Ряд исследований посвящен изучению влияния НЧ цинка на клетки бактерий [33, 72, 148, 149]. Хуанг с соавт. [148] сообщили о биоцидном действии НЧ цинка на *Streptococcus agalactiae* и *Staphylococcus aureus*. После контакта с НЧ ZnO клетки бактерий были повреждены, что свидетельствовало о дезорганизации мембран как граммотрицательных, так и грамположительных бактерий. В работе [72] была исследована возможность использования НЧ ZnO в качестве антибиопленочного покрытия. Для этого авторы помещали предметные стекла с нанесенными на поверхность наночастицами цинка в проточную камеру с бактериальными культурами *E. coli* и *S. aureus*. Биопленкообразование при этом было ингибировано в результате образования АФК. Кроме того, авторы показали, что даже непродолжительный контакт клеток с покрытием повышал восприимчивость бактерий к последующей обработке антибиотиками. В работе [33] показано, что наночастицы ZnO обладают широким спектром антибактериального действия на *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *B. subtilis*, *E. faecalis*. Отмечается, что даже 5 мМ (0.004%) коллоидная суспензия наночастиц ZnO может более чем на 95% подавлять рост большинства грамположительных микроорганизмов, протестированных в этом исследовании [33]. Однако результаты другого исследования показали, что НЧ цинка в концентрации 50 мг/л подавляли микробную активность только во внешнем слое (~200 мкм) биопленок, а бактерии, присутствующие в более глубоких слоях, становились еще более физиологически активными [149]. Анализ с помощью сканирующей электронной микроскопии показал, что НЧ цинка адсорбировались на биопленке, но не оказывали неблагоприятного воздействия на целостность зрелой биопленки.

НЧ меди продемонстрировали значительную антибиопленочную активность в отношении зрелых биопленок *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhi* и *Shigella flexneri*. Было обнаружено, что антибактериальная активность НЧ меди, прикрепленных к бактериальным клеткам, обусловлена генерацией АФК, что, в свою очередь провоцирует усиление внутриклеточного окислительного стресса [150]. Антибиопленочная активность НЧ меди отмечена также в работе [151].

Кабрал-Ромеро с соавт. выявили антимикробное действие НЧ висмута, минимальная ингибирующая концентрация которых составила 0.5 мМ [152]. Было показано, что НЧ висмута полностью подавляли биопленкообразование *Streptococcus mutans*. Авторы предположили, что поскольку 69% клеток были инактивированы НЧ висмута, оставшихся живых клеток было недостаточно для образования биопленки. Ким с соавт. сообщили

о бактерицидной активности НЧ на основе железа, которая была связана с образованием внутриклеточных оксидантов, образующихся в результате реакции с пероксидом водорода или другими соединениями [153]. При этом авторы наблюдали серьезное нарушение целостности клеточных мембран и дыхательной активности клеток *E. coli*. Изучено влияние НЧ оксида магния на жизнеспособность *B. subtilis* var. *niger* и *S. aureus* и показано, что бактерицидное действие НЧ увеличивается с уменьшением их размера [154]. Изучено влияние НЧ церия на *E. coli* [32]. НЧ церия при нейтральном pH заряжены положительно и за счет электростатического притяжения взаимодействуют с наружными мембранами бактерий. Авторы установили, что НЧ CeO_2 могут проявлять цитотоксичность по отношению к *E. coli*, однако при этом необходим прямой пространственный контакт между частицами и клетками. НЧ NiO действовали как антибиопленочный агент против *P. aeruginosa*, ингибируя систему QS [155].

Применение металлических НЧ в биотехнологиях. Полученные многочисленными исследовательскими группами результаты свидетельствуют о том, что нанометаллы, особенно НЧ благородных металлов, обладают, главным образом, антимикробными и антибиопленочными свойствами. НЧ, проявляющие пробиопленочные свойства или интенсифицирующие ферментативные процессы в клетке, могут быть использованы для биотехнологий. Множество различных НЧ, таких как золото, серебро, палладий, никель и оксид никеля, оксид титана, функционализированные НЧ магнетита с альгинатом и хитозаном, оксиды железа были использованы для повышения активности водород-продуцирующих микроорганизмов, что позволило интенсифицировать производство водорода [156]. Показана возможность использования НЧ золота в качестве носителя для иммобилизации бактерий *E. coli* B40 для их последующего применения в качестве возможных рецепторов биосенсора и обнаружения ионов тяжелых металлов [157]. Также Куюкина с соавт. [158] предположили, что функционализация клеточной поверхности родококков с помощью НЧ никеля в сублетальных концентрациях может усилить адгезивные и каталитические свойства бактериальных клеток, однако внесение НЧ металлов с целью повышения биodeградации углеводородов вряд ли можно считать целесообразным и безопасным для окружающей среды.

ВОЗДЕЙСТВИЕ УГЛЕРОДНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ НА БИОПЛЕНКИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Воздействие углеродных НЧ на микробные биопленки не так очевидно, как металлических. Неоднозначное влияние УНТ на бактериальные клетки отражено в обзоре [159], в котором приводятся

примеры антимикробного действия и, наоборот, использования наноматериалов в качестве носителей биотехнологически значимых организмов. В данном обзоре рассмотрены примеры как антибиопленочного, так и пробиопленочного действия углеродных НЧ.

Оксид графена. Оксид графена и восстановленный оксид графена различно воздействовали на образование биопленок *E. coli* и *S. aureus*. Оксид графена значительно усиливал рост клеток, образование и развитие биопленок даже при концентрации в среде, достигающей 500 мг/л, тогда как восстановленный оксид графена в концентрации 50 мг/л ингибировал рост клеток и образование биопленок. Это отрицательное влияние восстановленного оксида графена ослаблялось в зрелой фазе развития биопленки (24 ч) и исчезало через 48 ч. Авторы предположили, что токсичность восстановленного оксида графена связана с окислительным стрессом, тогда как оксид графена, в свою очередь, снижал уровни АФК в зрелой биопленке. При этом устранению токсичности восстановленного оксида графена в зрелой биопленке способствовали ЭПС [160].

МУНТ. Биопленкообразование *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* на поверхности с вертикально выровненными МУНТ разной длины изучали в камере с непрерывным потоком жидкости. Было показано, что чем длиннее МУНТ, тем они более гибкие, и их колебания предотвращают бактериальную адгезию. Авторы предположили, что антиадгезионный эффект основан на подвижности МУНТ, исключающей их контакт с бактериальными клетками. Ингибирующее действие на образование биопленки резко возрастало с увеличением длины вертикально расположенных МУНТ [161].

Нанотрубки, меченные антителами, в сочетании с инфракрасным светом усиливали уничтожение как планктонных клеток, так и биопленок стрептококков группы А, при этом жизнеспособность клеток не снижалась при воздействии только УНТ или одного инфракрасного света. Этот факт может определить перспективу использования УНТ в лечении бактериальных инфекций мягких тканей [162].

Было изучено воздействие немодифицированных и функционализированных МУНТ на биопленкообразование бактерий разных систематических групп — актинобактерий рода *Rhodococcus* и грамотрицательных бактерий активного ила. Показано, что немодифицированные МУНТ не ингибируют биопленкообразование бактерий и даже оказывают на них пробиопленочное действие [163]. Функционализация МУНТ обуславливала их про- или антибиопленочное действие, причем гидрофильные и модифицированные группами СООН нанотрубки в большей степени подавляли метаболизм клеток. При этом биопленки грамотрицательных бактерий более подвержены разрушению в присутствии

функционализированных МУНТ, а антибиопленочные и пробиопленочные эффекты МУНТ были штаммоспецифичными [164].

ОУНТ. ОУНТ с внешним диаметром 1–2 нм, покрывающие поверхность стеклянных шариков, не препятствовали образованию биопленки *S. mutans* и *P. aeruginosa* [165]. Родригес и Элимелех показали, что ОУНТ на начальной стадии образования биопленки *E. coli* K12 вступали в контакт с бактериальными клетками и подавляли их рост. Бактерии в зрелых биопленках были менее чувствительны к присутствию ОУНТ, так как внеклеточные полимерные вещества, выделяемые биопленкой, смягчают токсические эффекты этих углеродных НЧ. Наконец, ОУНТ, нанесенные на поверхности, значительно подавляли колонизацию и последующее развитие биопленки. Увеличение концентрации ОУНТ приводило к большему ингибированию роста и биопленкообразованию бактерий, тогда как при низких и средних концентрациях мертвые клетки агрегировали с нанотрубками и экранировали их токсический эффект [83]. Показано отсутствие антибактериального и антибиопленочного действия ОУНТ на *Alcaligenes faecalis* 2, *Acinetobacter guillouiae* 11h, *Achromobacter pulmonis* ПНОС, *Burkholderia dolosa* БОС, *Rhodococcus erythropolis* ИЛБИО, *R. erythropolis* 11–2, *R. ruber* gt 1 [166].

Применение углеродных НЧ в биотехнологиях. Для получения массивных биопленок биотехнологически значимых микроорганизмов с целью получения энергии в микробных топливных элементах, получения водорода, в биосенсорах, для биоремедиации важны первые этапы образования биопленок, к которым относится необратимая адгезия. Эффективность адгезии зависит от площади доступной поверхности, объема макропор, в которые могут проникать микробные клетки, и шероховатости поверхности. Чем больше площадь доступной для адгезии клеток поверхности, тем больше клеток может адгезироваться на единицу объема материала; чем больше шероховатость, тем прочнее формируемые связи между клеткой и поверхностью. Удельная площадь и объем пор поверхности, покрытой УНТ, могут быть дополнительно увеличены за счет обработки УНТ химическими или термическими методами. Присутствие УНТ в составе композиционных материалов может улучшить их поверхностные свойства, обеспечивающие адгезию микробных клеток [167].

Наноструктурированные материалы обладают уникальными физическими и химическими качествами, маленьким размером и большой удельной площадью поверхности, в связи с чем они полезны как носители для иммобилизации клеток. Свойства НЧ могут быть улучшены путем их функционализации. Для применения в качестве носителя для иммобилизации биокатализаторов подходят различные типы НЧ, такие как ОУНТ

и МУНТ, магнитные НЧ, нановолокна и другие модификации.

Подложки для микробных биопленок широко используются в биореакторах для очистки сточных вод, метаногенеза, производства пива и т.д. Носители для биопленок могут предотвращать потерю клеток микроорганизмов и защищать клетки от повреждений, вызванных неблагоприятными изменениями в окружающей среде. Такой вспомогательный материал с превосходной биосовместимостью может повысить эффективность биореакторов [168].

Материалы, которые способствуют более высокой степени бактериальной колонизации, могут быть использованы в процессах биоремедиации. При этом они должны обладать следующими качествами: 1) иметь высокопористую структуру, которую легко могут колонизировать микроорганизмы; 2) адсорбировать высокие концентрации токсиканта, не снижая доступность поверхности для микроорганизмов; 3) поддерживать буферную способность биопленки. УНТ являются превосходным адсорбентом и способствуют лучшей колонизации микроорганизмов, быстрее и эффективнее адсорбируют токсичные вещества, чем активные угли [156].

Использование УНТ в составе электродов микробных топливных элементов для получения биопленок электрогенных микроорганизмов подробно описано в обзоре [159].

Большой объем данных, касающийся взаимодействий микроорганизмов с наноматериалами, тем не менее не позволяет на данном этапе сделать однозначных выводов о положительном или отрицательном влиянии НЧ на микробные биопленки. Множество противоречащих друг другу сообщений об антибактериальном действии НЧ указывают на то, что механизмы токсичности НЧ очень сложны и зависят от множества факторов. Среди этих факторов — размер, форма, функционализация, дисперсность, концентрация и многие другие, от чего зависит проявление их свойств и активности. НЧ металлов и углерода значительно различаются по своему действию на микробные клетки и биопленки. Не следует считать одинаковыми механизмы воздействия металлических и углеродных НЧ, однако можно найти и общие черты в их действии, связанные с нанометровым размером. Так, окислительный стресс в клетке генерируется как металлическими, так и некоторыми углеродными НЧ. С другой стороны, нарушение поверхности микробной клетки углеродными НЧ, даже имеющими очень малый диаметр и функционализированными, незначительно. При сравнении НЧ металлов и углерода можно сделать вывод, что если НЧ металлов в большинстве случаев оказывают

антимикробное и антибиопленочное действие, то углеродные наноматериалы, несмотря на значительное количество сообщений о проявлении ими антибактериальных свойств, оказывают скорее пробиопленочный эффект, связанный, в том числе, и с адаптивным ответом микроорганизма на стресс. В связи с этим невозможно однозначно классифицировать НЧ как полезные или вредные для бактерий. Две взаимоисключающие задачи требуют различных решений: 1) борьба с биопленками болезнетворных и вызывающих коррозию и обрастания технологического оборудования микроорганизмов; 2) формирование и поддержание биотехнологически значимых биопленок. Исходя из поставленных задач возможен подбор и модификация наноматериалов, усиление противообрастающих свойств композитов или, наоборот, формирование подходящих подложек для получения полезных для человека микробных биопленок.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Пермского края в рамках научного проекта № 20-44-596002.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Singh J., Dutta T., Kim K.-H., Rawat M., Samddar P., Kumar P. // J. Nanobiotechnol. 2018. V. 16. P. 84. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0408-4>
2. Whitesides G. // Small. 2005. V. 1. № 2. P. 172–179. <https://doi.org/10.1002/sml.200400130>
3. Johnston H. J., Hutchison G. R., Christensen F. M., Peters S., Hankin S., Aschberger K., Stone V. // Nanotoxicology. 2010. V. 4. № 2. P. 207–246. <https://doi.org/10.3109/17435390903569639>
4. Shvedova A. A., Pietroiusti A., Fadeel B., Kagan V. E. // Toxicol. Appl. Pharmacol. 2012. V. 261. № 2. P. 121–133. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.03.023>
5. Devi L. S., Joshi S. R. // Mycobiology. 2012. V. 40. № 1. P. 27–34. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2012.40.1.027>
6. Burygin G. L. // Nanoscale Res. Lett. 2009. V. 4. P. 794–801. <https://doi.org/10.1007/s11671-009-9316-8>
7. Grace N. A., Pandian K. // Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp. 2007. V. 297. № 1–3. P. 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.10.024>
8. Saha B., Bhattacharya J., Mukherjee A., Ghosh A., Santra C., Dasgupta A. K., Karmakar P. // Nanoscale Res. Lett. 2007. V. 2. № 12. P. 614–622. <https://doi.org/10.1007/s11671-007-9104-2>
9. Rai A., Prabhune A., Perry C. C. // J. Mater. Chem. 2010. V. 20. № 32. P. 6789–6798. <https://doi.org/10.1039/C0JM00817F>

10. *Shahverdi A. R., Fakhimi A., Shahverdi H. R., Minaian S.* // *Nanomed.: Nanotechnol. Biol. Med.* 2007. V. 3. № 2. P. 168–171.
<https://doi.org/10.1016/j.nano.2007.02.001>
11. *Zheng K., Setyawati M. I., Lim, T.P., Leong D. T., Xie J.* // *ACS Nano.* 2016. V. 10. № 8. P. 7934–7942.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.6b03862>
12. *Chopra I.* // *J. Antimicrob. Chemother.* 2007. V. 59. № 4. P. 587–590.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkm006>
13. *Wang S. G., Chen Y. C., Chen Y. C.* // *Nanomedicine (Lond).* 2018. V. 13. № 12. P. 1405–1416.
<https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0380>
14. *Fuller M., Whiley H., Köper I.* // *SN Appl. Sci.* 2020. V. 2. 1022.
<https://doi.org/10.1007/s42452-020-2835-8>
15. *Wang J., Zhang J., Liu K., He J., Zhang Y., Chen S., Ma G., Cui Y., Wang L., Gao D.* // *Int. J. Pharm.* 2020. V. 580. 119231.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119231>
16. *Fan Y., Pauer A. C., Gonzales A. A., Fenniri H.* // *Int. J. Nanomed.* 2019. V. 14. P. 7281–7289.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S209756>
17. *Chavan C., Kamble S., Murthy A. V.R., Kale S. N.* // *Nanotechnology.* 2020. V. 31. № 21. 215604.
<https://doi.org/10.1088/1361-6528/ab72b4>
18. *Rocca D. M., Silvero M. J., Aiassa V., Becerra M. C.* // *Photodiagnosis. Photod. Ther.* 2020. V. 31. 101811.
<https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101811>
19. *Flemming H.-C., Wingender J.* // *Nature Reviews Microbiology.* 2010. V. 8. P. 623–633.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
20. *Abdallah M., Benoliel C., Drider D., Dhulster P., Chihib N. E.* // *Arch. Microbiol.* 2014. V. 196. № 7. P. 453–472.
<https://doi.org/10.1007/s00203-014-0983-1>
21. *Wingender J., Flemming H. C.* // *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 2011. V. 214. № 6. P. 417–423.
<https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.05.009>
22. *Al-Wrafy F.A., Al-Gheethi A.A., Ponnusamy S. K., Noman E. A., Fattah S. A.* *Chemosphere.* 2022. 288. 132603.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132603>
23. *Ozdal M., Gurkok S.* // *ADMET & DMPK.* 2022. V. 10. № 2. P. 115–129.
<https://doi.org/10.5599/admet.1172>
24. *Teixeira-Santos R., Gomes M., Gomes L. C., Mergulhão F. J.* // *iScience.* 2020. V. 24. № 1. 102001.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.102001>
25. *Kumari A., Rajeev R., Benny L., Sudhakar Y. N., Varghese A., Hegde G.* // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2021. V. 297. 102542.
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102542>
26. *Zhao Q., Wang S., Lv Z., Zupanec A., Guo S., Zhao Q., Jiang L., Yu Y.* // *Biotechnol. Adv.* 2022. V. 59. 107982.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107982>
27. *Maksimova Yu.G., Nikulin S. M., Osovetskii B. M., Demakov V. A.* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2017. V. 53. № 5. P. 506–512.
<https://doi.org/10.1134/S0003683817050118>
28. *Pondman K., Le Gac S., Kishore U.* // *Immunobiology.* 2022. V. 228. № 2. 152317.
<https://doi.org/10.1016/j.imbio.2022.152317>
29. *Musee N., Thwala M., Nota N.* // *J. Environ. Monit.* 2011. V. 13. № 5. P. 1164–1183.
<https://doi.org/10.1039/C1EM10023H>
30. *Kulshrestha S., Qayyum S., Khan A. U.* // *Microb. Pathog.* 2017. V. 103. P. 167–177.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.12.022>
31. *Yu Q., Li J., Zhang Y., Wang Y., Liu L., Li M.* // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 26667.
<https://doi.org/10.1038/srep26667>
32. *Thill A., Zeyons O., Spalla O., Chauvat F., Rose J., Ayffan M., Flank A. M.* // *Environ. Sci. Technol.* 2006. V. 40. № 19. P. 6151–6156.
<https://doi.org/10.1021/es060999b>
33. *Jones N., Ray B., Ranjit K. T., Manna A. C.* // *FEMS Microbiol. Lett.* 2008. V. 279. № 1. P. 71–76.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.01012.x>
34. *Kang S., Pinault M., Pfefferle L. D., Elimelech M.* // *Langmuir.* 2007. V. 23. № 17. P. 8670–8673.
<https://doi.org/10.1021/la701067r>
35. *Kang S., Herzberg M., Rodrigues D. F., Elimelech M.* // *Langmuir.* 2008. V. 24. № 13. P. 6409–6413.
<https://doi.org/10.1021/la800951v>
36. *Tao Y., Zhou F., Wang K., Yang D., Sacher E.* // *Molecules.* 2022. V. 27. № 20. 6951.
<https://doi.org/10.3390/molecules27206951>
37. *Maness P.-C., Smolinski S., Blake D. M., Huang Z., Wolfrum E. J., Jacoby W. A.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. V. 65. № 9. P. 4094–4098.
<https://doi.org/10.1128/aem.65.9.4094-4098.1999>
38. *Chawengkijwanich C., Hayata Y.* // *Int. J. Food Microbiol.* 2008. V. 123. № 3. P. 288–292.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.017>
39. *Kim B., Kim D., Cho D., Cho S.* // *Chemosphere.* 2003. V. 52. № 1. P. 277–281.
[https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00051-1](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00051-1)
40. *Chorianopoulos N. G., Tsoukleris D. S., Panagou E. Z., Falaras P., Nychas G.-J.E.* // *Food Microbiol.* 2011. V. 28. № 1. P. 164–170.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.025>
41. *Pramanik A., Laha D., Bhattacharya D., Pramanik P., Karmakar P.* // *Colloids Surf.* 2012. V. 96. P. 50–55.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.03.021>
42. *Chamundeeswari M., Sobhana S. S.L., Jacob J. P., Kumar M. G., Devi M. P., Sastry T. P., Mandal A. B.* // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2010. V. 55. № 1. P. 29–35.
<https://doi.org/10.1042/ba20090198>
43. *Koper O., Klabunde J., Marchin G., Klabunde K. J., Stoimenov P., Bohra L.* // *Curr. Microbiol.* 2002. V. 44. № 1. P. 49–55.
<https://doi.org/10.1007/s00284-001-0073-x>
44. *Hetrick E. M., Shin J. H., Paul H. S., Schoenfisch M. H.* // *Biomaterials.* 2009. V. 30. № 14. P. 2782–2789.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.01.052>
45. *Wadhvani P., Heidenreich N., Podeyn B., Bürck J., Ulrich A. S.* // *Biomater. Sci.* 2017. V. 5. № 4. P. 817–827.
<https://doi.org/10.1039/C7BM00069C>
46. *Lee B., Park J., Ryu M., Kim S., Joo M., Yeom J. H., Kim S., Park Y., Lee K., Bae J.* // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. 13572.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-14127-z>

47. Wang S., Yan C., Zhang X., Shi D., Chi L., Luo G., Deng J. // *Biomater. Sci.* 2018. V. 6. № 10. P. 2757–2772. <https://doi.org/10.1039/c8bm00807h>
48. Palmieri G., Tatè R., Gogliettino M., Balestrieri M., Rea I., Terracciano M., Proroga Y. T., Capuano F., Anastasio A., De Stefano L. // *Bioconjug. Chem.* 2018. V. 29. № 11. P. 3877–3885. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00706>
49. Li W., Geng X., Liu D., Li Z. // *Int. J. Nanomed.* 2019. V. 14. P. 8047–8058. <https://doi.org/10.2147/IJN.S212750>
50. Vinoj G., Pati R., Sonawane A., Vaseeharan B. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014. V. 59. № 2. P. 763–771. <https://doi.org/10.1128/aac.03047-14>
51. Peng H., Borg R. E., Dow L. P., Pruitt B. L., Chen I. A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020. V. 117. № 4. P. 1951–1961. <https://doi.org/10.1073/pnas.1913234117>
52. Chifiriuc C., Grumezescu V., Grumezescu A., Saviuc C., Lazăr V., Andronescu E. // *Nanoscale Res. Lett.* 2012. V. 7. № 1. P. 209. <https://doi.org/10.1186/1556-276x-7-209>
53. Morones J. R., Elechiguerra J. L., Camacho A., Holt K., Kouri J. B., Yacaman M. J. // *Nanotechnology.* 2005. V. 16. № 10. P. 2346–2353. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>
54. Pal S., Tak Y. K., Song J. M. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. V. 73. № 6. P. 1712–1720. <https://doi.org/10.1128/AEM.02218-06>
55. Cho K. H., Park J. E., Osaka T., Park S. G. // *Electrochim. Acta.* 2005. V. 51. № 5. P. 956–960. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2005.04.071>
56. Baker C., Pradhan A., Pakstis L., Pochan D. J., Shah S. I. // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2005. V. 5. № 2. P. 244–249. <https://doi.org/10.1166/jnn.2005.034>
57. Martínez-Castañón G.A., Niño-Martínez N., Martínez-Gutiérrez F., Martínez-Mendoza J.R., Ruiz F. // *J. Nanoparticle Res.* 2008. V. 10. № 8. P. 1343–1348. <https://doi.org/10.1007/s11051-008-9428-6>
58. Huang L. // *J Inorg Biochem.* 2005. V. 99. № 5. P. 986–993. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.12.022>
59. Lellouche J., Friedman A., Lellouche J.-P., Gedanken A., Banin E. // *Nanomed.: Nanotechnol. Biol. Med.* 2012. V. 8. № 5. P. 702–711. doi.org/10.1016/j.nano.2011.09.002
60. Ortiz-Benítez E.A., Velázquez-Guadarrama N., Durán Figueroa N. V., Quezada H., De Jesús Olivares-Trejo J. // *Metallomics.* 2019. V. 11. № 7. P. 1265–1276. <https://doi.org/10.1039/c9mt00084d>
61. Zheng K., Setyawati M. I., Leong D. T., Xie J. // *ACS Nano.* 2017. V. 11. № 7. P. 6904–6910. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b02035>
62. Xing X., Ma W., Zhao X., Wang J., Yao L., Jiang X., Wu Z. // *Langmuir.* 2018. V. 34. № 42. P. 12583–12589. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b01700>
63. Zhou Y., Kong Y., Kundu S., Cirillo J. D., Liang H. // *J. Nanobiotechnol.* 2012. V. 10. P. 19. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-10-19>
64. Mubarak Ali D., Thajuddin N., Jeganathan K., Gunasekaran M. // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2011. V. 85. № 2. P. 360–365. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.03.009>
65. Badwaik V. D., Vangala L. M., Pender D. S., Willis C. B., Aguilar Z. P., Gonzalez M. S., Paripelly R., Dakshinamurthy R. // *Nanoscale Res. Lett.* 2012. V. 7. № 1. P. 623. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-7-623>
66. Bankier C., Matharu R. K., Cheong Y. K., Ren G. G., Cloutman-Green E., Ciric L. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 16074. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52473-2>
67. Shaikh S., Nazam N., Rizvi S. M.D., Ahmad K., Baig M. H., Lee E. J., Choi I. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 10. P. 2468. <https://doi.org/10.3390/ijms20102468>
68. Linklater D. P., Baulin V. A., Le Guével X., Fleury J., Hanssen E., Nguyen T. H.P., Juodkazis S., Bryant G., Crawford R. J., Stoodley P., Ivanova E. P. // *Adv. Mater.* 2020. V. 32. № 52. P. 2005679. <https://doi.org/10.1002/adma.202005679>
69. Campoccia D., Montanaro L., Arciola C. R. // *Biomaterials.* 2013. V. 34. № 34. P. 8533–8554. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.089>
70. Дерябин Д. Г., Васильченко А. С., Алешина Е. С., Тягулова А. С., Никиян А. Н. // *Российские нанотехнологии.* 2010. Т. 5. № 11–12. С. 103–108.
71. Maksimova Y., Zorina A., Nesterova L. // *Microorganisms.* 2023. V. 11. P. 1221. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051221>
72. Applert G., Lrlouche J., Perkass N., Nitzan Y., Gedanken A., Banin E. // *RSC Adv.* 2012. V. 2. № 6. P. 2314–2321. <https://doi.org/10.1039/C2RA00602B>
73. Martín S. M., Barros R., Domi B., Rumbo C., Poddighe M., Aparicio S., Suarez-Diez M., Tamayo-Ramos J.A. // *Nanomaterials.* 2021. V. 11. № 9. P. 2272. <https://doi.org/10.3390/nano11092272>
74. Vecitis C. D., Zdrov K. R., Kang S., Elimelech M. // *ACS Nano.* 2010. V. 4. № 9. P. 5471–5479. <https://doi.org/10.1021/nn101558x>
75. Jackson P., Jacobsen N. R., Baun A., Birkedal R., Kühnel D., Jensen K. A., Vogel U., Wallin H. // *Chem. Cent. J.* 2013. V. 7. P. 154. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-154>
76. Kang S., Mauter M. S., Elimelech M. // *Environ. Sci. Technol.* 2008. V. 42. № 19. P. 7528–7534. <https://doi.org/10.1021/es8010173>
77. Chen C.-Y., Jafvert C. T. // *Carbon.* 2011. V. 49. № 15. P. 5099–5106. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2011.07.029>
78. Mohammad G., Mishra V. K., Pandey H. P. // *Digest J Nanomater Biostruct.* 2008. V. 3. № 4. P. 159–162.
79. Fenoglio I., Tomatis M., Lison D., Muller J., Fonseca A., Nagy J. B., Fubini B. // *Free Radic. Biol. Med.* 2006. V. 40. № 7. P. 1227–1233. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.11.010>
80. Hall-Stoodley L., Costerton J. W., Stoodley P. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2004. V. 2. № 2. P. 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
81. Bjarnsholt T. // *APMIS.* 2013. V. 121. № 136. P. 1–58. <https://doi.org/10.1111/apm.12099>
82. Flemming H.-C., Neu T. R., Wozniak D. J. // *J. Bacteriol.* 2007. V. 189. № 22. P. 7945–7947. <https://doi.org/10.1128/JB.00858-07>
83. Rodrigues D. F., Elimelech M. // *Environ. Sci. Technol.* 2010. V. 44. № 12. P. 4583–4589. <https://doi.org/10.1021/es1005785>

84. Lundqvist M., Stigler J., Elia G., Lynch I., Cedervall T., Dawson K. A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. № 38. P. 14265–14270.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0805135105>
85. Takenaka S., Pitts B., Trivedi H. M., Stewart P. S. // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 75. № 6. P. 1750.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02279-08>
86. Stewart P. S. // J. Bacteriol. Res. 2003. V. 185. № 5. P. 1485.
<https://doi.org/10.1128/JB.185.5.1485-1491.2003>
87. Peulen T. O., Wilkinson K. J. // Environ. Sci. Technol. 2011. V. 45. № 8. P. 3367.
<https://doi.org/10.1021/es103450g>
88. Guiot E., Georges P., Brun A., Fontaine-Aupart M., Bellon-Fontaine M.-N., Briandet R. // Photochem. Photobiol. 2002. V. 75. № 6. P. 570–578.
[https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2002\)075<0570:hodimb>2.0.co;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2002)075<0570:hodimb>2.0.co;2)
89. Sanabria H., Kubota Y., Waxham M. N. // Biophys. J. 2007. V. 92. № 1. P. 313–322.
<https://doi.org/10.1529/biophysj.106.090498>
90. Habimana O., Steenkeste K., Fontaine-Aupart M. P., Bellon-Fontaine M.N., Kulakauskas S., Briandet R. // Appl. Environ. Microbiol. 2011. V. 77. № 1. P. 367–368.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02163-10>
91. Neihaya H. Z., Zaman H. H. // Microb. Pathog. 2018. V. 116. P. 200–208.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.01.024>
92. Neu T. R., Manz B., Volke F., Dynes J. J., Hitchcock A. P., Lawrence J. R. // FEMS Microbiol. Ecol. 2010. V. 72. № 1. P. 1–21.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00837.x>
93. Schmitt J., Flemming H.-C. // Water Sci. Technol. 1999. V. 39. № 7. P. 77–82.
[https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(99\)00153-5](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(99)00153-5)
94. Ramalingam V., Rajaram R., PremKumar C., Santhanam P., Vinothkumar S., Kaleshkumar Dhi K. // J. Basic Microbiol. 2013. V. 53. V. 54. № 9. P. 928–936.
<https://doi.org/10.1002/jobm.201300514>
95. Stan M. S., Cinteza O. L., Petrescu L., Mernea M. A., Calborean O., Mihailescu D. F., Sima C., Dinischiotu A. // Sci. Rep. 2018. V. 8. № 1. P. 5289.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-23621-x>
96. Vandana, Das S. // Carbohydr Polym. 2022. V. 291. P. 119536.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119536>
97. Fazeli-Nasab B., Sayyed R. Z., Mojahed L. S., Rahmani A. F., Ghafari M., Antoniusf S., Sukamto. // Biocatal. Agric. Biotechnol. 2022. V. 42. P. 102337.
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102337>
98. Ghosh S., Saha I., Dey A., Lahiri D., Nag M., Sarkar T., Pati S., Rebezov M., Shariati M. A., Thiruvengadam M., Ray R. R. // S. Afr. J. Bot. 2021. V. 151. P. 92–106.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.11.039>
99. Fernández-Gómez P., López M., Prieto M., González-Raurich M., Alvarez-Ordóñez A. // Food Res. Int. 2020. V. 136. P. 109508.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109508>
100. Chen M., Cai Y., Li G., Zhao H., An T. // Appl. Catal. B. 2022. V. 307. P. 121200.
<https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2022.121200>
101. Ali S. G., Ansari M. A., Alzohairy M. A., Alomary M. N., AlYahya S., Jalal M., Khan H. M., Asiri S. M. M., Ahmad W., Mahdi A. A., El-Sherbeeny A. M., El-Meligy M. // Antibiotics. 2020. V. 9. № 3. P. 100.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics9030100>
102. Habimana O., Zanonni M., Vitale S., O'Neill T., Scholz D., Xu B., Casey E. // J. Colloid Interface Sci. 2018. V. 526. P. 419–428.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.05.014>
103. Zanonni M., Habimana O., Amadio J., Casey E. // Biotechnol. Bioeng. 2016. V. 113. № 3. P. 501–512.
<https://doi.org/10.1002/bit.25835>
104. Rutherford S. T., Bassler B. L. // Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2012. V. 2. № 11. a012427.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012427>
105. Papenfort K., Bassler B. L. // Nat. Rev. Microbiol. 2016. V. 14. № 9. P. 576–588.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.89>
106. Kim H.-S., Lee S.-H., Byun Y., Park H.-D. // Sci. Rep. 2015. V. 5. № 1. P. 8656.
<https://doi.org/10.1038/srep08656>
107. Jayaraman A., Wood T. H. // Annu. Rev. Biomed Eng. 2008. V. 10. P. 145–167.
<https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.10.061807.160536>
108. Fuqua C., Greenberg E. P. // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2002. V. 3. P. 685–695.
<https://doi.org/10.1038/nrm907>
109. Nadell C. D., Xavier J. B., Levin S. A., Foster K. R. // Plos Biol. 2008. V. 6. № 14. P. 171–179.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060014>
110. Whiteley M., Diggle S. P., Greenberg E. P. // Nature. 2017. V. 555. № 7694. P. 313–320.
<https://doi.org/10.1038/nature25977>
111. Raffa R. B., Lannuzo J. R., Levine D. R., Saeid K. K., Schwartz R. C., Sucic N. T., Terleckyj O. D., Young J. M. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2005. V. 312. № 2. P. 417–423.
<https://doi.org/10.1124/jpet.104.075150>
112. Skandamis P. N., Nychas G.J. // Appl. Environ. Microbiol. 2012. V. 78. № 16. P. 5473–5482.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00468-12>
113. Kim T. H., Lee I., Yeon K.-M., Kim J. // J. Membr. Sci. 2018. V. 554. P. 357–365.
<https://doi.org/10.1016/j.memsci.2018.03.020>
114. Qais F. A., Shafiq A., Ahmad I., Husain F. M., Khan R. A., Hassan I. // Microb. Pathog. 2020. V. 144. P. 104172.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104172>
115. Ali S. G., Ansari M. A., Khan H. M., Jalal M., Mahdi A. A., Cameotra S. S. // J. Gen. Microbiol. 2016. V. 57. № 3. P. 193–203.
<https://doi.org/10.1002/jobm.201600175>
116. Singh B. R., Singh B. N., Singh A., Khan W., Naqvi A. H., Singh H. B. // Sci. Rep. 2015. V. 5. № 1. P. 13719.
<https://doi.org/10.1038/srep13719>
117. Al-Shabib N. A., Husain F. M., Ahmed F., Khan R. A., Ahmad I., Alsharaeh E., Khan M. S., Hussain A., Rehman M. T., Yusuf M., Hassan I., Khan J. M., Ashraf G. M., Alsalmeh A., Al-Ajmi M. F., Tarasov V. V., Aliev G. // Sci. Rep. 2016. V. 6. № 1. P. 36761.
<https://doi.org/10.1038/srep36761>
118. Naik K., Kowshik M. // J. Appl. Microbiol. 2014. V. 117. № 4. P. 972–983.
<https://doi.org/10.1111/jam.12589>

119. Miller K. P., Wang L., Chen Y.-P., Pellechia P. J., Benicewicz B. C., Decho A. W. // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00189>
120. Пищик В. Н., Воробьев Н. И., Проворов Н. А., Хомяков Ю. В. // *Микробиология.* 2016. Т. 85. № 3. С. 231–247. <https://doi.org/10.7868/S0026365616030113>
121. Shkodenko L., Kassirov I., Koshel E. // *Microorganisms.* 2020. V. 8. P. 1545. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101545>
122. Lara H. H., Ayala-Nuñez N.V., Ixtapan-Turrent L., Rodriguez-Padilla C. // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2010. V. 26. P. 615–621. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0211-3>
123. Salata O. // *J. Nanobiotechnology.* 2004. V. 2. P. 3. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-2-3>
124. Crabtree J. H., Burchette R. J., Siddiqi R. A., Huen I. T., Hadnott L. L., Fishman A. // *Perit. Dial Int.* 2003. V. 23. № 4. P. 368–374. <https://doi.org/10.1177/089686080302300410>
125. Khare M. D., Bukhari S. S., Swann A., Spiers P., McLaren I., Myers J. // *J. Infect.* 2007. V. 54. № 2. P. 146–150. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2006.03.002>
126. Jain P., Pradeep T. // *Biotechnol. Bioeng.* 2005. V. 90. № 1. P. 59–63. <https://doi.org/10.1002/bit.20368>
127. Хина А. Г., Крутяков Ю. А. // *Прикл. биохимия микробиология.* 2021. Т. 57. № 6. С. 523–535.
128. Крутяков Ю. А., Хина А. Г. // *Прикл. биохимия микробиология.* 2022. Т. 58. № 5. С. 419–433.
129. Petica A., Gavriliu S., Lungu M., Buruntea N., Panzaru C. // *Mater. Sci. Eng.* 2008. V. 152. № 1–3. P. 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2008.06.021>
130. Kong H., Jang J. // *Langmuir.* 2008. V. 24. № 5. P. 2051–2056. <https://doi.org/10.1021/la703085e>
131. Gupta A., Silver S. // *Nat. Biotechnol.* 1998. V. 16. № 10. P. 888–890. <https://doi.org/10.1038/nbt1098-888>
132. Matsumura Y., Yoshikata K., Kunisaki S., Tsuchido T. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69. № 7. P. 4278–4281. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.4278-4281.2003>
133. Rai M. K., Deshmukh S. D., Ingle A. P., Gade A. K. // *J. Appl. Microbiol.* 2012. V. 112. № 5. P. 841–852. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05253.x>
134. Markowska K., Grudniak A., Wolska K. // *Acta Biochim. Pol.* 2013. V. 60. № 4. P. 523–530. https://doi.org/10.18388/abp.2013_2016
135. Monteiro D., Silva S., Negri M., Gorup L., Camargo R., Oliveira R., Barbosa D., Henriques M. // *J. Appl. Microbiol.* 2013. V. 114. № 4. P. 1175–1183. <https://doi.org/10.1111/jam.12102>
136. Lok C. N., Ho C. M., Chen R., He Q. Y., Yu W. Y., Sun H., Tam P. K., Chiu J. F., Che C. M. // *J. Proteome Res.* 2006. V. 5. № 4. P. 916–924. <https://doi.org/10.1021/pr0504079>
137. Smetana A. B., Klabunde K. J., Marchin G. R., Sorensen C. M. // *Langmuir.* 2018. V. 24. № 14. P. 7457–7464. <https://doi.org/10.1021/la800091y>
138. Sondi I., Salopek-Sondi B. // *J Colloid Interface Sci.* 2004. V. 275. № 1. P. 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.02.012>
139. Gogoi S. K., Gopinath P., Paul A., Ramesh A., Ghosh S. S., Chattopadhyay A. // *Langmuir* 2006. V. 22. № 22. P. 9322–9328. <https://doi.org/10.1021/la060661v>
140. Li W. R., Xie X. B., Shi Q. S., Zeng H. Y., Ou-Yang Y.S., Chen Y. B. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. V. 85. P. 1115–1122. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2159-5>
141. Wu D., Fan W., Kishen A., Gutmann J. L., Fan B. // *J. Endod.* 2014. V. 40. № 2. P. 285–290. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.08.022>
142. Сухина М. А., Шелыгин Ю. А., Пиядина А. Ю., Фельдман Н. Б., Ананян М. А., Луценко С. В., Фролов С. А. // *Колопроктология.* 2019. Т. 18. № 3. С. 56–70. <https://doi.org/10.33878/2073-7556-2019-18-3-56-70>
143. Schmidt H., Thom M., Madzgalla M., Gerbersdorf S. U., Metreveli G., Manz W. // *J. Aquat. Pollut. Toxicol.* 2017. V. 1. № 2. P. 9.
144. Grün A. Y., Meier J., Metreveli G., Schaumann G. E., Manz W. // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2016. V. 23. № 23. P. 24277–24288. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7691-0>
145. Sheng Z., Liu Y. // *Water Res.* V. 45. № 18. P. 6039–6050. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.08.065>
146. Cui Y., Zhao Y., Tian Y., Zhang W., Lü X., Jiang X. // *Biomaterials.* 2012. V. 33. № 7. P. 2327–2333. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.11.057>
147. Piktel E., Suprewicz L., Depciuch J., Chmielewska S., Sklodowski K., Daniluk T., Krol G., Kolat-Brodecka P., Bijak P., Pajor-Swierzy A., Fiedoruk K., Parlinska-Wojtan M., Bucki R. // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. P. 12546. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91847-3>
148. Huang Z., Zheng X., Yan D., Yin G., Liao X., Kang Y., Yao Y., Huang D., Hao B. // *Langmuir.* 2008. V. 24. № 8. P. 4140–4144. <https://doi.org/10.1021/la7035949>
149. Hou J., Miao L., Wang C., Wang P., Ao Y., Qian J., Dai S. // *J. Hazard. Mater.* 2014. V. 276. P. 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.04.048>
150. Applerot G., Lellouche J., Lipovsky A., Nitzan Y., Lubart R., Gedanken A., Banin E. // *Small.* 2012. V. 8. № 21. P. 3326–3337. <https://doi.org/10.1002/sml.201200772>
151. Megarajan S., Subramaniyan S. B., Prakash S. A., Kamlekar R., Anbazhagan V. // *Microb. Pathog.* 2019. V. 127. P. 341–346. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.12.025>
152. Cabral-Romero C., Hernandez-Delgadillo R., Velasco-Arias D., Diaz D., Niño-Arevalo K., Garza-Enriquez M., De la Garza-Ramos M. // *Int. J. Nanomedicine.* 2012. V. 7. P. 2109–2113. <https://doi.org/10.2147/ijn.s29854>
153. Kim J. Y., Park H.-J., Lee C., Nelson K. L., Sedlak D. L., Yoon J. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. V. 76. № 22. P. 7668–7670. <https://doi.org/10.1128/aem.01009-10>
154. Huang L., Li D.-Q., Lin Y.-J., Wei M., Evans D. G., Duan X. // *J. Inorg. Biochem.* 2005. V. 153. № 5. P. 986–993. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.12.022>
155. Maruthupandy M., Rajivgandhi G. N., Quero F., Li W.-J. // *J. Environ. Chem. Eng.* 2020. V. 8. № 6. P. 104533. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104533>

156. Boshagh F., Rostami K., Moazami N. // *Int. J. Hydrog. Energy*. 2019. V. 44. № 28. P. 14395–14405.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.11.199>
157. Halkare P., Punjabi N., Wangchuk J., Nair A., Kondabagil K., Mukherji S. // *Sens. Actuators B Chem.* 2018. V. 281. P. 643–651.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.10.119>
158. Kuyukina M. S., Glebov G. G., Ivshina I. B. // *Nanomaterials (Basel)*. 2022. V. 12. № 6. P. 951.
<https://doi.org/10.3390/nano12060951>
159. Максимова Ю. Г. // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2019. Т. 55. № 1. С. 3–16.
<https://doi.org/10.1134/S0555109919010100>
160. Guo Z., Xie C., Zhang P., Zhang J., Wang G., He X. *et al.* // *Sci. Total Environ.* 2017. V. 580. P. 1300–1308.
<https://doi.org/doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.093>
161. Malek I., Schaber C. F., Heinlein T., Schneider J. J., Gorb S. N., Schmitz R. A. // *J. Mater. Chem. B*. 2016. V. 4. № 31. P. 5228–5235.
<https://doi.org/10.1039/C6TB00942E>
162. Levi-Polyachenko N., Young C., MacNeill C., Braden A., Argenta L., Reid S. // *Int. J. Hyperthermia*. 2014. V. 30. № 7. P. 490–501.
<https://doi.org/10.3109/02656736.2014.966790>
163. Maksimova Yu. G., Bykova Ya. E., Zorina A. S., Nikulin S. M., Maksimov A. Yu. // *Microbiology*. 2022. V. 91. № 4. P. 454–462.
<https://doi.org/10.1134/S0026261722100861>
164. Maksimova Y. G., Bykova Y., Maksimov A. // *Microorganisms*. 2022. V. 10. № 8. P. 1627.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms1008162>
165. Pantanella F., Berlutti F., Passeri D., Sordi D., Frioni A., Natalizi T. *et al.* // *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2011. V. 2011. P. 291513.
<https://doi.org/10.1155/2011/291513>
166. Максимова Ю. Г., Быкова Я. Е. // *Вестник Пермского университета. Серия Биология*. 2022. № 2. С. 131–136.
<https://doi.org/10.17072/1994-9952-2022-2-131-136>
167. Upadhyayula V. K. K., Gadhamshetty V. // *Biotechnol. Adv.* 2010. V. 28. № 6. P. 802–816.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.06.006>
168. Liu Q., Zhang C., Bao Y., Dai G. // *Appl. Surf. Sci.* 2018. V. 443. P. 255–265.
<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.02.120>
169. Lange A., Grzenia A., Wierzbicki M., Strojny-Cieslak B., Kalińska A., Gołębiewski M. *et al.* // *Animals*. 2021. V. 11. № 7. P. 1884.
<https://doi.org/10.3390/ani11071884>
170. Altaf M., Zeyad M. T., Hashmi A., Manoharadas S., Hussain S. A., Ali Abuhasile M. S., Almuzainid M. A. M. // *RSC Adv.* 2021. V. 11. № 31. P. 19248–19257.
<https://doi.org/10.1039/D1RA02876F>

Antibiofilm and Probiofilm Effects of Nanomaterials on Microorganisms

© 2024 Yu. G. Maksimova^{a, b, *} and A. S. Zorina^a

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

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

*e-mail: yul_max@mail.ru

Abstract—The review summarizes and analyzes information regarding the effect of nanoparticles (NPs) of metals, metal oxides and carbon on the biofilm formation and mature biofilms of microorganisms. The viability of individual microbial cells, including direct disruption of cell surface structures and oxidative stress associated with the formation of reactive oxygen species (ROS), as well as the effect on the production of the exopolymer matrix and the quorum sensing system are considered as the mechanisms of NPs action on biofilms. The effects of silver NPs, gold NPs, some metal oxides, and carbon nanomaterials on microbial biofilms have been described in more detail. The effects of metal and carbon NPs on microbial biofilms are compared. Both antibiofilm and probiofilm effects of NPs are noted, depending on their nature, and the prospect of their use as antimicrobial agents and carriers for the production of microbial biofilms of biotechnological significance are considered.

Keywords: nanomaterials, nanoparticles, microbial biofilms, exopolysaccharide matrix, quorum sensing, carbon nanotubes, oxidative stress, biocatalyst, microbial fuel cells

УДК 579.64

ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЕТЕКТР ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОЙ ДЕТЕКЦИИ БАКТЕРИАЛЬНОГО ФИТОПАТОГЕНА *Dickeya solani* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕКОМБИНАНТНОЙ CRISPR-НУКЛЕАЗЫ Cas12a, ПОЛУЧЕННОЙ ОДНОСТАДИЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ОЧИСТКОЙ

© 2024 г. Л. К. Курбатов^{1, *}, С. П. Радько^{1, 2, **}, С. А. Хмелева¹,
К. Г. Птицын¹, О. С. Тимошенко¹, А. В. Лисица^{1, 2}

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

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

*e-mail: kurbatovl@mail.ru

**e-mail: radkos@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.07.2023 г.

После доработки 30.08.2023 г.

Принята к публикации 03.09.2023 г.

В работе показано, что рекомбинантная CRISPR-нуклеаза Cas12a, полученная упрощенным методом очистки после ее гетерологической экспрессии с применением одностадийной металл-хелатной хроматографии, может быть успешно использована в технологии ДЕТЕКТР. Полученная таким способом CRISPR-нуклеаза Cas12a в комбинации с рекомбиназной полимеразной амплификацией позволила обеспечить селективность детекции *Dickeya solani* — опасного фитопатогена, вызывающего заболевание картофеля, известное как “черная ножка”, с пределом обнаружения 1 копия бактериального генома на реакцию амплификации. Результат может быть определен визуально, без использования сложных инструментальных методов, по изменению окраски реакционной пробы при освещении синим светом, что создало основу для разработки полевой ДНК-диагностики *D. solani*. Применение упрощенной хроматографической очистки позволит существенно снизить затраты времени и ресурсов, необходимые для получения функционально активной CRISPR-нуклеазы Cas12a, при разработке и производстве ДНК-диагностик на основе технологии ДЕТЕКТР.

Ключевые слова: CRISPR-нуклеаза Cas12a, ДЕТЕКТР, фитопатоген, *Dickeya solani*

DOI: 10.31857/S0555109924010025, **EDN:** HDBPCB

Комбинирование CRISPR/Cas-нуклеаз и методов изотермической амплификации нуклеиновых кислот рассматривается сегодня как наиболее перспективный подход к созданию высокоселективных методов ДНК-диагностики патогенных микроорганизмов и вирусов для использования как в практике специализированных диагностических лабораторий, так и при диагностике “у постели больного” (point-of-care testing) или в полевых условиях детекции [1, 2]. Две технологии детекции, известные как SHERLOCK (Specific High-sensitivity Enzymatic Reporter un-LOCKing) [3] и ДЕТЕКТР (DNA endonuclease-targeted CRISPR *trans* reporter) [4], получили наибольшее распространение при создании таких методов [2, 5]. В случае ДЕТЕКТР, CRISPR-нуклеаза Cas12a комбинируется с рекомбиназной полимеразной амплификацией (РПА) — изотермической амплификацией ДНК, протекающей при постоянной температуре 37–42°C [6].

Нуклеаза формирует комплекс с синтетической РНК (так называемая “guide RNA” — направляющей РНК, нРНК), часть последовательности которой (“спейсер”) комплементарна участку (“протоспейсер”) одной из цепей целевых РПА-ампликонов. Исключительная селективность ДЕТЕКТР достигается тем, что активация нуклеазы происходит только при распознавании целевых ампликонов через формирование дуплекса спейсер/протоспейсер, вызывая появление у CRISPR/Cas-нуклеазы так называемой “коллатеральной” активности — способности расщеплять молекулы одноцепочечной ДНК [4]. Коллатеральная активность приводит к расщеплению добавленных в реакционную смесь коротких ДНК-олигонуклеотидов (репортеров), несущих на концах 6-карбоксыфлуоресцеин (FAM) и молекулу-“гаситель” (BHQ-1), и, соответственно, к появлению флуоресценции, которая определяется либо с помощью

инструментальных методов, либо визуально (невооруженным глазом) при освещении реакционной пробы синим светом [5].

При создании технологии ДНК-диагностики DETECTR изначально использовалась рекомбинантная CRISPR-нуклеаза Cas12a, полученная с помощью трехстадийной хроматографической очистки после гетерологической экспрессии, включавшей (1) аффинную и (2) ионнообменную хроматографию, а также (3) гель-фильтрацию на заключительной стадии [4]. Позже были предложены более простые схемы очистки физиологически активной CRISPR-нуклеазы Cas12a, но они также состояли из более чем одной стадии (например, [7, 8]). Ранее мы показали, что другая CRISPR-нуклеаза, а именно Cas13a, может быть получена в физиологически активной форме одностадийной металл-хелатной хроматографией [9]. Применение такого же подхода к очистке CRISPR-нуклеазы Cas12a несомненно упростило бы ее получение для использования в разработке методов ДНК-диагностики различных патогенных агентов с использованием технологии DETECTR.

Dickeya solani [10] является одним из наиболее опасных бактериальных фитопатогенов картофеля, вызывающих заболевание, известное как «черная ножка» [10, 11]. Заболевание причиняет значительный экономический ущерб картофелеводству, в том числе из-за потерь урожая при хранении. Традиционно для ДНК-диагностики *D. solani* используется метод ПЦР в реальном времени [12–14], что предполагает проведение анализа в специализированных лабораториях, оборудованных ПЦР-амплификаторами. Как альтернатива, недавно был предложен метод ДНК-диагностики *D. solani* на основе РПА, который не требует наличия сложного оборудования, потенциально позволяя детектировать данный фитопатоген в полевых условиях [15]. Комбинирование РПА с CRISPR/Cas-детекцией для селективной ДНК-диагностики *D. solani* до настоящего времени не проводилось.

Цель работы — используя бактериальный патоген картофеля *D. solani* в качестве примера показать, что препараты рекомбинантной CRISPR-нуклеазы Cas12a, получаемые упрощенной одностадийной хроматографической очисткой целевого белка, могут успешно применяться для разработки ДНК-диагностикумов на основе технологии DETECTR.

МЕТОДИКА

В работе использовались реактивы компании “Merck” (США), если не указано другое. Растворы готовили на деионизованной воде (Milli-Q, 18 МОм·см). ДНК-олигонуклеотиды (табл. 1) были синтезированы и очищены компаниями “Синтол” (Россия) и “Евроген” (Россия). В работе использовались бактериальные штаммы (табл. 2),

полученные из коллекции Всероссийского научно-исследовательского института фитопатологии и Всероссийской коллекции микроорганизмов (Пушкинский научный центр биологических исследований РАН). Видовая принадлежность штаммов была подтверждена методом ПЦР в реальном времени с использованием наборов для выявления и дифференциальной диагностики соответствующих патогенов картофеля (“Pecto Dif-PB”, “*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*-PB” и “Dickeya-PB”) производства “Синтол” (Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Все бактерии, за исключением *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*), культивировали в среде LB (“ДиаМ”, Россия) при температуре 28°C. *Cms* культивировали при температуре 28°C на агаризованной среде, которая имела следующий состав (г/л): казеин-пептон — 10, дрожжевой экстракт — 5, агар-агар (“Becton Dickinson”, Франция) — 15, глюкоза (“Fluka”, Германия) — 5, NaCl — 5; pH 7.0–7.2.

Бактериальную ДНК и ДНК картофеля выделяли с помощью набора “ФитоСорб” (“Синтол”, Россия) согласно инструкции производителя (протокол без использования жидкого азота). После определения концентрации ДНК на флуориметре Qubit 4.0 (“Thermo Fisher Scientific”, США) с помощью набора “Qubit dsDNA BR Assay Kit” (“Thermo Fisher Scientific”), ДНК хранили при –20°C.

Плазмида 6-His-MBP-TEV-FnCpf1, содержащая ген FnCpf1 (Cas12a), была приобретена в репозитории ADDGENE (<https://www.addgene.org/90094/>) и трансформирована в штамм Rosetta™ 2(DE3) pLysS Singles™ Competent Cells (“Merck”, Германия). Клетки культивировали в течение ночи в среде LB, которая дополнительно содержала ампициллин (100 мкг/мл), хлорамфеникол (34 мкг/мл), 2 мМ MgSO₄ и 2% глюкозы. Ночную культуру (1.8 мл) инокулировали в 300 мл среды Terrific Broth следующего состава (г/л): тритон — 12, пептон — 2, дрожжевой экстракт — 24 (“Becton Dickinson”, Франция), K₂HPO₄—12.5 и KH₂PO₄—2.3. После добавления ампициллина до конечной концентрации 100 мкг/мл клетки культивировали при 37°C. Рост клеток контролировали измерением оптической плотности при длине волны 600 нм (*D*₆₀₀). Температуру инкубации снижали до 21°C после достижения значения *D*₆₀₀ = 0.2. При оптической плотности (*D*₆₀₀) — 0.6–0.8 в культуру добавляли индуктор экспрессии изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид до конечной концентрации 50 мкМ. Экспрессию целевого белка проводили в течение 16 ч при 21°C. Клетки осаждали центрифугированием (4000 g, 15 мин, 4°C), промывали фосфатно-солевым буфером (PBS, “Merck”, Германия) и использовали для получения целевого белка.

Все операции по получению целевого белка проводили при 4°C. Очистку рекомбинантной CRISPR-нуклеазы Cas12a осуществляли на

колонках Protino Ni-TED1000 (“Macherey-Nagel”, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Клетки, полученные осаждением из 300 мл экспрессионной среды, ресуспендировали в буфере LEW (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, pH 8.0) из набора к колонкам Protino Ni-TED1000 в соотношении 1 г осадка 2 мл буфера. В суспензию клеток вносили лизоцим и фенилметансульфонил фторид до конечной концентрации 1 мг/мл и 1 mM соответственно. После инкубации на льду в течение 30 мин клетки разрушали механическим способом с помощью френч-пресса FA-078AE (“Thermo Electron Corporation”, США). Поскольку полученный гомогенат имел повышенную вязкость из-за присутствия ДНК, проводили дополнительную обработку на ультразвуковом гомогенизаторе Sonopuls HD2070 (“Bandelin”, Германия). Полученный гомогенат осветляли центрифугированием при 20000 g в течение 40 мин (4°C) и делили на две части, каждую наносили на отдельную колонку Ni-TED. После промывки колонок связавшийся материал элюировали буфером, содержащим 250 mM имидазол, собирая фракции объемом 0.5 мл. Фракции анализировали методом электрофореза по Лэммли в 9%-ном ПААГ с последующей окраской Кумасси G-250 (“Bio-Rad”, США), как описано ранее [9]. Содержащие целевой белок фракции объединяли и переводили в буфер для хранения (20 mM HEPES, 500 mM NaCl, 0.1 mM ЭДТА, pH 7.5, 5%-ный глицерин, 1 mM дитиотреитол) с помощью диализа. Диализ проводили с использованием мембран SnakeSkin Dialysis Tubing 7000 MWCO (“Thermo Fisher Scientific”, США). Для концентрирования препаратов нуклеазы использовали центрифужные концентраторы Vivaspin 2 (“Sartorius Stedim”, Германия).

Масс-спектрометрическую идентификацию целевого белка и белковых загрязнений после электрофоретического разделения проводили как описано ранее для CRISPR/Cas-нуклеазы Cas13a [9]. Концентрацию целевого белка оценивали сопоставлением площадей пиков, соответствующих белковым полосам на геле, используя растворы бычьего сывороточного альбумина (БСА) известной концентрации в качестве стандартов. Денситометрию проводили на геле-сканере ImageScanner III (“GE Healthcare”, США) с последующей обработкой изображений в программе ImageQuant (“GE Healthcare Life Sciences”, США).

РПА проводили, используя коммерческие наборы TwistAmp® Basic (“TwistDX”, Великобритания) в соответствии с рекомендациями производителя. Амплификация выполнялась при 39°C, время реакции составляло 20 мин. Последовательности праймеров, предложенные в работе [15], приведены в табл. 2 (SOL-C-RPA-F и SOL-C-RPA-R). Продукты амплификации анализировали методом

электрофореза в 8%-ном ПААГ в TBE-буфере как описано ранее [16].

Синтетическую ДНК-мишень FR-T получали, смешивая эквимоллярные растворы олигонуклеотидов FR-T-F и FR-T-R (табл. 1). Смесь инкубировали 2 мин при 96°C с последующим медленным охлаждением до комнатной температуры. Последовательности спейсера нРНК подбирали с помощью интернет-ресурса “CHOP CHOP” (<https://chopchop.cbu.uib.no>). Данные последовательности были использованы в последовательностях ДНК-матриц (DS-G1, DS-G2 и DS-G3, табл. 1) для синтеза трех вариантов нРНК — нРНК-1, нРНК-2 и нРНК-3 соответственно. ДНК-матрицы содержали на 3'-конце участок, комплементарный последовательности промотора ДНК-зависимой РНК-полимеразы фага T7, и олигонуклеотид T7F с последовательностью T7-промотора. Эквимоллярную смесь ДНК-матрицы и T7F инкубировали 2 мин при 96°C, охлаждали до комнатной температуры и использовали для синтеза нРНК с помощью набора TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США) согласно инструкции производителя. Очистку нРНК проводили смесью фенол/хлороформ/изоамиловый спирт 25 : 24 : 1 (“Acros Organics”, Бельгия) с последующим осаждением этанолом. Осадок растворяли в воде, свободной от нуклеаз, и определяли концентрацию на спектрофотометре NanoDrop 1000. Аликвоты раствора нРНК хранили при –80°C. В качестве репортёров использовали олигонуклеотид Cas12-FQ с FAM и BHQ-1 на 5'- и 3'-концах соответственно (табл. 1).

Эндонуклеазную активность рекомбинантной CRISPR-нуклеазы Cas12a оценивали в буфере NEBuffer r2.1 Reaction Buffer (“New England Biolabs”, Великобритания). Реакционная проба объемом 50 мкл содержала от 3 до 150 нМ рекомбинантного белка, от 3 до 150 нМ нРНК и 2.5 мкМ олигонуклеотида Cas12-FQ. После 10-минутной инкубации при комнатной температуре в пробу добавляли либо синтетическую ДНК-мишень FR-T (50 нМ), либо аликвоту РПА-пробы. Флуоресценцию измеряли на планшетном флуориметре Infinite M200 PRO (“TECAN”, Швейцария) при 37°C в течение 120 мин при длинах волн 495 и 520 нм для возбуждения и испускания соответственно. Разница значений интенсивности флуоресценции (в условных единицах, у.е.) в реакционной пробе (F , в присутствии ДНК-мишени или РПА-продукта) и в контрольной пробе (F_0 , в отсутствии ДНК-мишени или РПА-продукта), $F - F_0$, использовалась как характеристика коллатеральной активности CRISPR-нуклеазы Cas12a. Для визуальной детекции коллатеральной активности нуклеазы пробирку с реакционной пробой через 2 ч после добавления аликвоты РПА-пробы помещали на трансиллюминатор Dark Reader DR22A (“Clare Chemical

Research”, USA) с длиной волны света в интервале 400–500 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время наиболее распространенная схема очистки рекомбинантной CRISPR-нуклеазы Cas12a после ее гетерологической экспрессии в клетках *E. coli* включает аффинную металл-хелатную хроматографию, за которой следует энзиматическое удаление N-концевых последовательностей (6xHis-tag, MBP) за счет расщепления по сайту узнавания TEV-протеазы с последующей гель-фильтрацией для выделения транкированного белка (например, [7]). В зависимости от требований к чистоте нуклеазы и особенностей ее дальнейшего использования (например, для работы с клеточными культурами), в схему очистки могут добавляться ионообменная хроматография, очистка на гепаринсефарозе и/или процедура удаления эндотоксинов [17–20]. Одновременно предлагались и упрощенные схемы очистки, однако они продолжали состоять из более чем одной стадии [7, 8].

В предложенной нами схеме получения препарата рекомбинантной CRISPR-нуклеазы Cas12a единственным этапом очистки является металл-хелатная хроматография с использованием гравитационных колонок. Таким образом, исключается необходимость в сложном оборудовании и длительной инкубации раствора белка с TEV-протеазой (как правило, в течение ночи). Согласно базе данных UniProt, молекулярная масса CRISPR-нуклеазы Cas12a составляет 151.9 кДа (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0Q7Q2/entry>). Однако в настоящем исследовании последовательность рекомбинантного белка увеличена на 366 аминокислотных остатка за счет включения аминокислотных последовательностей участков 6xHis-tag, MBP и сайта узнавания TEV-протеазы. В связи с этим ожидаемая масса целевого белка составляет примерно 192 кДа и соответствующая ему на электрофоретической дорожке полоса должна находиться несколько ниже полосы молекулярного маркера с массой 250 кДа (рис. 1, отмечено стрелкой I). Как видно из рис. 1, в осветленном гомогенате индуцированных клеток нет доминирующей компоненты, соответствующей теоретически ожидаемой массе CRISPR-нуклеазы Cas12a, и только после хроматографической очистки происходит обогащение целевым белком, связавшимся с аффинным матриксом. Масс-спектрометрический анализ пептидов, экстрагированных из участка геля, содержащего полосу с ожидаемым рекомбинантным белком, позволил идентифицировать его как CS12A_FRATN из организма *Francisella tularensis* subsp. *novicida* (штамм U112, идентификатор A0Q7Q2). Таким образом, было подтверждено, что элюат содержит целевой продукт. В связи с присутствием в элюате белковых загрязнений его концентрация не

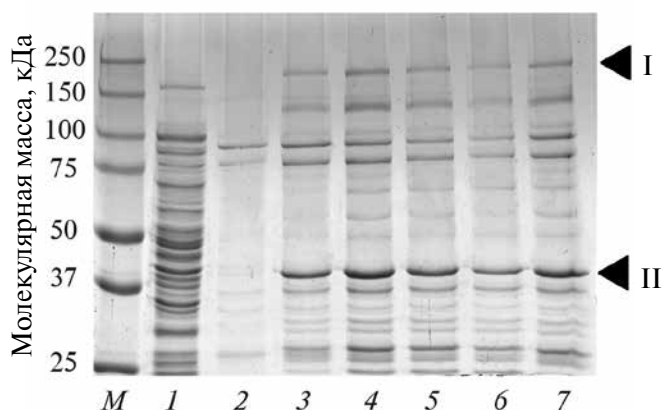


Рис. 1. Электрофорез в ПААГ гомогената клеток *E. coli*, экспрессирующих рекомбинантную CRISPR-нуклеазу Cas12a, и фракций элюата, полученных при очистке целевого белка металл-хелатной хроматографией на колонках Protino Ni-TED1000: M — маркеры молекулярных масс, 1 — гомогенат клеток, 2–6 — фракции элюата, 7 — объединенные фракции после диализа. Целевой белок показан стрелкой I, основного белок-загрязнитель — стрелкой II.

может быть точно определена колориметрическими (спектрофотометрическими) методами измерения количества белка. По этой причине количество целевого белка в пробах оценивали с помощью денситометрии гелей после электрофоретического анализа элюата, сопоставляя площади пиков, соответствующих белковым полосам на геле, используя растворы БСА известной концентрации в качестве стандартов.

Основным загрязнителем, элюирующимся вместе с целевым белком, является белок с молекулярной массой около 40 кДа (отмечен стрелкой II на рис. 1). С помощью масс-спектрометрического анализа данный белок был идентифицирован как Lactose operon repressor (LACI_ECOLI). Он является одним из компонентов системы индукции экспрессии рекомбинантных белков в *E. coli* и “классическим загрязнителем” при их очистке методом металл-хелатной хроматографии [21]. Поскольку функциональная активность данного белка не имеет нуклеазного характера, его присутствие не должно оказывать влияния на функциональную активность CRISPR-нуклеазы Cas12a.

Оценка функциональной активности полученных препаратов рекомбинантной CRISPR-нуклеазы Cas12a и подбор оптимального соотношения нРНК и белка проводились с использованием синтетической ДНК-мишени FR-T (табл. 1) длиной 65 пар оснований (п.о.) и нРНК со спейсером, комплементарным последовательности в мишени (получена с использованием ДНК-матрицы FR-G, табл. 1). Последовательность мишени представляла собой участок генома бактерии *Francisella tularensis* ssp. *novicida* U112, использованный ранее как

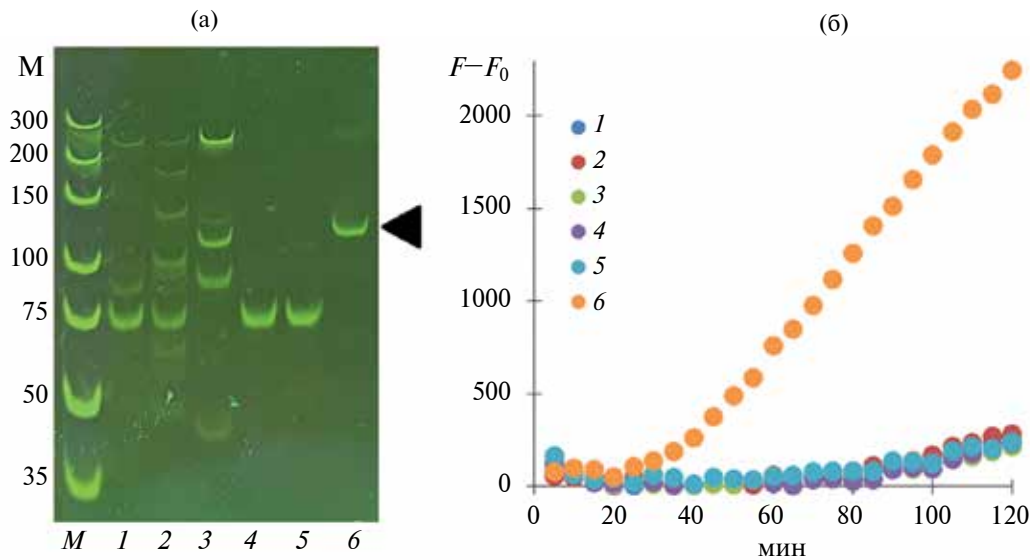


Рис. 2. Результаты электрофоретического анализа продуктов РПА для штаммов фитопатогенов (табл. 2) (а) и тестирование продуктов РПА комплексом нРНК/Cas12a (б): М — ДНК-стандарты, 1 — *P. carotovorum* ssp. *carotovorum*, 2 — *P. odoriferum*, 3 — *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus*, 4 — *P. brasiliense* (штамм 466), 5 — *P. brasiliense* (штамм 497), 6 — *D. solani*. Геномная ДНК 0.5 пг на РПА-пробу. Целевой продукт амплификации указан стрелкой. б — Характерные зависимости разницы флуоресценций пробы с добавлением продуктов РПА и контрольной пробы без добавления продуктов РПА ($F - F_0$, у.е.) от времени инкубации (мин). (1 мкл РПА-пробы на тест-пробу с нРНК-3/Cas12a. Концентрация нРНК-3 — 30 нМ, концентрация Cas12a — 30 нМ.)

мишень при тестировании функциональной активности рекомбинантной CRISPR-нуклеазы Cas12a в работе [7] в виде вставки в плазмиду pUC19. Для подбора оптимального молярного отношения нРНК/Cas12a концентрацию нРНК варьировали при постоянных концентрациях нуклеазы (30 нМ) и мишени (50 нМ). Значительная коллатеральная активность детектировалась уже при отношении нРНК/Cas12a = 1 : 10, достигая максимума при соотношении 1 : 1 (кинетика изменения флуоресценции Cas12-FQ-репортеров представлена на рис. S1 дополнительных материалов). При дальнейшем повышении концентрации нРНК (до нРНК/

Cas12a = 2 : 1) кинетика изменения флуоресценции незначительно замедлялась (рис. S1). Следует отметить, что подобный эффект замедления кинетики наблюдался ранее и для рекомбинантной CRISPR/Cas-нуклеазы Cas13a [22]. Основываясь на полученных результатах, все дальнейшие эксперименты выполняли при молярном отношении нРНК/Cas12a = 1 : 1.

Для РПА-детекции *D. solani* были выбраны праймеры, предложенные в работе [15] (SOL-C-RPA-F и SOL-C-RPA-R, табл. 1). Праймеры узнают участок региона SOL-C в геноме *D. solani* (принадлежащий неаннотированному гену)

Таблица 1. Последовательности ДНК-олигонуклеотидов, использованных в работе*

Название	Последовательность (5' → 3')
SOL-C-RPA-F	CCATTTAAGAGCCTACACCATCAGGGCTAT
SOL-C-RPA-R	GTTTGGACACTACAGCGGCATAAACTGGA
T7F	TAATACGACTCACTATAGGG
Cas12-FQ	(6-FAM) — TTATTATT — (BHQ-1)
FR-T-F	GGTACCCGGGGATCCTTTAGAGAAGTCATTTAATAAGGCCACTGTTAAAAAGCTTGCGGTAATCA
FR-T-R	TGATTACGCCAAGCTTTTAAACAGTGGCCTTATTAATGACTTCTCTAAAGGATCCCCGGGTACC
FR-G	AGTGGCCTTATTAATGACTTCTCATCTACAACAGTAGAAATTCCTTATAGTGAGTCGTATTA
DS-G1	AGCGCGCATAAACTGGAGCGTACACATCTACAACAGTAGAAATTCCTTATAGTGAGTCGTATTA
DS-G2	GCACGGCCTGGGCCCCAAATGCAAGATCTACAACAGTAGAAATTCCTTATAGTGAGTCGTATTA
DS-G3	TGCATTTGGGGCCCAGGCCGTGCTCATCTACAACAGTAGAAATTCCTTATAGTGAGTCGTATTA

* Курсивом дана последовательность, комплементарная последовательности T7-промотора; полужирным шрифтом выделены последовательности протоспейсера синтетической ДНК-мишени и последовательности в ДНК-матрицах, кодирующие последовательности спейсера в направляющей РНК.

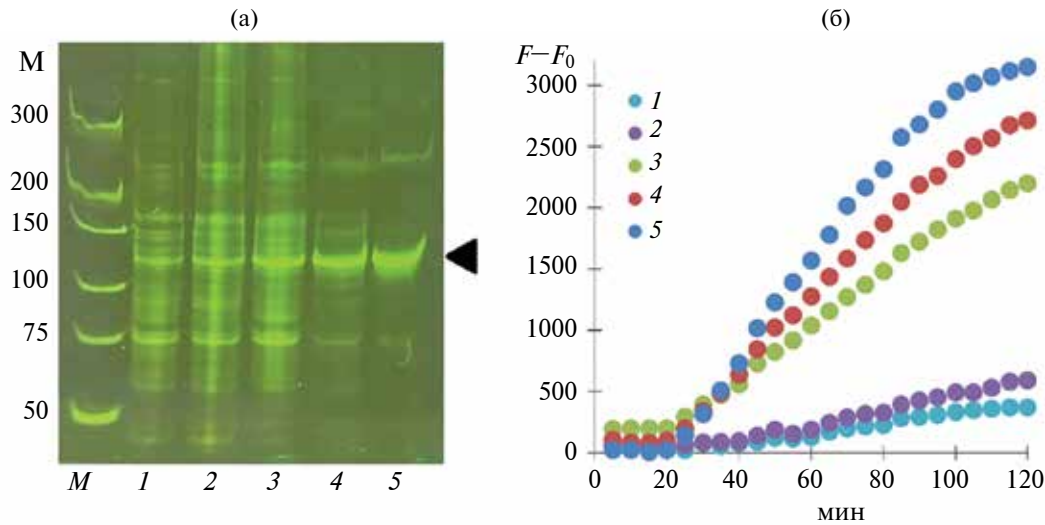


Рис. 3. Результаты электрофоретического анализа продуктов РПА для различного количества бактериальных геномов *D. solani* в присутствии 1 нг ДНК картофеля (а) и тестирования продуктов РПА комплексом нРНК-3/Cas12a (б): *M* — ДНК-стандарты, *1–5* — количество копий бактериальных геномов на РПА-пробу 1, 10, 100, 1000 и 10000 соответственно. Целевой продукт амплификации указан стрелкой. б — Характерные зависимости разницы флуоресценции пробы с добавлением продуктов РПА и контрольной пробы без добавления продуктов РПА ($F-F_0$, у.е.) от времени инкубации (мин). (1 мкл РПА-пробы на тест-пробирку с нРНК/Cas12a. Концентрация нРНК-3 — 30 нМ, концентрация Cas12a — 30 нМ).

и основываются на последовательности праймеров, разработанных в работе [12] для ПЦР-детекции данного фитопатогена. При проведении РПА с геномной ДНК *D. solani* в качестве матрицы использование пары SOL-C-RPA-F/SOL-C-RPA-R приводило к появлению фрагментов ДНК только ожидаемого размера (117 п.о. [15]), что видно из результатов электрофоретического анализа продуктов амплификации (рис. 2а). Однако образцы геномной ДНК, полученной из штаммов близкородственных (виды рода *Pectobacterium* sp.) и неродственных (*Cms*) бактерий, представленных в табл. 2, также дали продукты при проведении РПА с данной парой праймеров, хотя среди них и не было ампликонов с размером 117 п.о. (рис. 2а). В случае сопряжения РПА с экспресс-детекцией колориметрическими методами или с помощью тест-полоски появление нецелевых ампликонов приведет

к ложноположительному результату. Таким образом, праймеры SOL-C-RPA-F и SOL-C-RPA-R, по-видимому, не могут обеспечить специфическую детекцию *D. solani* в общем случае, хотя нельзя исключить, что при оптимизации времени проведения изотермической амплификации можно добиться большей селективности. Однако при работе с образцами с неизвестной композицией фитопатогенных бактерий такая оптимизация может оказаться недостаточной для обеспечения требуемой селективности детекции.

Для комбинирования РПА с детекцией целевых ампликонов рекомбинантной CRISPR-нуклеазой Cas12a были тестированы три последовательности нРНК, кодируемые ДНК-матрицами DS-G1, DS-G2 и DS-G3 (табл. 1). Коллатеральная активность CRISPR-нуклеазы Cas12a в комплексе

Таблица 2. Бактериальные штаммы, использованные в работе

Таксономическое название штамма	Источник	Номер по каталогу источника
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> (Jones 1901) Hauben et al., 1999	Б**	B-1247
<i>Pectobacterium odoriferum</i> (Gallois et al. 1992) Portier et al., 2019	А*	1557
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> (Spieckermann and Kotthoff 1914) Davis et al., 1984	Б**	Ac-1405
<i>Pectobacterium brasiliense</i> Portier et al., 2019	А*	466 497
<i>Dickeya solani</i> (van der Wolf et al., 2014)	А*	1C3

* А — Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, **Б — ВКМ (Пушкинский научный центр биологических исследований РАН).

с нРНК определялась после добавления в реакционную смесь 1 мкл продуктов РПА (без очистки), полученных для геномной ДНК *D. solani* как матрицы. Полученные результаты (рис. S2) показали, что комплекс CRISPR-нуклеазы Cas12a с нРНК-3 (синтезирована на ДНК-матрице DS-G3, табл. 1) обеспечивает значительно более высокий уровень ее коллатеральной активности по сравнению с нРНК-1 и нРНК-2. Наиболее вероятной причиной наблюдаемой вариации уровня коллатеральной активности может быть образование различных вторичных структур молекулами нРНК, что сказывается как на формировании комплекса с CRISPR-нуклеазой, так и на эффективности связывании спейсера с протоспейсером. Анализ вторичной структуры нРНК с помощью интернет-ресурса OligoAnalyzer (<https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) не выявил очевидных различий в структурах, формируемых тестируемыми нРНК. Это однозначно указывало на то, что теоретически подобранные последовательности нРНК нуждались в обязательной экспериментальной проверке.

По результатам тестирования для дальнейшей работы была выбрана нРНК-3, проявившая наибольшую эффективность. Как видно из рис. 2б, добавление аликвоты РПА-пробы в реакционную смесь с комплексом нРНК-3/Cas12a позволило однозначно детектировать присутствие целевых ампликонов, при этом нецелевые РПА-продукты не активировали нуклеазу. Таким образом, сопряжение РПА с CRISPR-нуклеазой Cas12a, полученной очисткой одностадийной металл-хелатной хроматографией, позволило обеспечить требуемую селективность детекции *D. solani*.

Другим важным вопросом комбинирования РПА с селективной детекцией целевых ампликонов CRISPR-нуклеазой Cas12a была чувствительность детекции. На рис. 3а представлен результат электрофоретического анализа продуктов, получаемых в результате амплификации при различном количестве бактериальной ДНК в РПА-пробе в присутствии 1 нг ДНК картофеля. Количество бактериальной ДНК было пересчитано в количество бактериальных геномов, исходя из размера генома *D. solani* (4.9 млн п.о. [23]) и средней молекулярной массы нуклеотида 325 г/моль. Как можно видеть, по мере понижения количества бактериальной ДНК возрастало количество нецелевых продуктов амплификации. Тем не менее анализ аликвоты РПА-пробы комплексом нРНК-3/Cas12a (рис. 3б) позволил однозначно детектировать присутствие целевых ампликонов (не наблюдалось разницы между флуоресценцией после добавления 1 мкл контрольной пробы и РПА-пробы, содержащей нецелевые продукты амплификации, получаемые в присутствии только ДНК картофеля — данные не показаны). Однако, как видно из рис. 3б, кинетика флуоресценции значительно

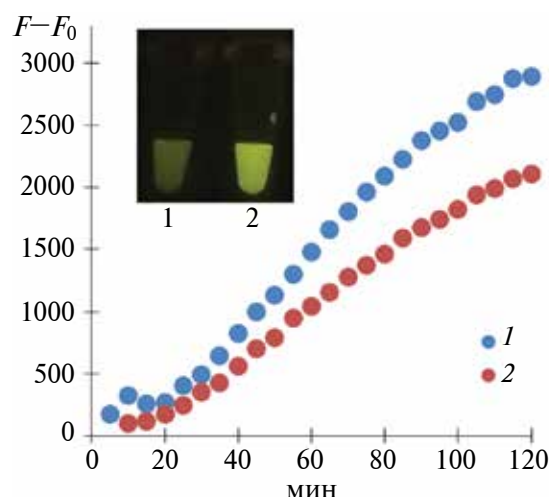


Рис. 4. Характерные зависимости разницы флуоресценции пробы с добавлением продуктов РПА и контрольной пробы без добавления продуктов РПА ($F - F_0$, у.е.) от времени инкубации (мин): 1 и 2 — концентрации CRISPR-нуклеазы Cas12a 90 и 150 нМ соответственно. Молярное отношение нРНК-3/Cas12a = 1. (1 мкл РПА-пробы на тест-пробу с нРНК-3/Cas12a. 1 копия бактериального генома на РПА-пробу). На врезке: 1 — контрольная проба, 2 — проба как на кривой 2 рис. 4. Облучение синим светом (400–500 нм), оранжевый светофильтр.

замедлялась в случае аликвот РПА-пробы, в которую бактериальная ДНК вносилась в количестве 0.005 или 0.05 пг на пробу (1 и 10 бактериальных геномов соответственно). При этом присутствие целевых ампликонов все еще можно детектировать визуально на электрофореграммах (рис. 3а, дорожки 1 и 2). Таким образом, не наблюдалось однозначного увеличения чувствительности детекции *D. solani* при сопряжении РПА с определением целевых ампликонов CRISPR-нуклеазой Cas12a по сравнению с электрофоретическим анализом. Вместе с тем следует отметить, что электрофоретический анализ продуктов амплификации не может быть адаптирован к требованиям полевой ДНК-диагностики, тогда как визуальная детекция проявления коллатеральной активности CRISPR-нуклеазой Cas12a (по появлению желто-зеленой окраски пробы из-за флуоресценции FAM при освещении синим светом с длиной волны 400–500 нм) принципиально возможна [5].

Можно ожидать, что чувствительность детекции повысится, если увеличить объем аликвоты РПА-пробы (количество ДНК-мишени), добавляемой в реакцию с CRISPR/Cas-нуклеазой. Действительно, уровень коллатеральной активности CRISPR-нуклеазы Cas12a (который оценивался по величине начальной скорости роста флуоресценции, рис. S2) возрастал, но только до объема аликвоты РПА-пробы 1 мкл, выходя на плато при больших объемах (рис. S3). Такой же выход на плато наблюдался

и при добавлении аликвоты РПА-пробы, в которую бактериальная ДНК вносилась в количестве 0.5 пг (100 копий генома на пробу). Неожиданным результатом было то, что при добавлении 9 мкл РПА-пробы наблюдалось замедление кинетики роста флуоресценции (рис. S3). Наиболее вероятная причина этого — присутствие в буфере РПА-пробы компонентов, ингибирующих активность CRISPR-нуклеазы Cas12a.

Повышение чувствительности детекции можно было ожидать с ростом концентрации комплексов нРНК-3/Cas12a. Повышение концентрации CRISPR-нуклеазы Cas12a до 90 и 150 нМ действительно приводило к значительному увеличению скорости расщепления репортеров (рис. 4) при том же объеме аликвоты РПА-пробы с количеством бактериальной ДНК 0.005 пг (кривая 1, рис. 3б). Отметим, что при концентрации CRISPR-нуклеазы Cas12a 150 нМ наблюдалась несколько более медленная кинетика, чем при 90 нМ (рис. 4), следовательно дальнейшее повышение концентрации нуклеазы не улучшит чувствительность детекции. Следует отметить, что достигаемый при этом уровень флуоресценции позволял детектировать коллатеральную активность CRISPR-нуклеазы Cas12a и, соответственно, присутствие целевых ампликонов в РПА-пробе визуальным изменением интенсивности окраски реакционной пробы при ее освещении синим светом с длиной волны 400–500 нм (вставка на рис. 4).

Таким образом, препараты рекомбинантной CRISPR-нуклеазы Cas12a с мишень-зависимой коллатеральной активностью нуклеазы могут быть получены после гетерологической экспрессии в *E. coli* с помощью простой одностадийной очистки металл-хелатной хроматографией. Функциональные свойства CRISPR-нуклеазы Cas12a в данных препаратах таковы, что позволяют использовать их в технологии DETECTR при разработке высокоселективных тестов для полевой ДНК-диагностики различных патогенов, как показано на примере детекции бактериального фитопатогена *D. solani*. Комбинирование CRISPR-нуклеазы Cas12a, полученной по упрощенной схеме очистки, с рекомбиназной полимеразной амплификацией участка региона SOL-C генома *D. solani* позволило достичь высокой селективности детекции в отношении близкородственных и неродственных фитопатогенов с пределом обнаружения 1 копия генома *D. solani* в реакционной пробе. Результат может быть определен визуально, без использования сложных инструментальных методов, по изменению окраски реакционной пробы при освещении синим светом, что создает основу для разработки полевой ДНК-диагностики данного фитопатогена. Применение одностадийной хроматографической очистки приводит к существенному снижению времени и ресурсов, необходимых для

получения функционально активной CRISPR-нуклеазы Cas12a для разработки и производства подобных ДНК-диагностик на основе технологии DETECTR.

Авторы выражают благодарность сотрудникам ИБМХ им. В. Н. Ореховича И. Ю. Торопыгину и М. А. Константинову за помощь в проведении масс-спектрометрического анализа.

В работе использовалось оборудование ЦКП «Протеом человека» ИБМХ им. В. Н. Ореховича.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 годы (соглашение № 075-15-2021-1345, уникальный идентификатор проекта RF193021X0012).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kaminski M. M., Abudayyeh O. O., Gootenberg J. S., Zhang F., Collins J. J. // Nat. Biomed. Eng. 2021. V. 5. № 7. P. 643–656.
2. Fapohunda F. O., Qiao S., Pan Y., Wang H., Liu Y., Chen Q., Lü P. // Microbiol. Res. 2022. V. 259. P. 127000. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127000>
3. Gootenberg J. S., Abudayyeh O. O., Lee J. W., Essletzbichler P., Dy A. J., Joung J. et al. // Science. 2017. V. 356. № 6336. P. 438–442.
4. Chen J. S., Ma E., Harrington L. B., Da Costa M., Tian X., Palefsky J. M., Doudna J. A. // Science. 2018. V. 360. № 6387. P. 436–439.
5. Yuan B., Yuan C., Li L., Long M., Chen Z. // Molecules. 2022. V. 27. № 20. P. 6999. <https://doi.org/10.3390/molecules27206970>
6. Lobato I. M., O'Sullivan C. K. // Trends Analyt. Chem. 2018. V. 98. P. 19–35.
7. Zetsche B., Gootenberg J. S., Abudayyeh O. O., Slaymaker I. M., Makarova K. S., Essletzbichler P. et al. // Cell. 2015. V. 163. № 3. P. 759–771.
8. Chen J., Huang Y., Xiao B., Deng H., Gong K., Li K., Li L., Hao W. // Front Microbiol. 2022. V. 13. P. 842415. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.842415>
9. Курбатов Л. К., Радько С. П., Кравченко С. В., Киселёва О. И., Дурманов Н. Д., Луцица А. В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. № 6. P. 587–594.
10. van der Wolf J. M., Nijhuis E. H., Kowalewska M. J., Saddler G. S., Parkinson N., Elphinstone J. G. et al. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2014. V. 64. № 3. P. 768–774.
11. Toth I. K., van der Wolf J. M., Saddler G., Lojkowska E., Helias V., Pirhonen M. et al. // Plant Pathol. 2011. V. 60. № 3. P. 385–399.
12. Pritchard L., Humphris S., Saddler G. S., Parkinson N. M., Bertrand V., Elphinstone J. G., Toth I. K. // Plant Pathol. 2013. V. 62. № 3. P. 587–596.
13. Humphris S. N., Cahill G., Elphinstone J. G., Kelly R., Parkinson N. M., Pritchard L., Toth I. K., Saddler G. S. // Methods Mol. Biol. 2015. V. 1302. P. 1–16.

14. Van Vaerenbergh J., Baeyen S., De Vos P., Maes M. // PloS One. 2012. V. 7. № 5. P. e35738. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035738>
15. Ivanov A. V., Safenkova I. V., Drenova N. V., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. // Mol. Cell. Probes. 2020. V. 53. P. 101622. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2020.101622>
16. Suprun E. V., Khmeleva S. A., Kutdusova G. R., Ptitsyn K. G., Kuznetsova V. E., Lapa S. A. et al. // Electrochem. Commun. 2021. V. 131. P. 107120. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2021.107120>
17. Murugan K., Seetharam A. S., Severin A. J., Sashital D. G. // J. Biol. Chem. 2020. V. 295. P. 5538–5553.
18. Mohanraju P., Oost J., Jinek M. Swarts D. // Bio-protocol. 2018. V. 8. P. e2842. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2842>
19. Moreno-Mateos M. A., Fernandez J. P., Rouet R., Vejnar C. E., Lane M. A., Mis E. et al. // Nat. Commun. 2017. V. 8. № 1. P. 2024. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01836-2>
20. Tran M. H., Park H., Nobles C. L., Karunadharma P., Pan L., Zhong G., Wang H. et al. // Mol. Ther. Nucleic Acids. 2021. V. 24. P. 40–53.
21. Owens R.M., Grant A., Davies N., O'Connor C.D. // Protein Expr. Purif. 2001. V. 21. № 2. P. 352–360.
22. Kurbatov L. K., Radko S. P., Khmeleva S. A., Timoshenko O. S., Lisitsa A. V. // Biomed. Chem. Res. Meth. 2022. V. 5. № 4. P. e00177. <https://doi.org/10.18097/BMCRM00177>
23. Khayi S., Blin P., Chong T. M., Robic K., Chan K. G., Faure D. // Genome Announc. 2018. V. 6. № 4. P. e01447–17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01447-17>

Application of Detectr for Selective Detection of Bacterial Phytopathogen *Dickeya solani* Using Recombinant CRISPR-Nuclease Cas12a Obtained by Single-Stage Chromatographic Purification

L. K. Kurbatov^{a,*}, S. P. Radko^{a,b,}, S. A. Khmeleva^a, K. G. Ptitsyn^a, O. S. Timoshenko^a, and A. V. Lisitsa^{a,b}**

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

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

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

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

The work demonstrates that recombinant CRISPR-nuclease Cas12a, purified after heterologous expression with a simplified method using single-stage metal-chelate chromatography, can be successfully utilized in DETECTR technology. The combination of CRISPR-nuclease Cas12a obtained by such way with recombinase polymerase amplification (RPA) allowed one to ensure the selectivity of detection of *Dickeya solani* — the dangerous bacterial phytopathogen causing the potato disease known as “blackleg” — against closely related and unrelated bacterial phytopathogens with a limit of detection of 1 copy of the bacterial genome per amplification reaction. The result can be determined visually, without the use of complex instrumental methods, by changing the color of the reaction sample when illuminated with blue light that creates the basis for development of field DNA diagnostics of *D. solani*. The use of simplified chromatographic purification will significantly reduce the time and resources required to obtain a functionally active CRISPR-nuclease Cas12a for development and production of DNA diagnostics based on DETECTR technology.

Keywords: CRISPR-nuclease Cas12a, DETECTR, phytopathogen, *Dickeya solani*

УДК 577.151.6

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ПРОМОТОРОВ ДЛЯ ПРОДУКЦИИ СЕКРЕТИРУЕМОЙ β -МАННАНАЗЫ *Bacillus subtilis* КЛЕТКАМИ МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖЕЙ *Ogataea haglerorum*

© 2024 г. Д. А. Подплетнев¹, А. Р. Лаптева¹, С. П. Синеокий¹, М. Г. Тарутина^{1, 2, *}

¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123182, Россия

²Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”,
Курчатовский геномный центр, Москва, 123182, Россия

*e-mail: m_tarutina@mail.ru

Поступила в редакцию 06.06.2023 г.

После доработки 09.08.2023 г.

Принята к публикации 31.08.2023 г.

Сильные и строго регулируемые промоторы являются мощным инструментом для создания высокопродуктивных штаммов-продуцентов рекомбинантных белков. Чтобы расширить потенциал системы экспрессии *Ogataea haglerorum*, природные метанол-индуцируемые промоторы генов *OhMOX* и *OhFMD* и конститутивный промотор гена *OhGAP* были изучены в сравнении с промотором гена *OpMOX* из дрожжей *O. polymorpha*. В качестве репортерного использовали ген *MANS*, кодирующий рекомбинантную β -манназу. При культивировании трансформантов *O. haglerorum*, содержащих ген *MANS* под контролем промоторов *pOhMOX*, *pOhFMD*, *pOhGAP* из *O. haglerorum* и *pOpMOX* из *O. polymorpha*, активность β -манназы в супернатанте составила 170, 93, 89 и 100% соответственно. По результатам ПЦР в реальном времени в клетках дрожжей *O. haglerorum* промотор *pOhMOX* обеспечивал более высокий уровень экспрессии гена *MANS*, чем промотор *pOpMOX* из дрожжей *O. polymorpha*. Полученные сведения о силе промоторов из дрожжей *O. haglerorum* могут быть полезны при конструировании продуцентов рекомбинантных белков и оптимизации путей метаболизма в дрожжах *O. haglerorum*.

Ключевые слова: *Ogataea haglerorum*, промоторы, термотолерантные метилотрофные дрожжи, β -манназа

DOI: 10.31857/S0555109924010038, **EDN:** HCWDFE

Метилотрофные дрожжи родов *Komagataella* (*Pichia*) и *Ogataea* (*Hansenula*) широко используются для продукции рекомбинантных белков благодаря их способности достигать высокой плотности клеток при культивировании в минимальной среде в биореакторе и наличию сильных промоторов для эффективной экспрессии гетерологичных генов. Термотолерантные дрожжи рода *Ogataea* применяются для получения белков при повышенной температуре, 37°C и выше, что позволяет снизить вероятность контаминации, длительность ферментации, а также затраты на охлаждение биореактора [1].

Метилотрофные дрожжи используют общий путь метаболизма метанола. Первый фермент этого пути окисляет метанол до формальдегида и перекиси водорода. В дрожжах рода *Ogataea* этот этап контролируется метанолюксидазой, кодируемой геном *MOX*. Регуляция экспрессии гена *MOX* осуществляется на уровне транскрипции. Во время роста дрожжей на метаноле доля метанолюксидазы составляет 30–40% от клеточного белка [2], поэтому промотор гена *MOX* (*pMOX*) является

одним из наиболее сильных индуцируемых промоторов, широко используемых в системе экспрессии *O. polymorpha*. При использовании промотора *pMOX* получен широкий ассортимент белковых препаратов, например частицы антигена вируса гепатита В человека [3], белки ротавируса VP6 [4], папилломовируса HPV-16 [5], человеческий сывороточный альбумин [6], в последнем случае выход продукта в ферментере достигал 5.1 г/л. Другой сильный метанол-индуцируемый промотор, который используют для экспрессии гетерологичных генов в дрожжах *O. polymorpha*, — промотор гена *FMD*, кодирующего формилдегидрогеназу. Показано, что штаммы-продуценты *O. polymorpha*, содержащие под контролем промотора *pFMD* ген глюкоамилазы из *Schwanniomyces occidentalis* [7] или ген *CON* фитазы [8], продуцируют, соответственно, 1.4 или 13.49 г/л целевого фермента при культивировании в ферментере.

Промоторы эукариот, как правило, имеют больший размер, чем промоторы прокариот, и содержат коровый элемент (core) и специфические

регуляторные последовательности — UAS (upstream activation sequences) и URS (upstream repressing sequence). Коровый элемент ТАТА-бокс — это сайт связывания ТАТА-связывающего белка (ТВР), субъединицы транскрипционного фактора TFIID, включенного в процесс инициации транскрипции [9]. Последовательности UAS и URS — *cis*-действующие элементы — представляют собой сайты связывания с транскрипционными факторами, которые усиливают (активатор) или ослабляют (репрессор) силу промотора [10, 11]. Экспериментально было показано, что в 5'-регуляторном регионе промотора гена *MOX* из дрожжей *O. polymorpha* имеются последовательности, которые могут быть идентифицированы как UAS1, UAS2 и URS1 [2].

Механизм, с помощью которого метанол индуцирует транскрипцию генов, участвующих в пути утилизации метанола, не изучен до конца. Исследования в этом направлении проводят обычно на промоторе гена *AOX1* из дрожжей *K. phaffii*. Были идентифицированы позитивные регуляторы промотора *pAOX1* в ответ на метанол — Mxr1p, Mit1p и Prm1 [12, 13], которые не взаимодействуют друг с другом и имеют различные сайты связывания [14].

Альтернативой индуцируемому промоторам являются конститутивные промоторы, под контролем которых синтез рекомбинантных белков осуществляется без применения токсичного метанола. Одним из наиболее сильных конститутивных промоторов является промотор гена *GAP*, кодирующего глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу. Однако сила промотора *pGAP* сильно варьирует в зависимости от источника углерода в среде культивирования, что было показано в дрожжах *P. pastoris* и *O. thermomethanolica* [15, 16]. Промотор *pGAP* применяли, например, для экспрессии человеческого сывороточного альбумина [17] или фитазы [16].

Хотя системы экспрессии на метилотрофных дрожжах рода *Ogataea* хорошо разработаны, появляются новые их представители, потенциал которых не изучен. Вид *Ogataea haglerorum* выделен из дрожжей рода *Ogataea* в 2017 г. в результате проведения комплексного молекулярно-генетического анализа [18]. Для *O. haglerorum* разработаны технологии конструирования штаммов-продуцентов, включая экспрессионный вектор и метод введения ДНК в клетки реципиента [19]. Прежде для экспрессии гетерологичных генов использовали промотор гена *MOX* (*pOpMOX*) из дрожжей *O. polymorpha*. На основе штамма *O. haglerorum* ВКПМ Y-2584 были получены высокопродуктивные штаммы-продуценты β-маннаназы и фитазы, способные продуцировать ферменты при температуре 37°C [20, 21].

Цель данной работы — характеристика промоторов *pOhMOX*, *pOhFMD* и *pOhGAP* из штамма *O. haglerorum* ВКПМ Y-2584 в сравнении с промотором *pOpMOX* из дрожжей *O. polymorpha*.

МЕТОДИКА

Штамм дрожжей *Ogataea haglerorum* (G. I. Naumov, E. S. Naumova, C. F. Lee) ВКПМ Y-2584 получен из коллекции Биоресурсного центра Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ, НИЦ “Курчатовский институт”, Москва, Россия). Для клонирования промоторов и наработки плазмид использовали штамм *E. coli* XL1 blue (“Stratagene”, США).

Дрожжи *O. haglerorum* выращивали на среде YPD (дрожжевой экстракт — 10 г/л, пептон — 20 г/л, глюкоза — 20 г/л) при 37°C.

E. coli XL1 blue выращивали на среде LB (дрожжевой экстракт — 5 г/л, триптон — 10 г/л, NaCl — 5 г/л) при 37°C, при необходимости в среду добавляли ампициллин в концентрации 100 мкг/мл.

Основные генно-инженерные методы работы с ДНК выполнялись согласно методическим указаниям [22]. Хромосомную ДНК из дрожжей выделяли с использованием набора для выделения ДНК из дрожжей (“diaGene”, “Диа-М”, Россия). Правильность сборки всех плазмид проверяли секвенированием на секвенаторе “3500 Genetic Analyzer” (“Applied Biosystems”, “Hitachi”, Япония) в ЦКП НИЦ “Курчатовский институт” (Россия). Названия и последовательности всех использованных в работе праймеров указаны в таблице в Дополнительных материалах 1. Амплификация производилась на амплификаторе Thermal Cycler T100 (“BioRad”, США) с использованием Кара-полимеразы (“KapaBiosystems”, США).

Конструирование плазмид. Вектор pOpMOX-Km (рис. 1a) был сконструирован на основе коммерческого вектора pBluescript II KS+ (X52327, “Stratagene”, США). На его основе были созданы используемые в работе плазмиды pOhMOX-MANS-HARS, pOpMOX-MANS-HARS, pOhFMD-MANS-HARS и pOhGAP-MANS-HARS (рис. 1б), конструирование которых описано ниже.

Первоначально были подобраны праймеры: MOX-up-F и MOX-dn-R для амплификации локуса *MOX* размером 3.8 тыс. п.н. на основе последовательностей GenBank: AEOI02000008 (*O. parapolyomorpha* DL-1) и GenBank: AECK01000003.1 (*O. polymorpha* NCYC495 leu1.1). Праймеры FMD-up-F и FMD-dn-R использовали для амплификации 5'-нетранслируемой области гена *FMD* размером 900 п.н. на основе GenBank: AEOI02000010.1 (*O. parapolyomorpha* DL-1) и AECK01000001.1 (*O. polymorpha* NCYC495 leu1.1); GAP-up-F и GAP-dn-R — для амплификации 5'-нетранслируемой области гена *GAP* размером 800 п.н. на основе последовательностей GenBank: AEOI02000010.1 (*O. parapolyomorpha* DL-1) и AECK01000001.1 (*O. polymorpha* NCYC495 leu1.1). Амплификация производилась с использованием хромосомной ДНК *O. haglerorum* в качестве матрицы.

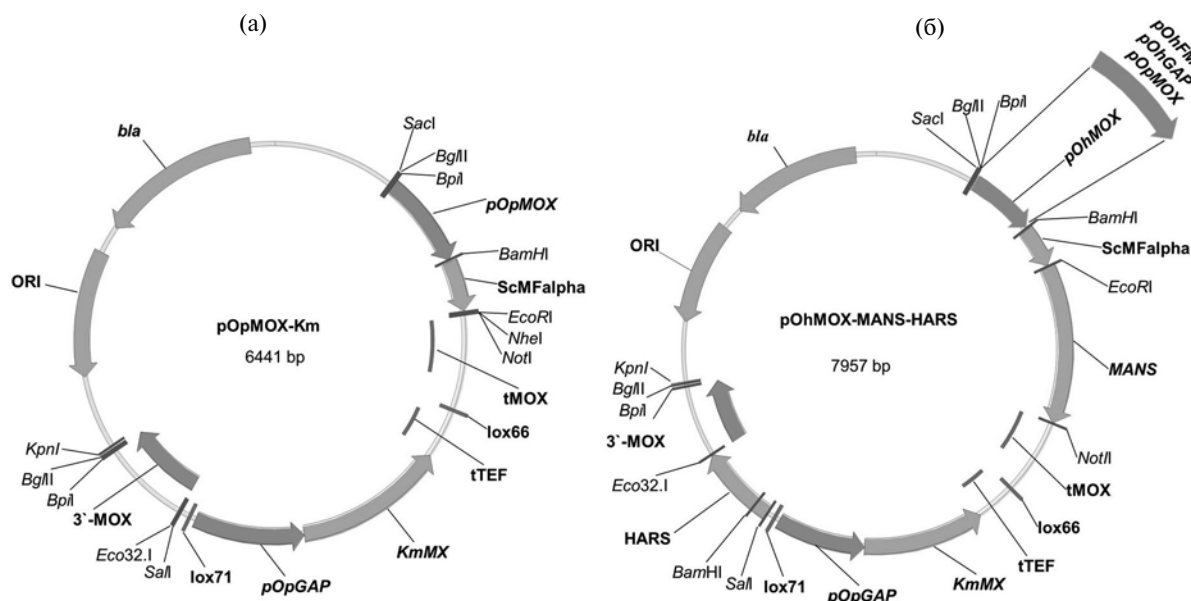


Рис. 1. Схема экспрессионного вектора pOpMOX-Km (а) и плазмиды pOhMOX-MANS-HARS (б). Промоторы *pOhFMD*, *pOhGAP* и *pOpMOX* содержат плазмиды pOhFMD-MANS-HARS (7986 п.н.), pOhGAP-MANS-HARS (8091 п.н.) и pOpMOX-MANS-HARS (7993 п.н.) соответственно.

На основании полученных нуклеотидных последовательностей, в которых при помощи программы AlignX (“Vector NTI”, США) определены содержащие промоторы области, были подобраны праймеры: pMOX-2584-F и pMOX-2584-R для амплификации промотора *pOhMOX* размером 464 п.н.; pFMD2584-F и pFMD2584-MF-R для амплификации промотора *pOhFMD* размером 492 п.н.; pGAP2584-F и pGAP2584-MF-R для амплификации промотора *pOhGAP* размером 603 п.н. Полученные ПЦР-фрагменты встраивали в вектор pOpMOX-Km по сайтам *SacI* и *BamHI* с замещением фрагмента ДНК, содержащего промотор *pOpMOX*.

Далее в вектор по сайтам *EcoRI* и *NotI* встраивали синтетический ген *MANS* (OP897818.1) с оптимизацией кодонов для метилотрофных дрожжей, кодирующий β-маннаназу из *B. subtilis* (КФ 3.2.1.78). Ген *MANS* размером 1032 п.н. был синтезирован в компании ООО “Иннова плюс” (Россия). Затем в вектор по сайтам *Eco32.1* и *SalI* встраивали фрагмент с HARS размером 526 п.н., который амплифицировали с хромосомной ДНК дрожжей *O. hagleorum* с праймеров HARS-F и HARS-R. В результате были получены плазмиды pOhMOX-MANS-HARS, pOpMOX-MANS-HARS, pOhFMD-MANS-HARS и pOhGAP-MANS-HARS (рис. 16).

Трансформация дрожжей *O. hagleorum*. Трансформацию дрожжей *O. hagleorum* осуществляли как описано в работе [23]. Электропорацию проводили с использованием электропоратора GenePulserXcell™ (“Bio-Rad”, США), параметры: 1500 В; 25 мкФ; 200 Ом. Трансформанты отбирали

на плотной среде YPD с добавлением генетицина (G418, “Gibco”, Великобритания) в количестве 200 мкг/мл.

Тест на митотическую стабильность. Трансформанты растили в неселективных условиях (жидкая YPD) в глубоколоночных планшетах Deerwell Plate (“Eppendorf”, Германия) при 37°C в шейкере-инкубаторе Innova 44 (“New Brunswick”, Германия) в течение 24 ч. Затем культуру рассеивали для получения отдельных колоний на чашках Петри с неселективной средой. С помощью репликатора отбирали по 100 независимых колоний и анализировали их на способность расти на средах YPD и YPD с генетицином (200 мкг/мл). Появление колоний, не растущих на среде YPD с генетицином, указывало на то, что плаزمид не интегрирована в геном реципиента и содержится в клетках трансформанта в виде автономно реплицирующейся ДНК.

Изоляция плазмид из трансформантов *O. hagleorum*. Из биомассы трансформантов *O. hagleorum*, выращенных в 2 мл среды YPD с генетицином (200 мкг/мл), выделяли ДНК с использованием набора GeneJet Plasmid Miniprep (“ThermoScientific”, Литва), которой трансформировали клетки *E. coli* XL1 blue. Из одного трансформанта со среды LB с ампициллином выделяли плазмидную ДНК и анализировали размер плазмиды методом электрофореза.

Экспрессия гена *MANS* в дрожжах *O. hagleorum*. Культивирование трансформантов, содержащих ген *MANS* под контролем метанол индуцируемых промоторов, проводили следующим образом. Отдельную колонию засеивали в 5 мл жидкой

селективной среды YPD с генетицином в количестве 200 мкг/мл и выращивали при 37°C в шейкере-инкубаторе Innova 44 в течение 20 ч. Полученным инокулятом засеивали пробирки с 5 мл селективной среды в соотношении 1: 10. Пробирки инкубировали при 37°C и 250 об./мин в течение 120 ч. Метанол (3%) добавляли к культуре через 24 и 48 ч культивирования.

Для культивирования трансформантов, содержащих ген *MANS* под контролем конститутивного промотора *pOhGAP*, инокулятом засеивали пробирки с 5 мл селективной среды в соотношении 1: 10. Пробирки инкубировали при 37°C и 250 об./мин. в течение 72 ч. Глюкозу в количестве 2% добавляли через 24 и 48 ч культивирования. Отсутствие остаточной глюкозы в супернатанте проверяли методом ВЭЖХ на хроматографе Alliance (“Waters”, США) с рефрактометрическим детектором Waters 2414 с использованием колонки YMC-Pack Polyamine II (“YMC”, Япония).

По окончании культивирования биомассу отделяли центрифугированием при 1700 g в течение 10 мин. Супернатант использовали для измерения активности β -маннаназы и анализа ПААГ с ДДС-На, который проводили в 12%-ном полиакриламидном геле в камере для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN Tetra (“Bio-Rad”, США). Для визуализации белков использовали Ку-масси бриллиантовый синий R250.

Определение активности β -маннаназы. Активность β -маннаназы определяли по методу Миллера с динитросалициловой кислотой (ДНС), используя маннозу (“Sigma”, США) в качестве стандарта [24]. В качестве субстрата использовали галактоманнан Locust bean gum from Ceratonia (LBG, “Sigma”, Италия). К 100 мкл 1%-ной суспензии LBG в 0.1 М ацетатном буфере (pH 5.0) добавляли 100 мкл супернатанта, содержащего фермент, и инкубировали при температуре 55°C в течение 10 мин. Затем к реакционной смеси добавляли 300 мкл ДНС, прогревали при 99°C в течение 5 мин. Измеряли содержание образующихся в результате ферментативной реакции редуцирующих сахаров спектрофотометрически при длине волны 540 нм на спектрофотометре Multiskan spectrum (“Thermo scientific”, США). За 1 ед. ферментативной активности β -маннаназы принимали количество фермента, действующего на субстрат с высвобождением 1 мкМ восстанавливающих сахаров (в пересчете на маннозу) за 1 мин в условиях эксперимента. Все измерения проводились трижды.

Выделение РНК и анализ транскрипции гена *MANS* под контролем промоторов *pOhMOX* и *pOpMOX* методом ПЦР в реальном времени. Для выделения РНК посевной культурой засеивали 50 мл селективной среды YP (дрожжевой экстракт — 10 г/л, пептон — 20 г/л) с генетицином (200 мкг/мл), содержащей глюкозу (1%) или

метанол (1%) в колбах на 0.75 л до начальной оптической плотности OD₆₀₀ равной 0.1. Колбы, содержащие среду с метанолом, засеивали и культивировали при 37°C и 250 об./мин. в течение 12 и 20 ч, а среду с глюкозой — 12 ч. Биомассу отделяли от среды центрифугированием при 6000 об./мин. в течение 10 мин и использовали для выделения РНК.

РНК выделяли при помощи набора RNeasy (“Qiagen”, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Полученную тотальную РНК доводили до концентрации 500 нг/мкл, обрабатывали ДНКазой (“Thermo”, Литва) и использовали в качестве матрицы в реакции обратной транскрипции при помощи ревертазы из набора MMLT (“Евроген”, Россия) и Oligo-dT праймеров. Полученную кДНК использовали в качестве матрицы для реакции ПЦР в реальном времени. Амплификацию проводили при помощи набора qPCRMix-HS SYBR (“Евроген”, Россия) на приборе 7500 Fast Real-Time PCR System (“Applied Biosystems”, США). В реакционную смесь добавляли 1 мкл кДНК-матрицы (50 мкг/мл), по 1 мкл раствора каждого из праймеров (10 нМ/мл) и доводили объем до 20 мкл деионизированной водой. Использовали следующую программу ПЦР: 5 мин при 95°C (1 цикл), 30 с при 95°C, 20 с при 65°C и 30 с при 72°C (40 циклов). Определяли величину экспрессии гена *MANS* в образцах по методу *ddCT* [25]. Для амплификации транскриптов гена *MANS* размером 210 п.н. использовали праймеры RT-MANS-F и RT-MANS-R. В качестве референсного гена домашнего хозяйства использовали ген актина (*ACT*) из штамма *O. haglerorum* (нуклеотидная последовательность гена *ACT* указана в Дополнительных материалах 2). Для амплификации транскриптов референсного гена размером 180 п.н. использовали праймеры RT-ACT-F и RT-ACT-R.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ последовательности локуса, кодирующего метанолоксидазу из дрожжей *O. haglerorum*. Основываясь на предположении о консервативности генов, кодирующих пути метаболизма метанола в метилотрофных дрожжах рода *Ogataea*, были подобраны праймеры на основе последовательностей локуса *MOX* из дрожжей *O. polymorpha* NCYC495 leu1.1 и *O. parapolyomorpha* DL-1 из базы данных NCBI. В результате амплификации предположительного локуса *MOX* из *O. haglerorum* был получен ПЦР-фрагмент размером 3.8 т.п.н., нуклеотидная последовательность которого была определена секвенированием. В данной последовательности была определена предположительная открытая рамка считывания метанолоксидазы (*Mox*), кодирующая белок размером 664 аминокислотных остатка, последовательность которого идентична на 99.2% *Mox* из штамма *O. polymorpha* NCYC495 leu1.1 (NCBI: XP_018211707.1) и на 99.7%

```

-946                                     URS                                     -871
GCGACATCTCCAAGAGCTGGGCTGTGTTGAGGATGAGCCGGACGTCGTTAAAGGAGGGCGCCACCAGGCGCCGCTT
-870                                     -795
GCTGATGGCGCGGCGCTCGTCTCGATGTAGAAGGCCTTTTCCAGAGGCAGTCTCGTGAAAAAGTTGCCGACGCTC
-794                                     -719
GGAACCAGCTGCACGAGTCGAGACAATTCCGGGGTGCCTGCTCTGGTCATTTTCGATGTTGTCGTCGATGAGGAGTT
-718   UAS2                                     -643
CGAGGTCGTGGGAAGATTTCTGCGTAGCGGCGTTTTCGCTCAGAGTTCACCATGAGGTCGTCACGGCGGAGATGCC
-642                                     -567
GTTGCTCTTCACCGCGTACAGGACGAACGGCGTGGCCAGCAGGCCTTTGATCCACTCTATGAGCCCGTCACGACGG
-566                                     -491
TGCTCCTTGAGCGCGTACTCCACTCTGTAGCGACTAGTCATCGGGGCTGGCTTCCTGCGCTGGGCGTGCTAATTAA
-490                                     UAS1                                     -415
TTGTTGCCGCACCTGTACGGGGTCCCTGCATTCCTTGACCCGCCTCCGAAAATGCACCACTCGCTCTAGCCGTCGCG
-414                                     -339
TAAAACTCGTGAATCTGGCAACTGAGGGGGTCTGCAGCCGCAACCTAACTTCATCGCTTTAGGACGCAGCTGGAG
-338                                     -263
AGCGTCCTGCGAGGCTCCCTGCTCGGGCGTAGCCTACAACGTGACTTTGCCTAAGCGGACGGCCCTCGCTCTGGCT
-262                                     Δ22bp                                     -187
GCTGCGCCTGCTACCAGAACTCGTTCCAGCAGCAGCGGTGTCGGAGTGTCAGTTTCTCCACAGTGCAACTGCGGG
-186                                     -111
TGAGTCCGCCAAAACCTGCTTTTCTTATGCTACCGTGCAGTGACTCCGGCATCCCCAGTTTTTGGCCCTACCTGATC
-110                                     TATA-box                                     -35
ACAGATGGGGTCAAGCGCTGTCGCTAAGTGTACCAGCCGTCCCCACACGGGCCATCTATAAATAGTGCCACCAGTGC
-34                                     -1
ACGGTGGAGCCATCAACCAAAGTACAAAAACAAATG

```

Рис. 2. Последовательность, локализованная перед ATG кодоном гена *OhMOX*. Подчеркиванием выделена область между открытыми рамками считывания соседних генов. Предполагаемые последовательности URS (upstream repressing sequence), UAS1, UAS2 (upstream activator sequences) и TATA-box выделены жирным шрифтом. Предполагаемый сайт связывания с *core*-последовательностью CYCC гомолога Mxr1 выделен курсивом и жирным шрифтом. Стартовый кодон открытой рамки считывания для метанолоксидазы (ATG) выделен жирным шрифтом. Местоположение отсутствующего участка размером 22 п.н. обозначено ломаной линией.

Мох из штамма *O. parapolyomorpha* DL-1 (NCBI: XP_013934137.1). Высокое сходство говорит об обнаружении локуса *OhMOX*. Здесь и далее последовательности исследованных локусов указаны в таблице Дополнительные материалы 2.

Был проведен анализ последовательности размером 946 п.н., локализованной перед ATG кодоном гена *OhMOX*, содержащей промотор *pOhMOX* и регуляторные элементы из *O. haglerorum* (рис. 2). В 5'-области гена *OhMOX* были выявлены предполагаемые регуляторные области URS (upstream repression sequence), две последовательности UAS (UAS1 и UAS2, upstream activation sequence) и предполагаемый TATA-бокс по гомологии с этими элементами, выявленными экспериментальным путем в 5' регуляторном регионе дрожжей *O. polymorpha* [2]. Локализация последовательностей URS (–907 до –883) и TATA-бокса одинакова в дрожжах *O. haglerorum* и *O. polymorpha*, но имеются отличия в нуклеотидной последовательности URS: GGACGTCGTTAAAGGAGGGCGCCAC в дрожжах *O. haglerorum* и GGACGTCGTTGAACGAGGGGGCCAC в дрожжах

O. polymorpha. Консервативные последовательности UAS1 (–460 до –447) и UAS2 (–723 до –709) располагаются ближе к старт-кодону, чем в дрожжах *O. polymorpha*, из них только последовательность UAS1 (TCCTTGACCCGCCT) незначительно отличается от таковой (TCCTTGACCCGCAA) в *O. polymorpha*. В 5'-регионе гена *OhMOX* имеется также консенсус последовательность TGTCAGTTTCTCCACAGTGCA (–215 до –195), содержащая ключевой элемент CYCC (CTCC), которая предположительно является сайтом связывания с белком Mxr1p (methanol expression regulator 1). Транскрипционный фактор Mxr1p является ключевым активатором генов путей метаболизма метанола и биогенеза пероксисом в дрожжах *P. pastoris* [12, 14]. Предполагаемый сайт для связывания с Mxr1p выявлен в промоторе *pOtMOX* дрожжей *O. thermomethanolica* [26]. Предполагается, что Mxr1p является гомологом регуляторного фактора Adr1 из *Saccharomyces cerevisiae*, поскольку эти белки имеют сходство N-конца, а также показано участие Adr1 в активации промотора *pOpMOX* при его использовании в *S. cerevisiae* [27].

Экспрессионная плазмида *pOhMOX-MANS-HARS* содержит промотор *pOhMOX* размером 464 п.н. В качестве промотора была взята последовательность, расположенная между открытой рамкой считывания гена *MOX* и соседним геном, за исключением участка последовательности, содержащего ТАТА-бокс последнего. Было проведено сравнение последовательности промотора *pOhMOX* (464 п.н.), клонированного в плазмиду, с последовательностями промоторного региона генов *MOX* из штаммов *O. polymorpha* (NCYC495 leu1.1), *O. parapolyomorpha* (DL1) и *O. angusta* с использованием программы Clustal Omega (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/). Результаты выравнивания последовательностей представлены в Дополнительных материалах 3. Последовательность промотора *pOhMOX* идентична последовательностям аналогичных промоторов из *O. polymorpha*, *O. parapolyomorpha* и *O. angusta* на 80.0, 82.7 и 80.0% соответственно. В промоторе *pOhMOX* отсутствует участок размером 22 п.н. (ACCAGAGCAGCAGAGGGCCGAT) на расстоянии –236 п.н. от АТГ-кодона и 21 п.н. до предполагаемого сайта связывания транскрипционного регулятора Mxr1p.

Анализ последовательности промоторного региона гена *GAP*, кодирующего глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу из дрожжей *O. haglerorum*. Проанализировали последовательность нуклеотидов размером около 800 п.н., амплифицированную с хромосомной ДНК *O. haglerorum* с использованием праймеров, подобранных на основе консервативных участков локуса *GAP* в штаммах *O. parapolyomorpha* DL-1 и *O. polymorpha* NCYC495 leu1.1. Амплифицированный фрагмент имел высокое сходство с локусом *GAP* из штаммов DL-1 и NCYC495. По аналогии с локусом *MOX* амплифицировали более протяженный участок региона *GAP* (см. Дополнительные материалы 2), содержащий открытую рамку считывания, кодирующую глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу — фермент, состоящий из 335 аминокислотных остатков, который идентичен на 96.7% *Gap* из штаммов *O. polymorpha* NCYC495 leu1.1 (NCBI: XP_018209147.1) и *O. parapolyomorpha* DL-1 (GenBank: AAC08320.1) и на 92.3% *Gap* из штамма *O. thermomethanolica* BCC16875 (GenBank: AGL39758.1).

Сравнение последовательности промотора *pOhGAP* с аналогичными промоторами из родственных организмов *O. polymorpha*, *O. parapolyomorpha* и *O. angusta* не выявило каких-либо существенных структурных различий. Выравнивание последовательностей представлено в дополнительных материалах 3 к статье.

Анализ последовательности промоторного региона гена *FMD*, кодирующего формиатдегидрогеназу из дрожжей *O. haglerorum*. На основе консервативных регионов локуса *FMD* в штаммах *O. parapolyomorpha*

DL-1 и *O. polymorpha* NCYC495 leu1.1 были подобраны праймеры для амплификации 5'-нетранслируемой области гена *FMD* с частью последовательности структурной области гена. В результате был получен ПЦР-фрагмент размером около 900 п.н., содержащий предполагаемый промотор гена *FMD*, кодирующего формиатдегидрогеназу из дрожжей *O. haglerorum*, с высоким сходством к аналогичному региону в родственных штаммах. По аналогии с локусом *MOX* амплифицировали более протяженный участок региона *FMD* (см. Дополнительные материалы 2), содержащий открытую рамку считывания для формиатдегидрогеназы — фермента, состоящего из 362 аминокислотных остатков, который идентичен на 96.1% *Fmd* из штамма *O. polymorpha* NCYC495 leu1.1 (NCBI: XP_018212858.1) и на 97.2% *Fmd* из штамма *O. parapolyomorpha* DL-1 (NCBI: XP_013932954.1).

При сравнении последовательности промотора *pOhFMD* с аналогичными промоторами из родственных организмов *O. polymorpha*, *O. parapolyomorpha* и *O. angusta* было выявлено отсутствие участка размером 18 п.н. от –494 до –476 п.н. относительно последовательности *O. polymorpha*. Выравнивание промоторов представлено в Дополнительных материалах 3.

Экспрессия гена *MANS* под контролем промоторов *pOhMOX*, *pOpMOX*, *pOhFMD* и *pOhGAP*. Плазмидами *pOhMOX-MANS-HARS*, *pOhFMD-MANS-HARS*, *pOhGAP-MANS-HARS* и *pOpMOX-MANS-HARS* (рис. 1, 6), содержащими HARS и различающимися промотором перед геном *MANS* трансформировали дрожжи *O. haglerorum*. Известно, что в дрожжах *O. polymorpha* наличие HARS на плазмиде способствует поддержанию ее в эписомном состоянии [28], а интегративные плазмиды способны выщепляться из генома хозяина, захватывая участки ДНК, функционирующие как HARS и обеспечивающие автономную репликацию рекомбинантных плазмид [29]. В дрожжах *O. polymorpha* плазмиды, содержащие HARS, также могут интегрировать в геномную ДНК [30]. Для проведения исследования нами было отобрано по 12 трансформантов, в клетках которых содержались автономно реплицирующиеся плазмиды, сходные по размеру с исходными плазмидами (см. Дополнительные материалы 4). Подобный подход уже использовался ранее в исследованиях на дрожжах *O. polymorpha* [31, 32]. Эписомная локализация плазмид была подтверждена в тесте на митотическую стабильность. Отобранные трансформанты имели сходные ростовые характеристики: оптическая плотность культуры (OD_{600}) составила 25 ± 2 ед. через 20 ч культивирования в селективной среде в пробирках.

По 12 трансформантов с каждой плазмидой культивировали в пробирках. Определяли активность β -маннаназы в супернатанте. Среднее значение активности β -маннаназы

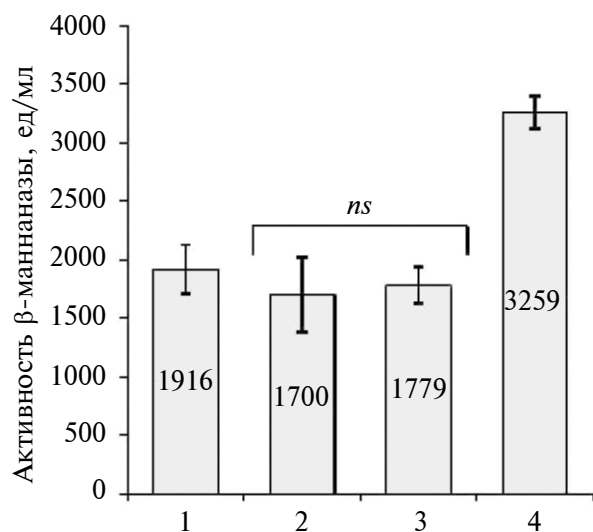


Рис. 3. Уровень активности маннаназы (ед./мл) в образцах с геном *MANS* под контролем промоторов: 1 — *pOpMOX*; 2 — *pOhGAP*; 3 — *pOhFMD*; 4 — *pOhMOX*. Пределы погрешностей показывают стандартное отклонение среднего значения активности 12 трансформантов. $p < 0.05$, ns — несущественное различие.

в супернатанте 12 трансформантов, содержащих плазмиду *pOpMOX*—*MANS*—*HARS* с промотором *pOpMOX*, составило 1900 ед./мл (См. Дополнительные материалы 5). В этих же образцах до индукции метанолом активность β-маннаназы не превышала 20–30 ед./мл. Поскольку конструкции экспрессионных плазмид (рис. 1б) отличаются только промоторной областью, то по разнице в активности

β-маннаназы в супернатанте анализируемых трансформантов можно косвенно судить о силе промоторов. Активность β-маннаназы составляет 170, 93 и 89% в образцах, содержащих плазмиды с промоторами, соответственно, *pOhMOX*, *pOhFMD* и *pOhGAP* из *O. haglerorum* по сравнению с *pOpMOX* из *O. polymorpha* (рис. 3).

Проведение SDS-PAGE электрофореза показало, что β-маннаназы, секретируемая трансформантами *O. haglerorum*, мигрирует в виде двух форм с молекулярной массой около 38 и 40 кДа, возможно из-за разной степени гликозилирования (рис. 4). В последовательности *ManS* имеется один сайт для *N*-гликозилирования согласно программе NetNGlyc 1.0 (www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/). Концентрация β-маннаназы в супернатанте трансформантов с промотором *pOhMOX* выше, чем с другими промоторами, и по количеству секретируемого белка в сторону снижения промоторы можно расположить следующим образом: *pOhMOX*, *pOpMOX*, *pOhFMD*, *pOhGAP*.

Далее исследовали уровень транскрипционной активности гена *MANS*, контролируемого промоторами *pOpMOX* и *pOhMOX*, методом ПЦР в реальном времени (рис. 5). В шести независимых трансформантах с каждым из промоторов определяли изменение экспрессии (количества транскриптов) гена *MANS* после 12 и 20 ч индукции метанолом относительно образцов без индукции. За 100% был принят уровень экспрессии гена *MANS* под контролем промотора *pOpMOX* через 12 ч культивирования в среде с метанолом. Через 20 ч доля транскриптов гена *MANS* с промотора *pOpMOX* увеличилась

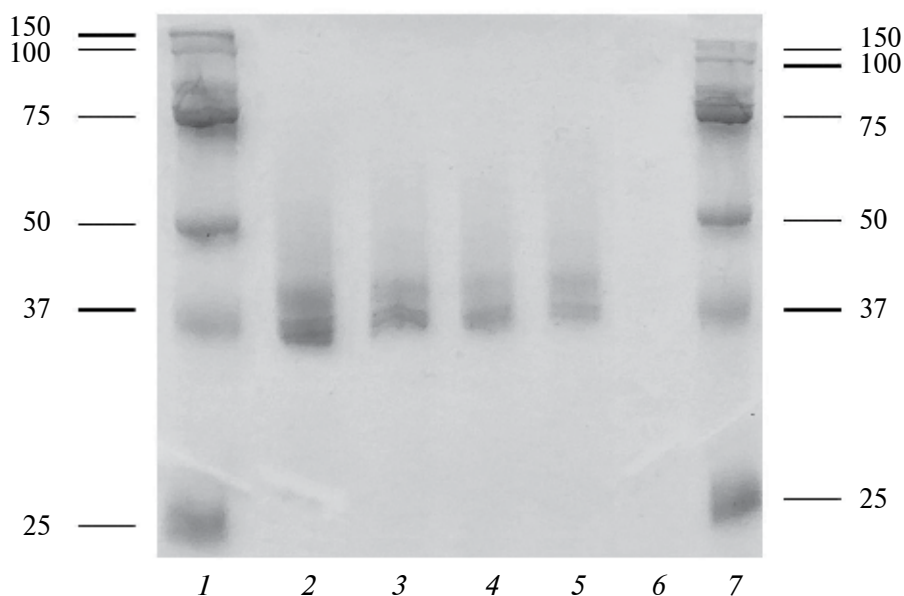


Рис. 4. Электрофорез в ПААГ с ДДС-На рекомбинантной β-маннаназы, секретируемой трансформантами *O. haglerorum*, содержащими плазмиды с промоторами *pOhMOX*, *pOpMOX*, *pOhFMD* и *pOhGAP*. 1, 7 — маркер молекулярной массы, кДа, 2 — *pOhMOX*, 3 — *pOpMOX*, 4 — *pOhFMD*; 5 — *pOhGAP*; 6 — образец с промотором *pOpMOX* в условиях без индукции.

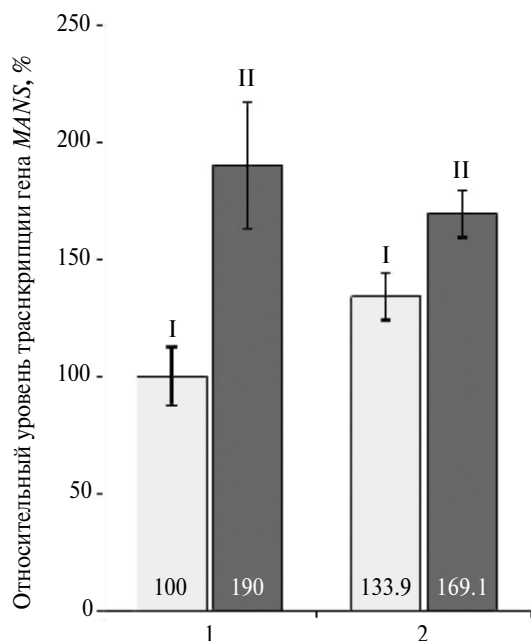


Рис. 5. Относительный уровень транскрипции гена *MANS* (%), находящегося под контролем промоторов *pOhMOX* (II) или *pOpMOX* (I). Показан средний уровень транскрипции гена *MANS* в 6 трансформантах с каждым из промоторов при культивировании в среде с метанолом в течение 12 (1) и 20 ч (2). Уровень транскрипции гена *MANS* под контролем *pOpMOX* через 12 ч индукции принят за 100%. Пределы погрешностей показывают стандартное отклонение для трех независимых экспериментов, $p < 0.05$.

приблизительно на 30%. Уровень транскрипции гена *MANS* с промотора *pOhMOX* оказался выше как через 12 ч, так и 20 ч индукции метанолом. Промотор *pOhMOX* из *O. haglerorum* активнее промотора *pOpMOX* из *O. polymorpha* приблизительно в 1.4–1.9 раз в этих условиях культивирования.

Полученные нами данные свидетельствуют об увеличенной силе промотора *pOhMOX* по сравнению с *pOpMOX* при экспрессии в клетках *O. haglerorum*. Одним из возможных объяснений различий в уровне экспрессии этих промоторов является их структурная организация. Оба промотора, клонированные в плазмиды *pOhMOX*–*MANS*–*HARS* и *pOpMOX*–*MANS*–*HARS*, содержат ТАТА-бокс, предполагаемый сайт связывания с Mxr1 и UAS1 регуляторный элемент, однако в промоторе *pOhMOX* отсутствуют 22 п.н. на расстоянии –236 п.н. от стартового кодона АТГ в непосредственной близости от сайта связывания транскрипционного регулятора Mxr1 (рис. 2). Возможно, отсутствие 22 п.н. приводит к усилению связывания Mxr1 с core-сайтом, повышая силу промотора *pOhMOX* в сравнении с промотором *pOpMOX*.

Результаты сравнения промоторов *pOhMOX* и *pOhFMD* по активности β -маннаназы согласуются

с результатами, полученными Suppi et al., которые исследовали аналогичные промоторы из дрожжей *O. polymorpha* по активности гетерологичной β -глюкуронидазы из *E. coli*. [32]. Также нами показано, что активность конститутивного промотора *pOhGAP* сравнима с активностями индуцируемых промоторов *pOpMOX* и *pOhFMD*, что согласуется с работой Yan et al. [33].

Таким образом, нами были идентифицированы в дрожжах *O. haglerorum* гены *MOX*, *FMD* и *GAP*, определены последовательности соответствующих промоторов, которые были охарактеризованы в сравнении с *pMOX* из *O. polymorpha* на примере активности β -маннаназы, секретируемой из клеток трансформантов *O. haglerorum*. Промоторы *pOhMOX* и *pOpMOX* сравнили также по относительному уровню транскрипции гена *MANS* методом ПЦР в реальном времени, подтвердив, что промотор *pOhMOX* сильнее промотора гена *MOX* из дрожжей *O. polymorpha* в клетках дрожжей *O. haglerorum*. Полученные результаты расширяют спектр знаний о промоторах термотолерантных дрожжей рода *Ogataea* и позволят оптимизировать систему экспрессии метилотрофных дрожжей *Ogataea haglerorum* для продукции рекомбинантных белков.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации: грант Курчатовского центра геномных исследований № 075-15-2019-1659.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abdel-Banat B.M.A., Hoshida H., Ano A., Nonklang S., Akada R. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 85. P. 861–867. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2248-5>
2. Gödecke S., Eckart M., Janowicz Z. A., Hollenberg C. P. // Gene. 1994. V. 139. № 1. P. 35–42. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90520-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90520-7)
3. Xu X., Ren S., Chen X., Ge J., Xu Z., Huang H. et al. // Virologica Sinica. 2014. V. 29. P. 403–409. <https://doi.org/10.1007/s12250-014-3508-9>
4. Bredell H., Smith J. J., Prins W. A., Gorgens J. F., van Zyl W. H. // FEMS Yeast Research. 2016. V. 16. № 2. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow001>
5. Bredell H., Smith J. J., Gorgens J. F., van Zyl W. H. // Yeast. 2018. V. 35. № 9. P. 519–529. <https://doi.org/10.1002/yea.3318>
6. Youn J. K., Shang L., Kim M. I., Jeong C. M., Chang H. N., Hamm M. S. et al. // J. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 20. № 11. P. 1534–1538. <https://doi.org/10.4014/jmb.0909.09046>

7. Gellissen G., Janowicz Z. A., Merckelbach A., Piontek M., Keup P., Weydemann U. et al. // *Bio/Technology*. 1991. V. 9. № 3. P. 291–295.
<https://doi.org/10.1038/nbt0391-291>
8. Mayer A. F., Hellmuth K., Schlieker H., Lopez-Ulibarri R., Oertel S., Dahlems U. et al. // *Biotechnol. Bioeng.* 1999. V. 63. № 3. P. 373–381.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0290\(19990505\)63:3<373::aid-bit14>3.0.co;2-t](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0290(19990505)63:3<373::aid-bit14>3.0.co;2-t)
9. Smale S. T., Kadonaga J. T. // *Annu. Rev. Biochem.* 2003. Vol. 72. № 1. P. 449–479.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161520>
10. Portela R. M. C., Vogl T., Kniely C., Fischer J. E., Oliveira R., Glieder A. // *ACS Synth. Biol.* 2017. V. 6. № 3. P. 471–484.
<https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00178>
11. Bar-Ziv R., Brodsky S., Chapal M., Barkai N. // *Cell Rep.* 2020. V. 30. № 12. P. 3989–3995.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.114>
12. Lin-Cereghino G. P., Godfrey L., de la Cruz B. J., Johnson S., Khuongsathiene S., Tolstorukov I. et al. // *Mol. Cell. Biol.* 2006. V. 26. № 3. P. 883–897.
<https://doi.org/10.1128/MCB.26.3.883-897.2006>
13. Wang X. Wang Q., Wang J., Bai P., Shi L., Shen W., Ca M. // *J. Biol. Chem.* 2016. V. 291. № 12. P. 6245–6261.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.692053>
14. Kranthi B. V., Kumar R., Kumar N. V., Rao D. N., Rangarajan P. N. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. V. 1789. № 6–8. P. 460–468.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2009.05.004>
15. Waterham H. R., Digan M. E., Koutz P. J., Lair S. V., Cregg V. // *Gene*. 1997. V. 186. № 1. P. 37–44. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(96\)00675-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00675-0)
16. Harnpicharnchai P., Promdonkoy P., Sae-Tang K., Roongsawang N., Tanapongpipat S. // *Ann. Microbiol.* 2014. V. 64. P. 1457–1462.
<https://doi.org/10.1007/s13213-013-0765-z>
17. Heo J. H., Hong W. K., Cho E. Y., Kim M. W., Kim J. Y., Kim C. H. et al. // *FEMS Yeast Res.* 2003. V. 4. № 2. P. 175–184.
[https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00150-8](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00150-8)
18. Naumov G. I., Naumova E. S., Lee C. F. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017. V. 67. № 7. P. 2465–2469.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002012>
19. Тарутина М. Г., Каширская М. Д., Лазарева М. Н., Лаптева А. Р., Синецкий С. П. // *Биотехнология*. 2019. Т. 35. № 6. С. 51–56.
20. Патент РФ. 2022. № RU2764793 C1.
21. Патент РФ. 2022. № RU2785901 C1.
22. Sambrook J., Russell D. W. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. / Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
23. Saraya R., Gidijala L., Veenhuis M., van der Klei I. J. // *Methods Mol. Biol.* 2014. P. 43–62.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0563-8_3
24. Miller G. L. // *Anal. Chem.* 1959. V. 31. № 3. P. 426–428.
<https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
25. Livak K. J., Schmittgen T. D. // *Methods*. 2001. V. 25. № 4. P. 402–408.
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
26. Promdonkoy P., Tirasophon W., Roongsawang N., Eurwilaichitr L., Tanapongpipat S. // *Curr. Microbiol.* 2014. V. 69. P. 143–148.
<https://doi.org/10.1007/s00284-014-0568-x>
27. Pereira G. G., Hollenberg C. P. // *Eur. J. Biochem.* 1996. V. 238. № 1. P. 181–191.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0181q.x>
28. Roggenkamp R., Hansen H., Eckart M., Janowicz Z., Hollenberg C. P. // *Mol. Gen. Genet.* 1986. V. 202. P. 302–308.
<https://doi.org/10.1099/00221287-132-12-3459>
29. Bogdanova A. I., Agaphonov M. O., Ter-Avanesyan M. D. // *Yeast*. 1995. V. 11. № 4. P. 343–353.
<https://doi.org/10.1002/yea.320110407>
30. Kim S. Y., Sohn J.-H., Bae J.-H., Pyun Y.-R., Agaphonov M. O., Ter-Avanesyan M. D., Choi E. S. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69. № 8. P. 4448–4454.
<https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4448-4454.2003>
31. Amuel C., Gellissen G., Hollenberg C. P., Suckow M. // *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2000. V. 5. P. 247–252.
<https://doi.org/10.1007/BF02942181>
32. Suppi S., Michelson T., Viigand K., Alamae T. // *FEMS Yeast Res.* 2013. V. 13. № 2. P. 219–232.
<https://doi.org/10.1111/1567-1364.12023>
33. Yan C., Yu W., Yao L., Guo X., Zhou Y. J., Gao J. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2022. V. 106. № 9–10. P. 3449–3464.
<https://doi.org/10.1007/s00253-022-11948-5>

Comparison of the Efficiency of Various Promoters for the Production of Secreted β -Mannanase by *Bacillus subtilis* by Cells of the Methylophilic Yeast *Ogataea haglerorum*

D. A. Podpletnev^a, A. R. Lapteva^a, S. P. Sineoky^a, and M. G. Tarutina^{a, b, *}

^aNRC «Kurchatov Institute», Moscow, 123182 Russia

^bNRC «Kurchatov Institute», Kurchatov Genomic Center, Moscow, 123182 Russia

*e-mail: m_tarutina@mail.ru

In this article, strong promoters of thermotolerant methylotrophic yeast *Ogataea haglerorum* have been characterized. Promoters play a key role in the regulation of gene expression; therefore, they are the important element of expression vectors. Strong and strictly regulated promoters are a powerful tool for creating highly productive strains — producers of recombinant proteins. To expand the potential of the *O. haglerorum* expression system natural methanol-induced promoters of the *OhMOX* and *OhFMD* genes and the constitutive promoter of the *OhGAP* gene were studied in comparison with the promoter of the *MOX* gene from *O. polymorpha* yeast. A gene encoding recombinant β -mannanase was used as a reporter gene. It has been shown that in *O. haglerorum* yeast cells, the expression level (strength) of the *pOhMOX* promoter is about 1.4–1.9 times higher relative to the *pOpMOX* promoter from *O. polymorpha* yeast. The obtained data on the strength of promoters from yeast *O. haglerorum* can be useful in designing producers of recombinant proteins and optimizing metabolic pathways in methylotrophic yeast *O. haglerorum*.

Keywords: *Ogataea haglerorum*, promoters, Thermotolerant methylotrophic yeast, β -mannanase

УДК 577.181.5

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ И АНТИОКСИДАНТНЫЙ ОТВЕТ БАКТЕРИЙ *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas putida* И *Rhodococcus erythropolis* ПРИ ОБРАБОТКЕ АНТИБИОТИКАМИ

© 2024 г. И. С. Сазыкин¹, А. А. Плотников¹, О. Д. Лановая¹, К. А. Онасенко¹,
А. Е. Полинченко¹, А. С. Мезга¹, Т. Н. Ажогина¹, А. Р. Лицевич¹, М. А. Сазыкина¹, *

¹Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, 344090, Россия

*e-mail: samara@sfedu.ru

Поступила в редакцию 01.07.2023 г.

После доработки 07.08.2023 г.

Принята к публикации 31.08.2023 г.

В работе исследованы окислительные повреждения и уровень антиоксидантного ответа в клетках *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas putida* и *Rhodococcus erythropolis* под действием таких антибиотиков, как ампициллин, азитромицин, рифампицин, тетрациклин и цефтриаксон. Проведена оценка уровня карбоксилирования белков и перекисного окисления липидов (ПОЛ), а также активности супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, глутатионредуктазы (ГР) и уровня глутатиона через 3 и 6 ч после обработки бактерий антибиотиками. Установлено, что индукция СОД происходила раньше и являлась более активной, чем индукция каталазы. У *A. calcoaceticus* СОД индуцировалась совместно с карбоксилированием белков и, вероятно, защищала их от окислительных повреждений, а индукция каталазы коррелировала с ПОЛ. Отмечена положительная корреляция между активностью каталазы и содержанием глутатиона у *R. erythropolis*. Активность каталазы при воздействии исследованных антибиотиков возрастала незначительно и даже снижалась, что связано с незначительным уровнем ПОЛ у большинства прокариот. Вместе с тем низкая активность каталазы могла способствовать дестабилизации генома в результате окислительного стресса и усилению адаптивной эволюции бактерий.

Ключевые слова: окислительный стресс, окислительные повреждения, карбоксилирование белков, перекисное окисление липидов, антиоксидантный ответ, супероксиддисмутаза, каталаза, глутатион, глутатионредуктаза

DOI: 10.31857/S0555109924010049, **EDN:** HCUPXZ

В настоящее время крайне широкое и не всегда оправданное применение антибиотиков в медицинской и ветеринарной практике вызывает лавинообразное увеличение количества резистентных к ним штаммов. В связи с этим механизмы повреждения бактериальной клетки антибиотиками и механизмы ответной защиты клетки требуют детального и тщательного рассмотрения.

Основными механизмами действия противомикробных препаратов являются ингибирование синтеза белка, нуклеиновых кислот, клеточной стенки, метаболизма фолиевой кислоты и связывание с рибосомами [1].

Исследования последних десятилетий показывают, что в результате генетических мутаций обмен веществ микроорганизма может быть изменен таким образом, что блокируемые антибиотиком биохимические реакции больше не являются критичными для жизнедеятельности данного микроорганизма [2]. Вместе с тем многие из антибиотиков способны вызывать окислительный стресс у бактериальных клеток, что, наряду с прямым

антимикробным действием препарата, усиливает бактерицидный эффект. Окислительный стресс, при котором клетки производят химически активные соединения кислорода, вызывающие повреждение белков, ДНК, а также клеточной мембраны бактерий, происходит в клетках микроорганизмов под воздействием бактерицидных антибиотиков [3]. Ранее считалось, что антибиотики вызывают гибель бактериальных клеток за счет возникновения окислительного стресса. Однако современные исследования показывают, что окислительный стресс практически не обеспечивает летальный эффект, он может выступать в качестве бактериостатического агента [4]. Свободные радикалы повреждают клеточные мембраны посредством образования перекисей липидов. Вместе с тем окислительный стресс может способствовать развитию антибиотикорезистентности у бактерий, так как он способствует дестабилизации генома бактериальной клетки, повышает уровень мутагенеза, а также приводит к увеличению количества антибиотикорезистентных бактерий за счет

механизма горизонтального переноса генов между организмами [5, 6]. В то же время в бактериальной клетке существуют системы защиты клетки от окислительного стресса, ключевыми ферментами которых являются каталаза, различные пероксидазы и супероксиддисмутаза (СОД). В работе исследовано влияние антибиотиков разных классов и механизмов действия на такие параметры окислительного стресса, как уровень малонового альдегида и окислительной модификации белков, а также антиоксидантные системы, такие как каталаза, СОД, глутатион (GSH) и глутатионредуктаза (ГР).

Цель работы — изучение окислительного повреждения клетки и антиоксидантного ответа бактерий при воздействии антибиотиков.

МЕТОДИКА

В работе использовали бактериальные штаммы *Pseudomonas putida* и *Rhodococcus erythropolis* из коллекции лаборатории экологии и молекулярной биологии микроорганизмов Академии биологии и биотехнологии Южного федерального университета, а также штамм *Acinetobacter calcoaceticus* ВКПМ В-10353. Штаммы бактерий культивировали в жидкой среде Лурия–Бертани (LB) следующего состава (г/л): NaCl — 10, пептон — 10, дрожжевой экстракт — 5. Исследуемые культуры вносили в жидкую питательную среду LB до достижения плотности 0.5×10^6 кл./мл и культивировали в шейкере–инкубаторе Innova 40R (“New Brunswick Scientific”, США) в течение суток при 30°C со скоростью перемешивания 200 об./мин. Через 24 ч добавляли один из исследуемых антибиотиков (тетрациклин, рифампицин, ампициллин, азитромицин и цефтриаксон). Антибиотики добавляли в концентрации, соответствующей МИК₅₀, минимальной ингибирующей концентрации, которая подавляет рост 50% бактерий, установленной опытным путем для каждого взятого в опыт штамма (табл. 1). Инкубирование проводили в течение 3 и 6 ч. В контрольный вариант антибиотик не добавляли.

Через 3 и 6 ч культивирования с антибиотиком биомассу бактериальных клеток осаждали центрифугированием из культуральной жидкости (КЖ)

в течение 5 мин при 1700 g на центрифуге Mini Spin Plus (“Eppendorf”, Германия). Надосадочную жидкость удаляли. Бактериальную биомассу растирали в фарфоровой ступке с жидким азотом для разрушения клеток. Разрушенные клетки ресуспендировали в 10 мл фосфатно-солевого буфера (PBS), pH 7.4 (“Merck”, Германия). Полученный гомогенат клеток бактерий использовали для проведения биохимических исследований.

Концентрацию белка определяли методом Лоури.

Для определения уровня окислительной модификации (ОМ) белков использован метод Левина [7] в модификации Дубининой [8]. Интенсивность окислительной деструкции белков оценивали по уровню карбонильных производных.

Определение содержания малонового диальдегида (МДА) проводили по методике, приведенной в работе [9].

Активность каталазы (К.Ф. 1.11.1.6) определяли по методике Королюк [10], основанной на способности пероксида водорода образовывать стойкий окрашенный комплекс с солями молибдена.

Определение активности СОД (К.Ф. 1.15.1.1) осуществляли по методу Сироты [11]. СОД способна ингибировать процесс восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) при аутоокислении адреналина в адренохром в щелочной среде в условиях генерации супероксидного анион-радикала. За условную единицу (у.е.) активности СОД принимается 50%-ное ингибирование скорости восстановления НСТ.

Для определения количества GSH использовали метод, разработанный Элманом [12]. Определение активности ГР (К.Ф. 1.6.4.2) проводили с помощью метода Юсуповой [13].

Для статистической обработки результатов были использованы стандартные методы математической обработки. Величины доверительных интервалов были рассчитаны при $p < 0.05$; t -критерий Стьюдента был использован для оценки статистически значимых различий. Расчеты проводили при помощи Microsoft Office Excel. Коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r) вычисляли с целью оценки

Таблица 1. Содержание антибиотиков (мкг/мл) в питательной среде для выращивания исследуемых штаммов бактерий

Антибиотик	Концентрация в среде, мкг/мл		
	<i>A. calcoaceticus</i>	<i>P. putida</i>	<i>R. erythropolis</i>
Ампициллин	100.00	100.00	100.00
Азитромицин	12.50	1.25	1.25
Рифампицин	100.00	100.00	100.00
Тетрациклин	1.25	1.25	1.25
Цефтриаксон	12.5	1.25	1.25

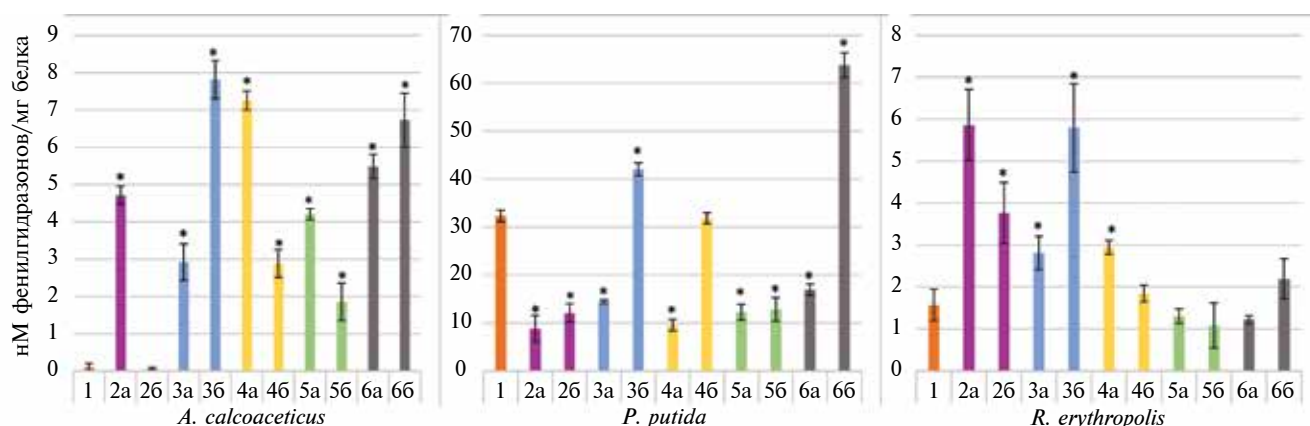


Рис. 1. Содержание карбонильных групп (нМ фенилгидразонов/мг белка) в белках исследуемых штаммов бактерий после обработки антибиотиками: 1 — контроль; 2 — азитромицин; 3 — ампициллин; 4 — рифампицин; 5 — тетрациклин; 6 — цефтриаксон; а — 3 ч, б — 6 ч.

* Отличия статистически достоверны при $p < 0.05$.

зависимостей с использованием пакетов “corrplot” и “ggplot” (R Studio ver. 4.0).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Карбоксилирование белков. Содержание карбонильных групп в белках исследуемых микроорганизмов после обработки антибиотиками представлены на рис. 1. Уровень ОМ белков *A. calcoaceticus* для большинства антибиотиков имел тенденцию к уменьшению при увеличении времени инкубации, что может быть связано с работой антиоксидантной системы данных бактерий [14] и с выработкой устойчивости к действию данных антибиотиков [15]. Однако при воздействии ампициллина и цефтриаксона показатели ОМ белков выросли в 2.5 и 1.5 раза соответственно, что свидетельствует о высоком уровне вызванного ими окислительного стресса. Результаты карбоксилирования белков *A. calcoaceticus* схожи с данными, полученными в работе [16], в которой изучались механизмы, вызывающие гибель *E. coli* под действием различных классов антибиотиков (β -лактамы, аминогликозиды, хинолоны), в том числе и окислительный стресс.

Низкие ОМ белков в клетках *P. putida* можно объяснить тем, что основной спектр действия взятых для исследования воздействия антибиотиков — грамположительные микроорганизмы [17–19], тогда как *P. putida* относится к грамотрицательным [20]. Данный вид бактерий обладает развитыми системами антиоксидантной защиты, так как в естественной среде эти микроорганизмы часто подвержены воздействию соединений, вызывающих окислительный стресс. Следовательно, выживание и успешное распространение *P. putida* связано со способностью вырабатывать адаптивные механизмы для предотвращения повреждений клеточных структур, производимых АФК [21].

Полученные с использованием штамма *P. putida* результаты схожи с данными работы [22] по исследованию *Burkholderia cepacia*. Эти грамотрицательные бактерии также подвергали действию различных антибиотиков. Рост ОМ белков либо был незначителен (в 1.5 раза), либо не превышал контрольные значения.

У *R. erythropolis* при увеличении времени воздействия ряда антибиотиков заметна тенденция уменьшения ОМ белков, примерно в 1.5 раза. Вероятно, это связано индукцией антиоксидантной системы в бактериальных клетках [23, 24]. Напротив, для ампициллина и цефтриаксона, с увеличением времени инкубации с антибиотиками с 3 до 6 ч, уровень карбоксилирования белков увеличивался в 2 раза. При этом для цефтриаксона при 6-часовой экспозиции превышение уровня ОМ белков над контролем было незначительным — в 1.4 раза. Низкий уровень ОМ белков в результате действия цефтриаксона может быть связан с тем, что бактерии рода *Rhodococcus* относятся к грамположительным бактериям, а основной спектр действия цефтриаксона — грамотрицательные бактерии [17].

Результаты воздействия исследуемых антибиотиков на родококк схожи с результатами, полученными в работе [25]. Исследователями была изучена восприимчивость 20 штаммов бактерий (в том числе *R. erythropolis*) к пяти различным антибиотикам (тетрациклин, эритромицин, ампициллин, левофлоксацин и ципрофлоксацин). В результате исследования были сделаны выводы, что *R. erythropolis* является одним из наиболее устойчивых к антибиотикам среди исследованных бактерий, что объясняется высокой продуктивностью работы его антиоксидантной системы.

Уровень перекисного окисления липидов. На рис. 2 приведены результаты определения МДА после обработки исследуемыми антибиотиками.

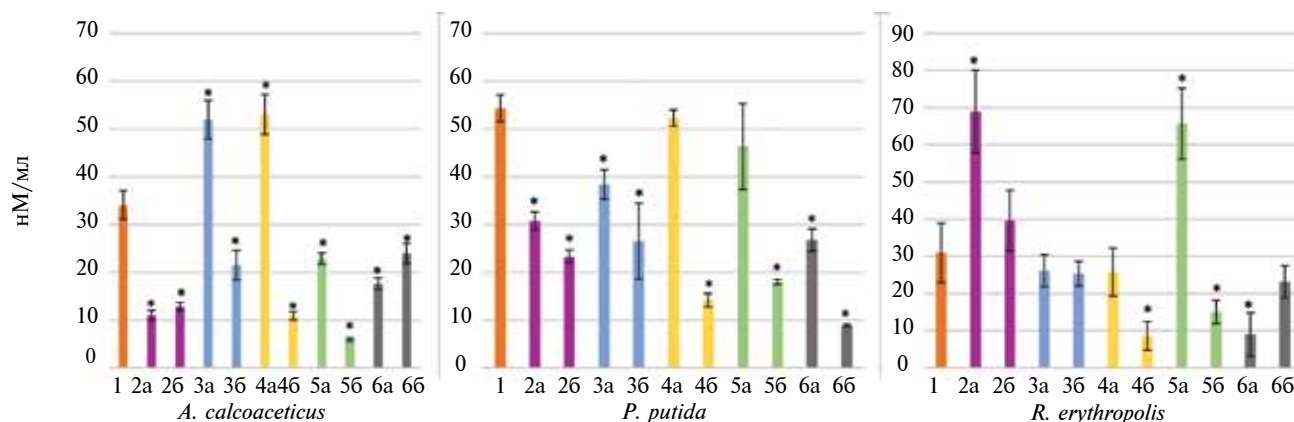


Рис. 2. Перекисное окисление липидов (МДА, нМ/мл) у исследуемых штаммов бактерий после обработки антибиотиками: 1 — контроль; 2 — азитромицин; 3 — ампициллин; 4 — рифампицин; 5 — тетрациклин; 6 — цефтриаксон; а — 3 ч, б — 6 ч.

* Отличия статистически достоверны при $p < 0.05$.

У *A. calcoaceticus* и *R. erythropolis* в присутствии большинства исследуемых антибиотиков уровень ПОЛ был ниже уровня контроля. У *P. putida* снижение ПОЛ относительно контроля отметили для всех использованных антибиотиков, что, вероятно, можно объяснить высокой устойчивостью этого микроорганизма к окислительному стрессу [26].

При воздействии большинства антибиотиков (за исключением воздействия цефтриаксона на *R. erythropolis*) отмечалась тенденция снижения ПОЛ с увеличением времени инкубации. При этом цефтриаксон не оказывал существенного влияния на уровень ПОЛ всех исследуемых штаммов. Возможно, это объясняется тем, что цефтриаксон является антибиотиком, который более эффективен против анаэробных бактерий [27], тогда как все исследуемые штаммы являются аэробами.

Необходимо отметить, что существует общая для большинства прокариотических клеток причина сравнительно низкого уровня ПОЛ при окислительном

стрессе. Перекисное окисление липидов — универсальный процесс, свойственный эукариотам. У бактерий ПОЛ возникает гораздо реже, поскольку в этот процесс вовлечены в основном полиненасыщенные жирные кислоты, тогда как клетки прокариот преимущественно содержат насыщенные и моновенасыщенные жирные кислоты [23]. ПОЛ относится к цепным реакциям, поскольку продукты, образующиеся в ходе этого процесса (липопероксид-радикалы), являются высокоактивными веществами, способными забирать электроны у соседних липидов, что приводит к образованию новых липопероксид-радикалов. Одним из негативных последствий окислительного стресса является перекисидация липидов клетки, которая приводит к снижению текучести мембраны, ухудшению работы ионных каналов, рецепторов, мембранных протеинов, а также изменению проницаемости мембран для различных молекул и ионов (K^+ , Ca^{2+} и т.д.) [28]. Таким образом, в присутствии антибиотиков в бактериальной клетке возникает окислительный стресс, вследствие чего индуцируется антиоксидантная защита

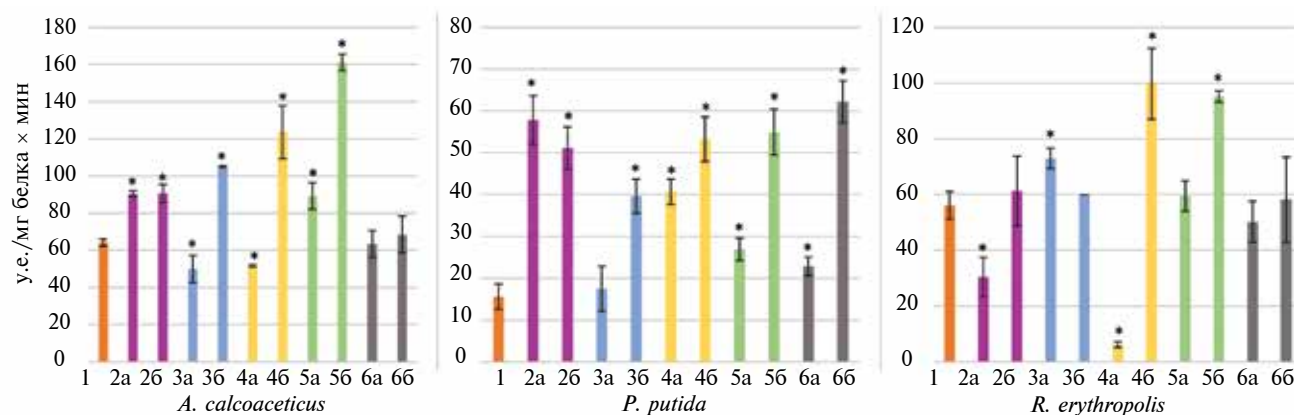


Рис. 3. Активность СОД (у.е./мг белка × мин) при воздействии антибиотиков на исследуемые штаммы бактерий: 1 — контроль; 2 — азитромицин; 3 — ампициллин; 4 — рифампицин; 5 — тетрациклин; 6 — цефтриаксон; а — 3 ч, б — 6 ч.

* Отличия статистически достоверны при $p < 0.05$.

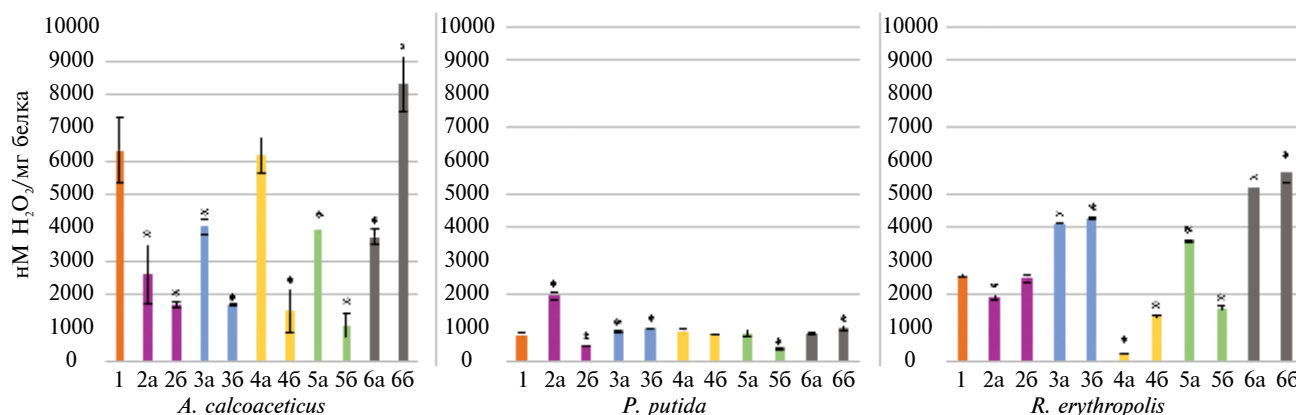


Рис. 4. Активность каталазы (нМ H₂O₂/мг белка) при воздействии антибиотиков на исследуемые штаммы бактерий: 1 — контроль; 2 — азитромицин; 3 — ампициллин; 4 — рифампицин; 5 — тетрациклин; 6 — цефтриаксон; а — 3 ч, б — 6 ч.

* Отличия статистически достоверны при $p < 0.05$.

[5, 29], которая, в свою очередь, снижает уровень ПОЛ. Уменьшение величины ПОЛ вследствие увеличения времени инкубации бактерий с антибиотиками также подтверждает предположение о его взаимосвязи с усилением работы антиоксидантной системы бактериальной клетки.

Оценка активности СОД. Результаты измерения активности СОД при воздействии антибиотиков представлены на рис. 3.

Большинство использованных антибиотиков у всех исследованных штаммов индуцировали образование СОД (даже в случае первоначального падения активности), что подтверждалось результатами других исследователей [30, 31]. Для *P. putida* и *A. calcoaceticus* наиболее эффективной была индукция 6 ч. Исключением являлся азитромицин, который сильнее влиял на активность СОД *P. putida* при инкубации в течение 3 ч и в равной степени индуцировал образование СОД *A. calcoaceticus* при инкубации в течение 3 и 6 ч, что согласовывалось с чувствительностью культуры к данному антибиотику [32, 33].

Оценка активности каталазы при инкубации с антибиотиками. Результаты измерения активности каталазы при воздействии антибиотиков представлены на рис. 4.

Активность бактериальной каталазы увеличилась под действием цефтриаксона у всех исследованных штаммов микроорганизмов, ампициллина — у *P. putida* и *R. erythropolis*, азитромицина — *P. putida*, тетрациклина — *R. erythropolis*. Однако в большинстве случаев была отмечена тенденция к снижению активности каталазы относительно контроля, что может быть связано с уязвимостью данного фермента к действию некоторых использованных антибиотиков или же со слабой продукцией каталазы у исследуемых штаммов [34].

Изменение количества глутатиона в бактериальной клетке при воздействии антибиотиков. Изменение количества глутатиона под действием исследованных антибиотиков представлено на рис. 5. Концентрация глутатиона в клетках *A. calcoaceticus* повышалась в присутствии азитромицина при

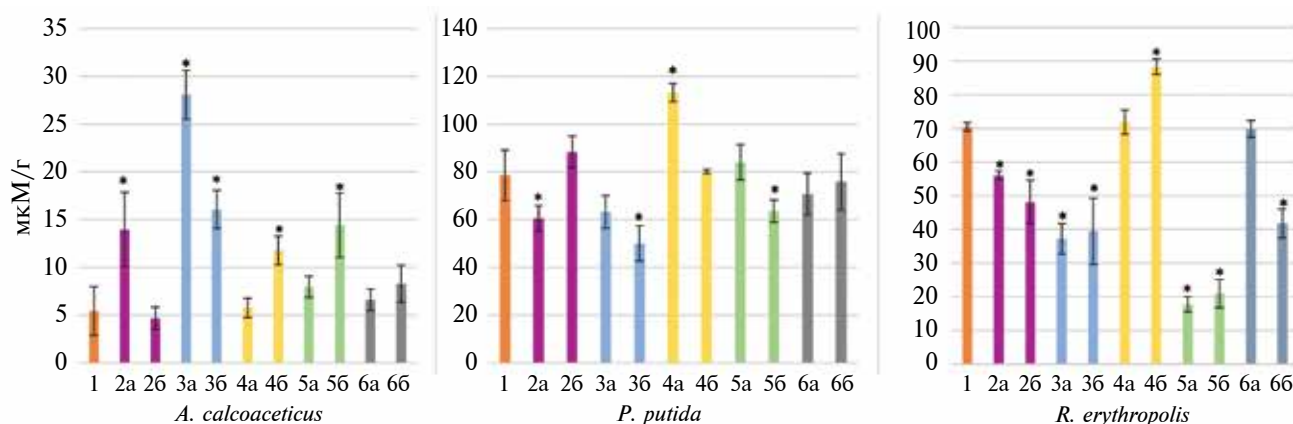


Рис. 5. Концентрация глутатиона (μM GSH/г белка) при воздействии антибиотиков на исследуемые штаммы бактерий: 1 — контроль; 2 — азитромицин; 3 — ампициллин; 4 — рифампицин; 5 — тетрациклин; 6 — цефтриаксон; а — 3 ч, б — 6 ч.

* Отличия статистически достоверны при $p < 0.05$.

экспозиции 3 ч. При этом дальнейшее падение его концентрации и отсутствие достоверных отличий от контроля при экспозиции 6 ч может быть связано с чувствительностью данного микроорганизма к азитромицину. Так, в статье Рецема с соавт. [32] сообщается, что азитромицин подавляет *A. calcoaceticus* (минимальная концентрация, необходимая для ингибирования 90% клеток (МИК₉₀), равна 4 мкг/мл). При воздействии ампициллина, рифампицина и тетрациклина наблюдали увеличение уровня глутатиона в клетках *A. calcoaceticus*. В присутствии цефтриаксона изменения концентрации глутатиона не зарегистрировано.

Под действием азитромицина, ампициллина и цефтриаксона достоверных изменений концентрации глутатиона в клетках *P. putida* не наблюдали. Слабое положительное влияние оказал рифампицин при экспозиции 3 ч. При воздействии рифампицина в течение 6 ч влияния на активность глутатиона также не было отмечено. Усиления синтеза глутатиона не происходило, вероятно потому, что это не способствует выживанию бактерий рода *Pseudomonas* в присутствии по крайней мере некоторых антибиотиков. Так, исследования, проведенные Чжан и Дуань [35] на модели родственного вида *P. aeruginosa*, свидетельствуют о том, что GSH повышает чувствительность бактерии к тетрациклину и не изменяет чувствительность к ампициллину.

В опытах с *R. erythropolis* азитромицин, ампициллин, тетрациклин и цефтриаксон снизили количество глутатиона в клетке. При инкубации в течение 6 ч с рифампицином концентрация глутатиона незначительно возросла.

Оценка активности глутатионредуктазы. Изменение активности глутатионредуктазы под воздействием антибиотиков представлено на рис. 6.

Все исследованные антибиотики, за исключением рифампицина, либо снижали, либо существенно

не изменяли активность ГР *A. calcoaceticus*. При инкубации с рифампицином активность ГР возросла более чем в четыре раза. Такие результаты согласуются с данными исследований Дашнер и Фрэнк [36], которые оценили влияние ампициллина, сульбактама и их комбинации на штаммы *Acinetobacter* spp., в том числе на *Acinetobacter calcoaceticus*. Авторы пришли к выводу, что исследуемые штаммы были более устойчивы к действию ампициллина (МИК = 64 мг/л), по сравнению с МИК (1 мг/л), рассчитанной для сульбактама. Также опубликованы данные о резистентности *A. calcoaceticus* к цефтриаксону (МИК₉₀ = 25 мкг/мл) [37].

Для *P. putida* было отмечено снижение активности ГР под воздействием всех исследованных антибиотиков, за исключением азитромицина, не показавшего достоверных отличий от контроля. В работе Эль-Барбари и Хэл [38] *P. putida* отнесен к штаммам, обладающим средним уровнем чувствительности к азитромицину. Кониккат с соавт. [39] отмечают частое использование азитромицина при лечении внутрибольничных инфекций, вызванных близкородственным к исследуемому нами виду бактерий *P. aeruginosa*. Результаты тестов на чувствительность к антибиотикам различных представителей рода *Pseudomonas*, включая *P. putida*, выделенных из охлажденного мяса птицы, показали, что большинство штаммов не обладали чувствительностью к цефтриаксону [40], что согласуется с результатами для GSH (экспозиция 6 ч) и ГР (3 и 6 ч), полученными в настоящей работе.

При инкубации *R. erythropolis* со всеми исследованными антибиотиками активность ГР значительно возрастала. Однако при экспозиции в течение 3 ч с рифампицином и в течение 6 ч с тетрациклином экспрессия ГР *R. erythropolis* была полностью подавлена. Это может свидетельствовать о чувствительности антиоксидантной системы

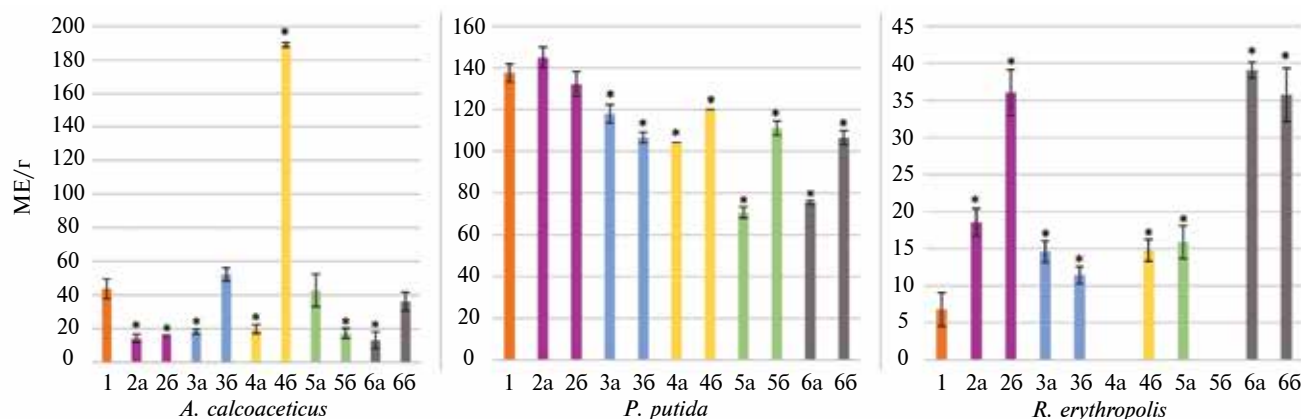


Рис. 6. Активность глутатионредуктазы (МЕ ГР/г белка) при воздействии антибиотиков на исследуемые штаммы бактерий: 1 — контроль, без антибиотика; 2 — азитромицин; 3 — ампициллин; 4 — рифампицин; 5 — тетрациклин; 6 — цефтриаксон; а — 3 ч, б — 6 ч.

* Отличия статистически достоверны при $p < 0.05$.

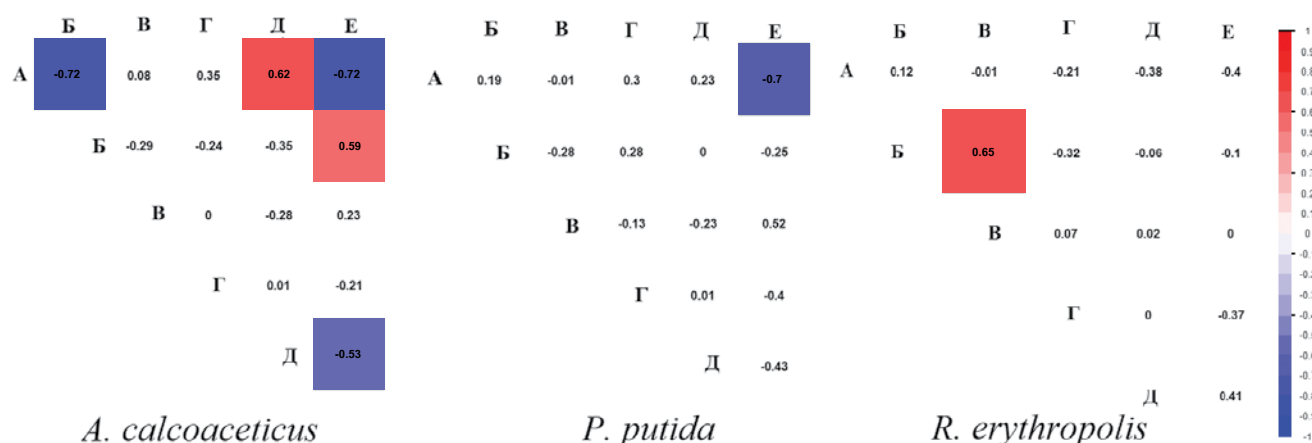


Рис. 7. Корреляция между активностью ферментов антиоксидантной защиты и окислительными повреждениями компонентов бактериальной клетки у исследуемых штаммов (достоверные значения выделены цветом, $p < 0.05$). А — СОД, Б — каталаза, В — GSH, Г — GP, Д — карбоксилирование белков, Е — ПОД.

к воздействию исследованных антибиотиков, в первую очередь к азитромицину и цефтриаксону.

В работе [41] описан штамм *Rhodococcus opacus* PD630, чувствительный к ампициллину. Также были обнаружены штаммы *Rhodococcus*, проявившие устойчивость к ампициллину [42]. В работе Ямщикова с соавт. [43] рифампицин был определен одним из наиболее эффективных антибиотических агентов в отношении различных видов *Rhodococcus*. Однако некоторые исследователи предполагают, что резистентность видов *Rhodococcus* различается в различных географических регионах. Это связывается с различиями антибиотиков, используемых для лечения домашних животных в этих регионах. По данным Макнил и Браун [44], устойчивость к рифампицину наблюдалась менее чем у 5% клинических изолятов *Rhodococcus*, а в другой работе [45] отмечена устойчивость у 40% клинических изолятов, что связано с широким применением рифампицина для лечения и профилактики инфекций у животных.

Таким образом, согласно полученным результатам, наиболее активируемой антибиотиками антиоксидантной системой из четырех рассмотренных, является СОД. Он непосредственно воздействует на супероксид радикал, образующийся при окислительном стрессе. Кроме того, активность СОД непосредственно связана с активностью каталазы, так как продукт реакции первого фермента (пероксид водорода) является субстратом для второго. Каталаза может индуцироваться в клетке позже СОД, когда образуется достаточное количество пероксида, что также согласуется с полученными результатами, так как в большинстве случаев каталаза проявляла наибольшую активность при 6-часовой экспозиции с антибиотиками. С другой стороны, в бактериальной клетке в стрессовых условиях возможен, и даже вероятен, дисбаланс ферментативных активностей СОД и каталазы, что приводит

к дестабилизации генома и ускорению эволюции в процессе адаптации к новым и токсичным субстратам [5].

Взаимосвязь между активностью ферментов антиоксидантной защиты и окислительными повреждениями компонентов бактериальной клетки. На рис. 7 представлены коэффициенты корреляции между активностью ферментов антиоксидантной защиты и окислительными повреждениями компонентов бактериальной клетки для трех исследуемых штаммов. Достоверные коэффициенты корреляции выделены цветом. Можно наблюдать лишь небольшое количество корреляционных зависимостей между активностью ферментов антиоксидантного комплекса и уровнем окислительных повреждений. Вероятно, это связано как со сложным взаимодействием компонентов антиоксидантной защиты, так и с комплексным действием антибиотиков на клетку. Кроме того, необходимо учитывать, что в защите и устранении последствий повреждения белков в ходе окислительного стресса участвуют белки-шапероны [46], которые могут снижать уровень окислительных модификаций белков.

Исследуемые ферменты не могли в полной мере защитить клетку от образования карбонильных производных белков, так как они образуются в результате не только прямой реакции с АФК, но и в результате катализируемой металлами окислительной атаки боковых цепей аминокислот пролина, аргинина, лизина и гистидина [47], защиту от которой исследуемые ферменты обеспечить не могут. Также не стоит исключать того, что влияние на уровень окислительных модификаций белков могут оказывать и другие факторы.

При воздействии антибиотиков на *A. calcoaceticus* была обнаружена прямая корреляция между активностью супероксиддисмутазы и уровнем карбонилирования белков (рис. 7). Можно предположить, что

окислительные модификации белков происходят в результате супероксидного стресса с одновременной индукцией СОД. Это может свидетельствовать о возможной значительной роли СОД в антиоксидантной защите данного штамма. Схожие результаты были получены и в работе Хайндорф с соавт. [31] при изучении биологической роли СОД. Исследователи инактивировали ген *AIS_2343*, кодирующий предполагаемую СОД, в результате чего мутантные штаммы оказались значительно более восприимчивы к окислительному стрессу.

Достоверных коэффициентов корреляции между уровнем карбоксилирования белков и активностью исследуемых ферментов у *P. putida* и *R. erythropolis* обнаружено не было (рис. 7).

У *A. calcoaceticus* и *P. putida* была обнаружена значимая отрицательная корреляция между активностью СОД и уровнем ПОЛ. Вероятно, ПОЛ у исследуемых микроорганизмов активируется при пероксидном стрессе, когда индукция СОД не происходит. При этом у *A. calcoaceticus*, одновременно с усилением ПОЛ, активируется и каталаза (рис. 7). Исходя из полученных данных, уровень ПОЛ в большинстве случаев снижался со временем — от экспозиции 3 ч к экспозиции 6 ч, и, предположительно, каталаза являлась наиболее значимым ингибитором ПОЛ. О достаточно сложном взаимодействии и временной динамике работы различных компонентов антиоксидантной системы исследуемых бактерий свидетельствуют также обнаруженная отрицательная зависимость между активностью каталазы и СОД у *A. calcoaceticus* и положительная корреляция между активностью каталазы и содержанием глутатиона у *R. erythropolis* (рис. 7).

Таким образом, проведенные исследования показали, что из четырех рассмотренных антиоксидантных систем бактерий первым уровнем защиты от окислительного стресса, вызываемого антибиотиками, является СОД, так как она вступала в действие через наиболее короткий промежуток времени после внесения антибиотика в культуру, то есть максимум активности в среднем СОД проявляла в первые 3 ч после инкубации. Через 6 ч эффективность данной системы снижалась, при этом повышалась активность каталазы, инактивирующей пероксид водорода, образующийся в результате действия СОД. Такая антиоксидантная система как глутатион—глутатионредуктаза активировалась в присутствии антибиотиков гораздо менее эффективно, по сравнению с СОД и каталазой.

Настоящее исследование окислительного стресса, возникающего у бактерий под действием антибиотиков, показало, что для получения более ясного и детального представления о бактериостатических и бактерицидных механизмах, необходимо более глубокое изучение всей полноты биохимических процессов, происходящих в микробной клетке под действием антимикробных препаратов.

Такие работы также помогут прояснить пути адаптации бактерий к подобным соединениям. Особую актуальность подобные исследования приобретают в свете стремительно распространяющейся в настоящее время резистентности микроорганизмов к антибактериальным препаратам.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания в сфере научной деятельности № FENW-2023-0008.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yoneyama H., Katsumata R. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2006. V. 70. № 5. P. 1060–1075.
2. Фурман Ю.В., Артюшкова Е. Б., Анисанов А. В. // Актуальные проблемы социально-гуманитарного и научно-технического знания. 2019. № 1. С. 1–3.
3. Пескин А.В. // Биохимия. 1997. Т. 62. № 12. С. 1571–1578.
4. Imlay J.A. // Cur. Opin. Microbiol. 2015. V. 24. P. 124–131.
5. Sazykin I.S., Sazykina M. A. // Gene. 2023. V. 857. P. 147170. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2023.147170>
6. Goyal A. // iScience. 2022. V. 25. № 5. P. 104312.
7. Levine R.L., Garland D., Oliver C. N., Amici A., Climent I., Lenz A. G. et al. // Methods Enzymol. 1990. V. 186. P. 464–478.
8. Дубинина Е.Е., Бурмистров С. О., Ходов Д. А., Порохов Г. Е. // Вопросы медицинской химии. 1995. Т. 41. № 1. С. 24–26.
9. Стальная И.Д., Гаришвили Т. Г. // Современные методы в биохимии. 1977. Т. 2. № 3. С. 66–68.
10. Королюк М. А., Иванова Л. К., Майорова И. Г., Токарева В. А. // Лабораторное дело. 1988. № 4. С. 44–47.
11. Сирота Т.В. // Вопросы медицинской химии. 1999. Т. 45. № 3. С. 263–272.
12. Ellman G.L. // Arch. Biochem. Biophys. 1959. V. 82. № 1. P. 70–77.
13. Юсупова Л.Б. // Лабораторное дело. 1989. Т. 4. № 19–21. С. 13.
14. Wanarska E., Mielko K. A., Maliszewska I., Młynarz P. // Sci. Rep. 2022. V. 12. № 1. P. 1913.
15. Shin B., Park C., Park W. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2020. T. 104. C. 1423–1435.
16. Belenky P., Ye J. D., Porter C. B., Cohen N. R., Lobritz M. A., Ferrante T. et al. // Cell Rep. 2015. V. 13. № 5. P. 968–980.
17. Brogden R.N., Ward A. // Drugs. 1988. V. 35. № 6. P. 604–645.
18. Постникова Л.Б., Соодаева С. К., Климанов И. А., Кубышева Н. И., Афиногенов К. И., Глухова М. В., Никитина Л. Ю. // Пульмонология. 2017. V. 27. № 5. P. 664–671.
19. Куликова Н. А. // Международный студенческий научный вестник. 2017. № 4–5. С. 614–615.
20. Weimer A., Kohlstedt M., Volke D. C., Nickel P. I., Wittmann C. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 104. P. 7745–7766.S

21. *Nikel P. I., Fuhrer T., Chavarria M., Sánchez-Pascuala A., Sauer U., de Lorenzo V.* // ISME J. 2021. V. 15. № 6. P. 1751–1766.
22. *Van Acker H., Gielis J., Acke M., Cools F., Cos P., Coenye T.* // PloS One. 2016. V. 11. № 7. e0159837. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159837>
23. *Pátek M., Grulich M., Nešvera J.* // Biotechnol. Adv. 2021. V. 53. P. 107698.
24. *Urbano S. B., Di Capua C., Cortez N., Farías M. E., Alvarez H. M.* // Extremophiles. 2014. V. 18. P. 375–384.
25. *Meireles A., Faia S., Giaouris E., Simões M.* // Biofouling. 2018. V. 34. № 10. P. 1150–1160.
26. *Ren X., Zou L., Holmgren A.* // Curr. Med. Chem. 2020. V. 27. № 12. P. 1922–1939. <https://doi.org/10.2174/0929867326666191007163654>
27. *Cleeland R., Squires E.* // Am. J. Med. 1984. V. 77. (4C). P. 3–11.
28. *Mourenza Á., Gil J. A., Mateos L. M., Letek M.* // Antioxidants. 2020. V. 9. № 5. P. 361.
29. *Aguilera J., Rautenberger R.* // Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems. 2011. P. 58–71. <https://doi.org/10.1002/9781444345988.ch4>
30. *Martins D., McKay G., Sampathkumar G., Khakimova M., English A. M., Nguyen D.* // PNAS. 2018. V. 115. № 39. P. 9797–9802.
31. *Heindorf M., Kadari M., Heider C., Skiebe E., Wilharm G.* // PloS One. 2014. V. 9. № 7. P. e101033.
32. *Retsema J., Girard A., Schelkly W., Manousos M., Anderson M., Bright G. et al.* // Antimicrob. Agents Chemother. 1987. V. 31. № 12. P. 1939–1947.
33. *Mirzaei R., Mesdaghinia A., Hoseini S. S., Yunesian M.* // Chemosphere. 2019. V. 221. P. 55–66.
34. *Ramanathan S., Arunachalam K., Chandran S., Selvaraj R., Shunmugiah K. P., Arumugam V. R.* // J. Appl. Microbiol. 2018. V. 125. № 1. P. 56–71. <https://doi.org/10.1111/jam.13741>
35. *Zhang Y.N., Duan K. M.* // Sci. China C Life Sci. 2009. V. 52. № 6. P. 501–505.
36. *Daschner F.D., Frank U.* // Infection. 1989. V. 17. № 4. P. 272–274.
37. *Gnann Jr J. W., Goetter W. E., Elliott A. M., Cobbs C. G.* // Antimicrob. Agents Chemother. 1982. V. 22. № 1. P. 1–9.
38. *El-Barbary M.I., Hal A. M.* // J. Aquac. Res. Development. 2017. V. 8. № 7. P. 1–7. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000499>
39. *Konikkat S., Scribner M. R., Eutsey R., Hiller N. L., Cooper V. S., McManus J.* // PLoS genetics. 2021. V. 17. № 7: e1009634. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009634>
40. *Elbehiry A., Marzouk E., Aldubaib M., Moussa I., Abalkhail A., Ibrahim M. et al.* // AMB Express. 2022. V. 12. № 1. P. 53. <https://doi.org/10.1186/s13568-022-01390-1>
41. *Plaggenborg R., Overhage J., Loos A., Archer J. A. C., Lessard P., Sinskey A. J. et al.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 72. № 4. P. 745–755.
42. *Stancu M. M.* // J. Environ. Sci. (Shina) 2014. V. 26. № 10. P. 2065–2075. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.08.006>
43. *Yamshchikov A.V., Schuetz A., Lyon G. M.* // Lancet Infect. Dis. 2010. V. 10. № 5. P. 350–359.
44. *McNeil M.M., Brown J. M.* // Eur. J. Epidemiol. 1992. V. 8. № 3. P. 437–443.
45. *Asoh N., Watanabe H., Fines-Guyon M., Watanabe K., Oishi K., Kositsakulchai W. et al.* // J. Clin. Microbiol. 2003. V. 41. № 6. P. 2337–2340.
46. *Vaubourgeix J., Lin G., Dhar N., Chenouard N., Jiang X., Botella H. et al.* // Cell Host & Microbe. 2015. V. 17. № 2. P. 178–190.
47. *Nyström T.* // EMBO J. 2005. V. 24. № 7. P. 1311–1317.

Oxidative Damage and Antioxidant Response of *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas putida* and *Rhodococcus erythropolis* Bacteria during Antibiotic Treatment

I. S. Sazykin^a, A. A. Plotnikov^a, O. D. Lanovaya^a, K. A. Onasenko^a, A. E. Polinichenko^a,
A. S. Mezga^a, T. N. Azhogina^a, A. R. Litsevich^a, and M. A. Sazykina^{a, *}

^a*Southern Federal University, Rostov-on-Don, 344090, Russia*

*e-mail: samara@sfedu.ru

In this work, oxidative damage and the level of antioxidant response in *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas putida*, and *Rhodococcus erythropolis* cells under the influence of such antibiotics as ampicillin, azithromycin, rifampicin, tetracycline, and ceftriaxone were studied. The level of protein carboxylation and lipid peroxidation (LPO), as well as the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione reductase (GR), and the level of glutathione 3 and 6 hours after antibiotic treatment of bacteria were assessed. It is observed that SOD induction occurs earlier and is more active than catalase induction. In *A. calcoaceticus*, SOD is induced together with protein carboxylation and probably protects them from oxidative damage, while catalase induction correlates with LPO. A positive correlation is also noted between catalase activity and glutathione content in *R. erythropolis*. Catalase activity increases insignificantly and even decreases under the studied antibiotics influence, which is associated with an insignificant level of lipid peroxidation in most prokaryotes. On the other hand, low catalase activity can contribute to genome destabilization as a result of oxidative stress and enhance the adaptive evolution of bacteria.

Keywords: oxidative stress, oxidative damage, protein carboxylation, lipid peroxidation, antioxidant response, superoxide dismutase, catalase, glutathione, glutathione reductase, bacteria, antibiotics

УДК 579.25

МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ КОНВЕРСИИ ХЛОРФЕНОКСИУКСУСНЫХ КИСЛОТ ШТАММА *Serratia* sp. 22S

© 2024 г. Н. В. Жарикова¹ *, Е. Ю. Журенко¹, В. В. Коробов¹, Л. Г. Анисимова²,
Г. Э. Актуганов¹

¹Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН, Уфа, 450054 Россия

²Научно-исследовательский технологический институт гербицидов и регуляторов роста растений
с опытно-экспериментальным производством АН РБ, Уфа, 450029 Россия

*e-mail: puzzle111@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.07.2023 г.

После доработки 18.08.2023 г.

Принята к публикации 31.08.2023 г.

Из образцов почвы, загрязненной отходами химического производства, был изолирован природный бактериальный штамм 22S, относящийся к роду *Serratia*. На основании исследования его вирулентности, токсичности, инфективности и инвазивности изучаемый штамм был признан непатогенным. В периодической культуре *Serratia* sp. 22S была способна раздельно утилизировать хлорфеноксиуксусные кислоты (100 мг/л) в качестве единственного источника углерода и энергии. На основании найденных в среде культивирования соединений (2,4-дихлор-6-метилфеноксиуксусной, феноксиуксусной и 2-гидрокси-2-гексендионовой кислот) был предположен путь катаболизма хлорфеноксиуксусных кислот посредством полного восстановительного дехлорирования субстрата с последующим *мета*-разрывом ароматического кольца катехола. Эксперименты с интактными клетками подтвердили данное предположение. В модельных системах была выявлена хорошая адаптагенность и приживаемость штамма 22S в почве, причем содержание хлорфеноксиуксусных кислот до определенной концентрации оказывало положительное влияние на динамику роста культуры, скорее всего вследствие селективного воздействия.

Ключевые слова: 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота, 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота, хлорфеноксигербициды, 2-гидроксимуконовый полуальдегид, *Serratia*

DOI: 10.31857/S0555109924010059, **EDN:** HCSHTO

2,4-Дихлорфеноксиуксусная (2,4-Д) и 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная (2,4,5-Т) кислоты представляют собой синтетические ауксины, соли и эфиры которых с 1940 гг. широко применялись в сельском хозяйстве как гербициды для борьбы с широколиственными сорняками, а также в качестве регулятора роста растений. Кроме того, они использовались как дефолианты во время чрезвычайного положения в Малайзии в 1948–1960 гг. и во время вьетнамской войны 1961–1971 гг. Однако в 1980 гг. 2,4,5-Т была запрещена во всем мире вследствие ее токсичности для животных [1].

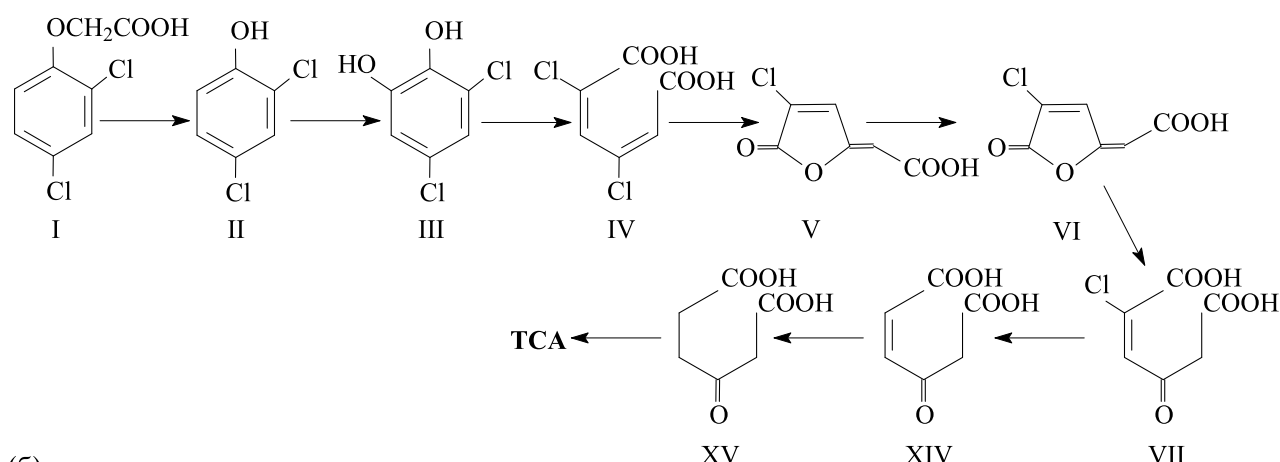
Оба гербицида являются загрязнителями подземных вод, поскольку, с одной стороны, они хорошо растворимы в воде, а с другой стороны, медленно разлагаются [2]. Биоремедиация загрязненных почв и подземных вод микроорганизмами в последние годы вызывает большой интерес, так как этот метод безопасен, относительно эффективен, экологичен и экономичен [3].

К настоящему времени известны бактериальные штаммы, способные утилизировать 2,4-Д в аэробных

условиях, такие как *Cupriavidus pinatubonensis* (первоначально *Alcaligenes eutrophus*) JMP 134, *Sphingomonas* sp. TFD44, *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans* EST4002, *Bradyrhizobium* sp. HW13, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1c и *Halomonas* sp. EF43 [4–10]. Вышеперечисленные штаммы в основном были изолированы из загрязненных гербицидами почв, а их характерной особенностью являлось наличие у них единого пути конверсии 2,4-Д через 3,5-дихлоркатехол с последующим расщеплением его ароматического кольца (рис. 1а).

В отличие от разнообразия аэробных бактерий, разлагающих 2,4-Д, сообщалось лишь о нескольких подобных культурах, осуществляющих конверсию 2,4,5-Т. Наиболее известны представители родов *Burkholderia*, *Nocardioideis*, *Sphingomonas* и *Bradyrhizobium*. Все они способны использовать 2,4,5-Т в качестве основного источника углерода и энергии [11–16]. Полный путь разложения 2,4,5-Т известен для штамма *Burkholderia phenoliruptrix* (первоначально *Pseudomonas cepacia*) AC1100 (рис. 1б), который протекает через центральный

(a)



(б)

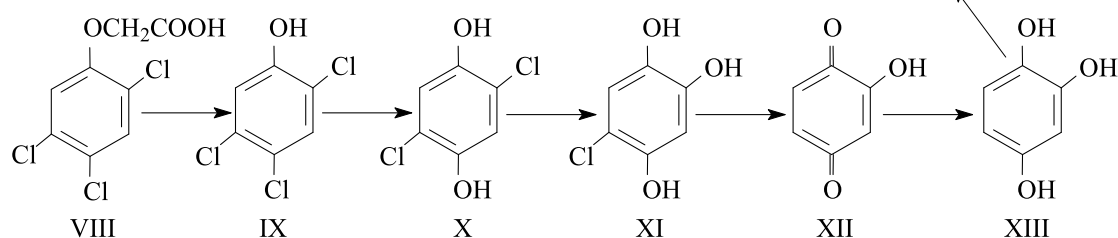


Рис. 1. Пути аэробной деградации хлорированных феноксиуксусных кислот у бактерий: а — 2,4-Д штамма *C. necator* JMP134 [4], б — 2,4,5-Т штамма *B. phenoliruptrix* AC1100 [11, 12]: I — 2,4-Д; II — 2,4-дихлорфенол; III — 2,4-дихлоркатахтол; IV — 2,4-дихлор-*цис*, *цис*-муконат; V — *транс*-2-хлордиенлактон; VI — *цис*-2-хлордиенлактон; VII — 2-хлор-малеилуксусная кислота; VIII — 2,4,5-Т; IX — 2,4,5-трихлорфенол; X — 2,5-дихлоргидрохинон; XI — 5-хлоргидрокси-гидрохинон; XII — 2-гидрокси-1,4-бензохинон; XIII — гидрокси-гидрохинон; XIV — малеилуксусная кислота; XV — β -кетoadипат; TCA — цикл трикарбоновых кислот.

метаболит — 2,5-дихлоргидрохинон, и далее — с образованием гидрокси-гидрохинона с последующим *орто*-расщеплением его ароматического кольца [11, 12]. Вероятно некоторая «избыточность» этого пути является следствием его происхождения — культура была получена в лаборатории методом «плазмид-ассоциированного молекулярного бридинга» [17].

Также через гидрокси-гидрохинон с дальнейшим *орто*-расщеплением ароматического кольца происходит деструкция 2,4-Д и 2,4,5-Т у штамма *Nocardioideis simplex* 3Е, для которого выделены и изучены ключевые ферменты конверсии — гидрокси-гидрохинон- и 6-хлоргидрокси-гидрохинон-1,2-диоксигеназы, а также малеилацетатредуктаза [18].

Несмотря на многочисленные попытки усилить биodeградацию хлорфеноксиуксусных кислот путем биоаугментации почв штаммами-деструкторами, часто не происходит значимого увеличения разложения загрязняющих веществ по сравнению с таковым в незагрязненной почве. Интродуцированные штаммы не всегда хорошо выживают в почвенной среде, несмотря на различные стрессы, в том числе конкуренцию с аборигенными микроорганизмами. Использование природных местных

микроорганизмов, разлагающих 2,4-Д, является реальной стратегией биоремедиации загрязненных участков [19].

Цель этой работы — выявление метаболического потенциала конверсии 2,4-Д и 2,4,5-Т у аборигенного бактериального штамма 22S, а также определение его таксономического положения, оценка безопасности его применения, адаптогенности и приживаемости в почве.

МЕТОДИКА

Объектом исследований был выбран природный бактериальный штамм, обозначенный нами 22S, изолированный из образцов почвы, загрязненной отходами химического производства (Уфа, Россия).

Морфометрические характеристики были изучены с помощью просвечивающей электронной микроскопии на микроскопе Н-300 («Hitachi», Япония) при увеличении 18000 (75 кВ).

Культуральные и физиолого-биохимические свойства изолята определяли согласно методическому руководству [20].

Геномную ДНК выделяли из бактерий методом Бирнбойма–Доли с модификациями [21]. Небольшое количество бактериальной биомассы — одна колония с чашки с агаризованной среды или 25 мкл осадка жидкой культуры — суспендировали в 100 мкл буфера I (50 мМ Трис-НСl, pH 8.0; 10 мМ ЭДТА; 50 мкг/мл панкреатической РНКазы) до получения однородной суспензии. Затем добавляли 125 мкл лизирующего буфера II (0.2 М NaOH; 1%-ный додецилсульфат натрия). Смесь обрабатывали ультразвуком на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-2Т (Россия) на максимальной мощности 22 кГц в течение 2 мин при 4°C. Затем суспензию инкубировали при 65°C в течение 45 мин и охлаждали до комнатной температуры. После этого добавляли 125 мкл буфера III (2.5 мМ ацетат калия, pH 4.5), смесь встряхивали и центрифугировали 10 мин при 10000 g в минисцентрифуге Eppendorff 5415C (“Eppendorff”, Германия). В супернатант добавляли 500 мкл смолы Wizard Maxi Preps (“Promega”, США) и продолжали экстракцию в соответствии с рекомендациями производителя. Концентрация полученного препарата ДНК при использовании этого метода составляла 30–50 мкг/мл.

Для проведения ПЦР и дальнейшего секвенирования ПЦР-фрагментов частичной последовательности гена 16S рРНК была использована универсальная праймерная система [22]. Амплификационная смесь (50 мкл) имела следующий состав: буфер для ДНК-полимеразы BioTaq (“БиоМастер”, Россия) 17 мМ (NH₄)₂SO₄; 67 мМ трис-НСl, pH 8.8; 2 мМ MgCl₂; по 12.5 нмоль каждого из dNTP, 50 нг ДНК-матрицы; по 5 пмоль соответствующих праймеров и 3 ед. ДНК-полимеразы BioTaq (“Диалат”, Россия). Температурно-временной профиль ПЦР: первый цикл — 9 мин при 94°C, 1 мин при 55°C, 2 мин при 72°C; последующие 30 циклов — 1 мин при 94°C, 1 мин при 55°C, 2 мин при 72°C; завершающий цикл — 7 мин при 72°C. Секвенирование полученных ПЦР-фрагментов генов проводили с помощью набора реактивов Big Dye Terminator v.3.1 (“Applied Biosystems”, США) на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3730 (“Applied Biosystems”, США) согласно инструкциям производителя.

С использованием пакета программ BLAST проведен поиск гомологичных последовательности с опубликованными в базе данных GenBank, а с помощью CLUSTAL W и MEGA 5 произведено их множественное выравнивание и построение филогенетического дерева (рис. 2).

Бактериальный штамм выращивали в конических колбах (250 мл) на минимальной солевой среде M9 [23], содержащей в качестве единственного источника углерода 2,4-Д/2,4,5-Т в концентрации 100 мг/л. Культивирование проводили при температуре 28°C в термостатируемой установке УВМТ-12–250 (“Элион”, Россия) при 120 об./

мин. Интенсивность роста культуры оценивали по оптической плотности (ОП₅₉₀) клеточной суспензии с использованием фотоколориметра КФК-2 (“ЗОМЗ”, Россия).

Определение количества хлорфеноксиуксусных кислот в культуральной жидкости проводили согласно руководству [24] с небольшими модификациями, описанными ранее в статье Жариковой с соавт. [25].

Продукты метаболизма хлорфеноксиуксусных кислот определяли на хромато-масс-спектрометре NERMAG R-30-10 с хроматографом Carlo Erba MEGA 536010 (“Hewlett-Packard”, США), условия определения описаны в работе Жариковой с соавт. [25].

Интермедиаты идентифицировали с использованием системы обработки данных MS HP ChemStation, содержащей библиотеку из 138000 масс-спектров Base Date WILEY138L.

Изучение этапов промежуточного метаболизма хлорфеноксиуксусных кислот проводили в экспериментах с интактными клетками [26, 27]. Предварительное определение пути расщепления ароматического кольца выполняли качественными методами, в основе которых лежит желтое окрашивание среды инкубации при формировании полуальдегида гидроксимуконической кислоты (мета-путь), либо положительная реакция Ротера (орта-путь).

Бактериальные клетки выращивали до конца экспоненциальной фазы на солевой среде M9, содержащей в качестве единственного источника углерода и энергии 2,4-Д или 2,4,5-Т в концентрации 100 мг/л. Затем клетки отделяли центрифугированием при 3630 g 20 мин, дважды промывали 50 мМ натрий-фосфатным буфером (pH 7.0) и суспендировали (1 г сырой биомассы) в том же буфере.

Далее выращенные на хлорфеноксиуксусных кислотах интактные клетки суспендировали в 20 мл 50 мМ натрий-фосфатного буфера (pH 7.5) и инкубировали в течение 3 ч в присутствии 100 мМ катехола в темноте при 25°C. Контролем служила смесь без добавления интактных клеток.

Ферментативную активность катехол-1,2-диоксигеназы и катехол-2,3-диоксигеназы оценивали по изменению оптической плотности реакционной смеси на спектрофотометре СФ-46 (ООО “ЛОМО”, Россия) в кварцевых кюветах объемом 4 мл с длиной оптического пути 1 см. Поглощение контрольной и опытной смеси до и после инкубации измеряли при длинах волн 260, 274 и 375 нм, соответствующих пикам поглощения муконовой кислоты, катехола и гидроксимуконического полуальдегида. Наличие активности диоксигеназ, расщепляющих ароматическое кольцо катехола, определяли по сдвигу пика поглощения катехола в более коротковолновую или, наоборот, в длинноволновую область спектра.

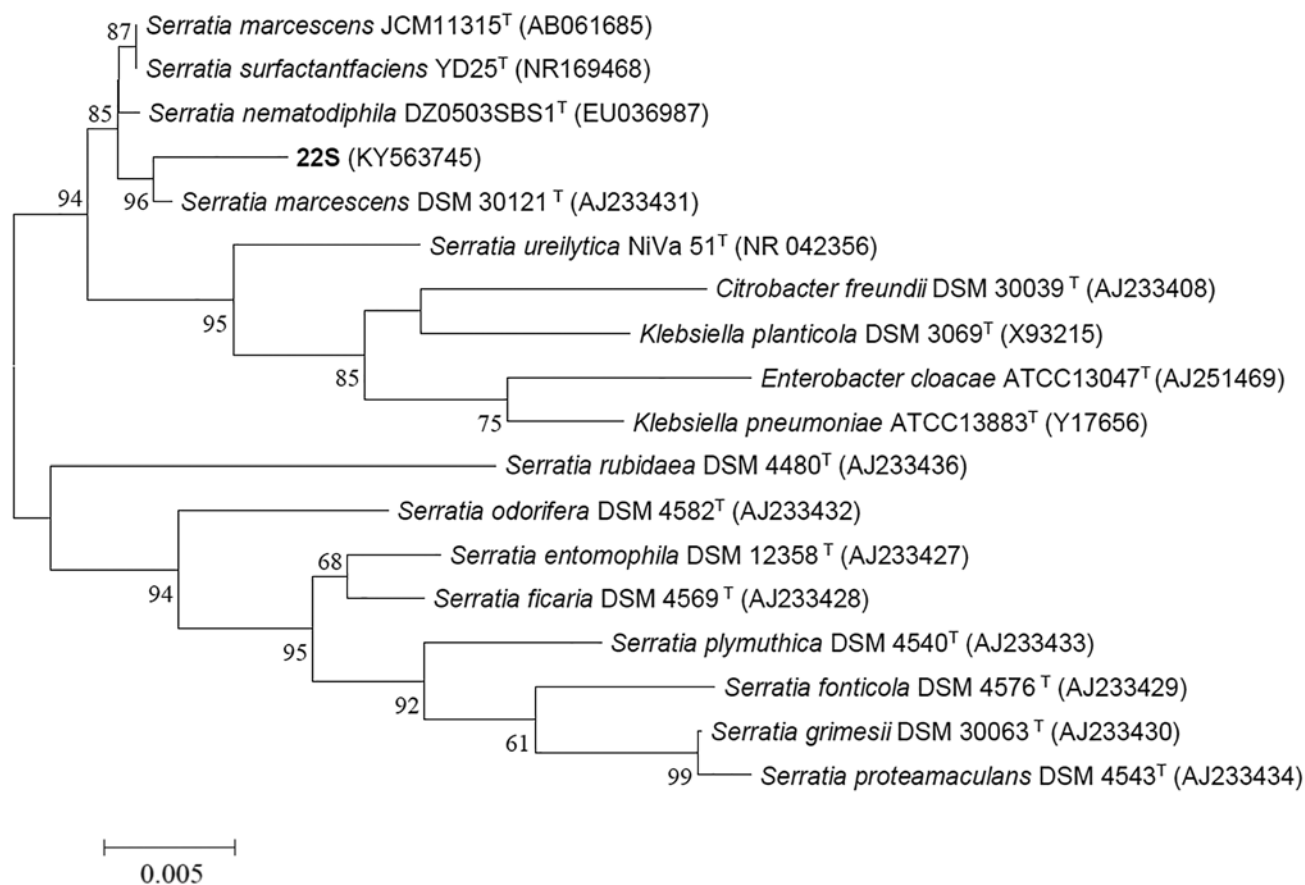


Рис. 2. Филогенетическое дерево 16S рРНК штамма 22S и гомологичных ему последовательностей типовых видов бактерий близких к роду *Serratia*, построенное методом “Neighbor-Joining”. Цифрами указана достоверность ветвления, рассчитанная с помощью “bootstrap”-анализа (значимыми признаются величины больше 50). Масштаб отражает эволюционное расстояние, соответствующее 5 нуклеотидным заменам на каждые 1000 нуклеотидов. В скобках указаны номера последовательностей в базе данных (GenBank).

Оценка патогенности бактерий проводилась на основании изучения их вирулентности, токсичности, инфективности и инвазивности. Оценку средневирulentной дозы, то есть дозы, которая вызывает смертельный эффект у 50% подопытных животных, проводили путем однократного введения взвеси изучаемого штамма микроорганизма в дозах 10^7 , 10^8 и 10^9 кл. на одно животное внутрибрюшинно. Для испытания каждой дозы использовали белых мышей по 6 животных в группе. Наблюдение за их выживаемостью проводили в течение 30 сут.

Для определения токсичности штамма 22S животным внутрибрюшинно вводили взвесь убитых клеток в физрастворе в дозе 10^9 кл./мл по бактериологическому стандарту. Фиксировали состояние животных в течение 48 ч. Контрольной группе белых мышей внутрибрюшинно вводили по 0.5 мл физраствора. Все животные содержались в условиях вивария.

В течение всего срока наблюдения за выживаемостью и общим состоянием животных отмечались

клинические проявления воздействия микроорганизмов и поведенческие реакции мышей. Для определения диссеминации изучаемых микроорганизмов во внутренних органах у всех контрольных и зараженных животных выполняли посев крови и брали отпечатки легких, сердца, печени, селезенки, почек и кишечника на МПА в чашках Петри.

Для оценки приживаемости культуры 22S в модельном опыте с почвой использовали выщелоченный нестерильный чернозем, помещенный в стеклянные сосуды. Предварительно почву просеяли, перебрали, удалили корни и увлажнили до 60% стерильной дистиллированной водой.

В системе “почва—интродуцент—гербицид” использовали 2,4-Д и 2,4,5-Т в концентрациях, равных 100 ПДК, 1000 ПДК и 10000 ПДК (ПДК для почвы у 2,4-Д составляет 0.1 мг/см³, а у 2,4,5-Т — 0.15 мг/см³). Растворы 2,4-Д и 2,4,5-Т вносили в почву за 7–10 дней до внесения бактериальной культуры. Штамм предварительно выращивали на

богатой жидкой среде и вносили в концентрации 3.4×10^7 кл./г почвы.

Контроль (чистая почва) и все варианты опыта проводили в трех повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Грамотрицательные клетки штамма 22S представляли собой подвижные короткие палочки с перитрихальным жгутикованием, размером 0.63×1.05 мкм.

На МПА изолят образовывал красноватые колонии, пигментация которых являлась варьирующим признаком, зависимым от условий культивирования и присутствия сахаров в среде. В УФ-лучах наблюдалась флуоресценция культуры. Оптимальный рост бактерий происходил в аэробных условиях в диапазоне 22–37°C и pH 7–8.

В качестве единственного источника углерода культура использовала мальтозу, маннит, сахарозу, цитрат и глюконат, но не L-арабинозу, лактозу, малонат, фенилаланин и мочевины. Клетки штамма оказались положительными по реакции Фогес–Проскауэра, каталазной и лизиндекарбоксилазной активности, восстанавливали нитрат. В то же время у бактерий не выявили орнитиндекарбоксилазу и аргининдигидролазу, способности к гидролизу желатина, а также отрицательной была проба с метиловым красным.

Для выделенного изолята была определена практически полная последовательность (1400 п.н.) амплификата гена, кодирующего 16S рРНК, которая была депонирована в международную базу данных GenBank под номером KY563745.

Сходство с исследуемой культурой показали бактерии рода *Serratia*, такие как *Serratia marcescens* DSM 30121^T (уровень идентичности 98.5%), *S. marcescens* JCM11315^T (уровень идентичности

98.4%), *S. nematodiphila* DZ0503SBS1^T (уровень идентичности 98.4%), *S. surfactantfaciens* YD25^T (уровень идентичности 98.3%) и *S. ureilytica* NiVa 51^T (уровень идентичности 97.1%) (рис. 2).

Необходимо отметить, что *S. marcescens* DSM 30121^T и *S. marcescens* JCM11315^T ранее считались типовыми штаммами двух подвигов данного вида: *marcescens* и *sakuensis* соответственно. Первоначально на основании данных ДНК–ДНК-гибридизации и факта обнаружения спор в клетках культуры штамм KREDT= DSM 17174^T был описан как подвиг *S. marcescens* subsp. *sakuensis* [28]. Однако более поздние исследования показали, что штамм DSM 17174^T не удовлетворял геномным критериям для определения подвида, и наличие спор в его клетках не было подтверждено. Таким образом, на основании исследования спорообразования и геномного анализа был сделан вывод, что *S. marcescens* subsp. *sakuensis* является более поздним гетеротипическим синонимом подвида *S. marcescens* subsp. *marcescens* [29, 30].

С типовым штаммом *S. marcescens* DSM 30121^T исследуемая культура образует кластер с высоким уровнем достоверности — значение бутстреп анализа равно 96 и уровнем идентичности — 98.5%. Последний сопоставим по значению (98.4 и 98.3% соответственно) с уровнями идентичности штамма 22S и типовых штаммов двух других видов *S. nematodiphila* DZ0503SBS1^T и *S. surfactantfaciens* YD25^T.

Суммируя филогенетические и физиологические-биохимические признаки, штамм 22S мы отнесли к роду *Serratia* и обозначили как штамм *Serratia* sp. 22S.

Поскольку известно, что бактерии рода *Serratia* могут вызывать оппортунистические инфекции у госпитализированных больных, была проведена оценка патогенности клеток штамма 22S на

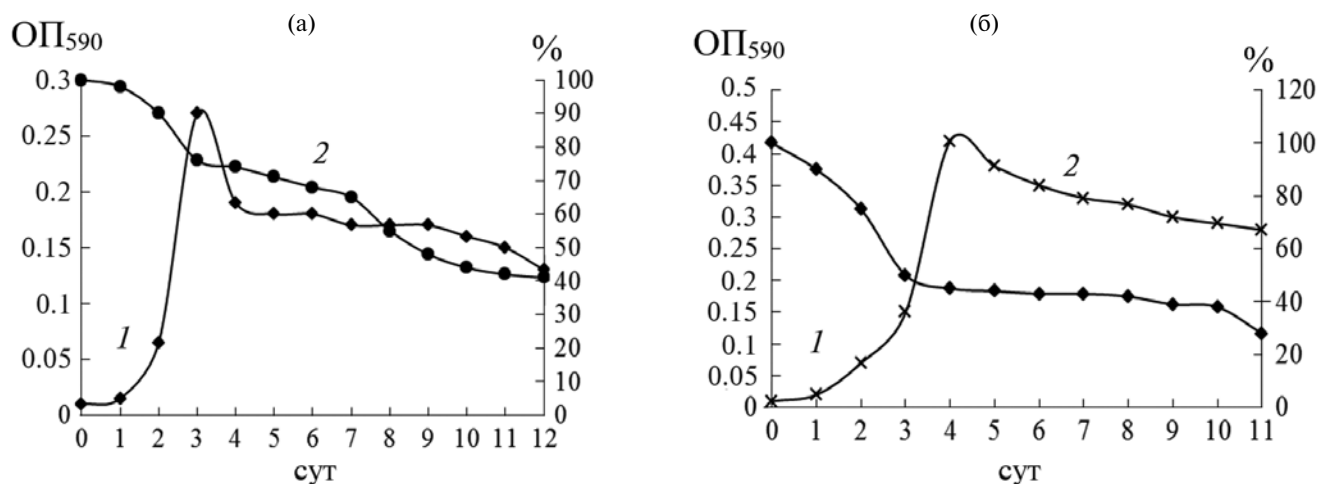


Рис. 3. Зависимость ОП₅₉₀ (I) культуральной жидкости и концентрации 2,4-Д (а, 2) и 2,4,5-Т (б, 2) от времени культивирования *Serratia* sp. 22S в периодической культуре:

основании изучения его вирулентности, токсичности, инфективности и инвазивности.

Опыты на белых мышах показали, что изолят не обладал токсическими свойствами, а средне-вирулентную дозу установить не удалось (т.е. она превышает 10^9 кл./мл). Клинические проявления развития заболевания также не отмечались, а на вскрытии при визуальном осмотре патологических изменений внутренних органов не выявлено. В крови и внутренних органах опытных мышей исследуемого микроорганизма также не обнаружено.

На основании вышеизложенного следует, что изучаемый штамм не является патогенным.

В периодической культуре штамм *Serratia* sp. 22S был способен разделять хлорфеноксиуксусные кислоты в качестве единственного источника углерода и энергии (рис. 3).

При выращивании на 2,4-Д (рис. 3а) значение оптической плотности клеточной суспензии достигало максимальной величины (0.27 ОЕ) на 3 сут культивирования, при этом потребление субстрата составило 24% от исходного. Далее наблюдалось резкое снижение ОП клеточной суспензии и переход культуры в стадию отмирания. Остаточное количество субстрата на 12 сут культивирования составило 42 мг/л.

При использовании 2,4,5-Т максимальное значение ОП наблюдалось на 4 сут культивирования — 0.42, а количество субстрата снижалось за это время до 45 мг/л. К концу культивирования (на 11 сут) количество 2,4,5-Т уменьшалось на 72% от исходного и составило 28 мг/л.

Конверсия 2,4-Д как единственного источника углерода и энергии у бактериальных штаммов исследовалась в различных концентрациях от нескольких мг/л до г/л [18, 31, 32]. В то же время стоит отметить, что штаммов, способных к метаболизму 2,4,5-Т, изолировано значительно меньше. Один из них — *Burkholderia phenoliruptrix* AC1100 — в течение 6 сут утилизировал более 97% 2,4,5-Т в концентрации 1 мг/мл [17]. Другой штамм, *Nocardioideis simplex* 3Е, был способен полностью конвертировать 2,4,5-Т в концентрации 0.04 мМ [14]. Около 200 штаммов, изолированных из почв Вьетнама, оказались деструкторами 2,4,5-Т, их способность тестировалась на солевой среде, содержащей это соединение в концентрации 100 мг/л [13].

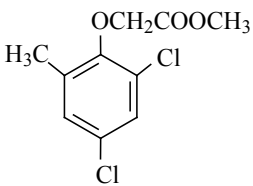
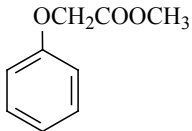
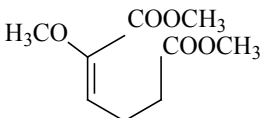
Таким образом, штамм *Serratia* sp. 22S активен в отношении вышеуказанных хлорфеноксиуксусных кислот, причем 2,4,5-Т по сравнению с 2,4-Д являлась более предпочтительным субстратом для данной культуры, несмотря на большее количество атомов хлора в молекуле.

Следует отметить, что штамм 22S также отдельно утилизировал фенол и 2,4-дихлорфенол в концентрации 100 мг/л, что было показано ранее в работе [33].

В среде культивирования штамма *Serratia* sp. 22S было определено присутствие трех соединений, вероятно являющихся интермедиатами пути деградации хлорфеноксиуксусных кислот (табл. 1).

Одной из ключевых стадий аэробной деградации хлорароматических соединений, в отличие от их незамещенных аналогов, является элиминация атома хлора из молекулы субстрата. По классическому пути деградации 2,4-Д, гены

Таблица 1. Масс-спектрометрический анализ метаболитов, образующихся в результате конверсии 2,4,5-Т штаммом *Serratia* sp. 22S

Интермедиат	Основные пики в масс-спектре m/z , %	Наименование
	M^+ 264 (30), 233 (30), 19 (100), 175 (25), 147 (30), 87 (15), 59 (20)	2,4-Дихлор-6-метилфеноксиуксусная кислота, метиловый эфир
	M^+ 166 (50), 107 (120), 77 (80)	Феноксиуксусная кислота, метиловый эфир
	M^+ 45 (100), 55 (20), 59 (8), 87 (5), 115 (6), 129 (20), 125 (2), 188 (0.1)	2-Гидрокси-2-гексендионовая кислота, метиловый эфир

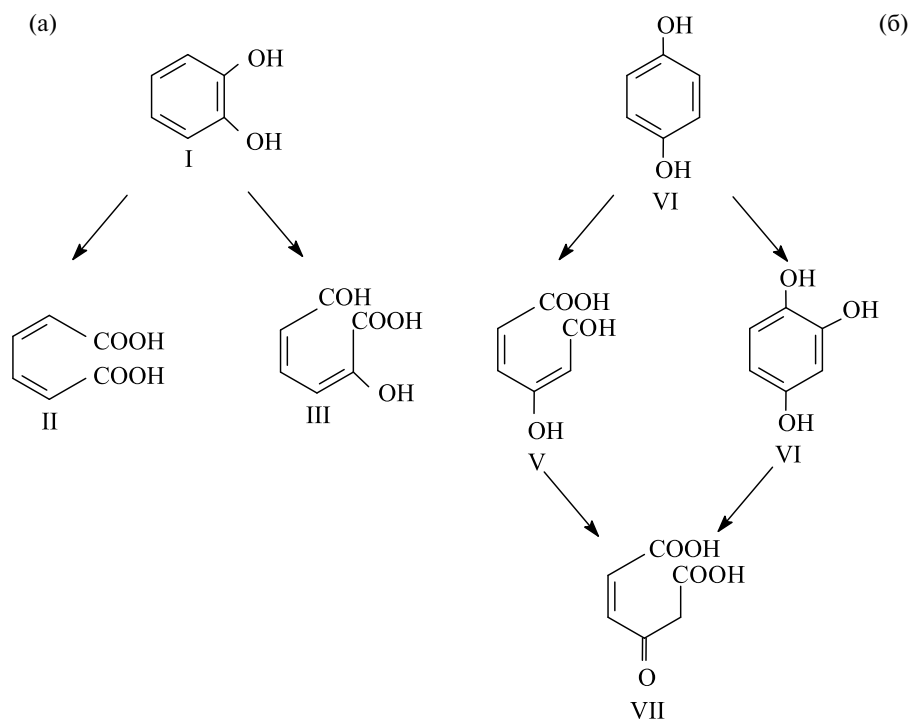


Рис. 4. Основные пути аэробного расщепления ароматического кольца катехола (а) и гидрохинона (б) [35, 36]: I — катехол, II — муконовая кислота, III — 2-гидроксимуконовый полуальдегид, IV — гидрохинон, V — 4-гидроксимуконовый полуальдегид, VI — гидроксигидрохинон, VII — 4-малеилуксусная кислота.

которого локализируются на плазмиде rJP4 штамма *C. pinatubonensis* JMP134, 2,4-Д через 2,4-дихлорфенол конвертируется до 3,5-дихлоркатехола, а затем происходит орто-разрыв его ароматического кольца с последовательной элиминацией двух атомов хлора [4]. Такой путь, когда хлор удаляется после раскрытия ароматического кольца, свойственен подавляющему большинству штаммов, выполняющих конверсию 2,4-Д.

Однако устранение галогена может происходить и перед разрывом ароматического кольца, что особенно характерно для конверсии полихлорированного субстрата. Аэробное разложение 2,4,5-Т штаммом *B. phenoliruptrix* AC1100 инициируется удалением остатка уксусной кислоты с образованием 2,4,5-трихлорфенола (**2,4,5-ТХФ**). Далее происходит замена первых двух атомов хлора на гидроксильные группы, а последний третий атом хлора элиминируется во время реакции восстановительного дехлорирования, в результате чего происходит образование 2-гидрокси-1,4-бензохинона [11, 12].

Штамм *Nocardiodes simplex* 3Е помимо классической деградации 2,4,5-Т через образование 2,4,5-ТХФ, вероятно, имеет альтернативный вариант превращения первоначального субстрата, так как среди метаболитов пути были обнаружены 4-хлор- (**4-ХФУК**) и 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислоты [14].

В пути деградации 2,4-Д у штамма *Azotobacter chroococcum* MSB-1 происходит трансформация первоначального субстрата до 4-ХФУК с элиминацией молекулы хлора и заменой ее на водород [34].

Необходимо отметить, что исследованные ранее штаммы *Raoultella planticola* 33–4ch, *Raoultella planticola* 36D, *Raoultella planticola* 36T и *Cellulosimicrobium* sp. NPZ-121 также осуществляли восстановительное дехлорирование 2,4,5-Т с образованием 2,4-Д [35], 4-ХФУК и далее феноксиуксусной кислоты (ФУК) [25, 35].

Присутствие среди метаболитов катаболизма 2,4,5-Т у штамма 22S метильных производных 2,4-Д, а также ФУК, свидетельствовало о том, что культура осуществляла полное восстановительное дегалогенирование субстрата перед разрывом ароматического кольца.

Второй ключевой стадией конверсии (хлор) ароматических соединений является расщепление ароматического кольца. Сначала в молекулу субстрата вводится один или два атома кислорода, в результате чего происходит формирование дигидроксильного бензольного кольца с образованием центрального метаболита пути — катехола, либо гидрохинона или их производных. Далее происходит непосредственное раскрытие ароматического кольца, которое катализируется диоксигеназами. Когда субстратом реакции является катехол, расщепление может происходить как между

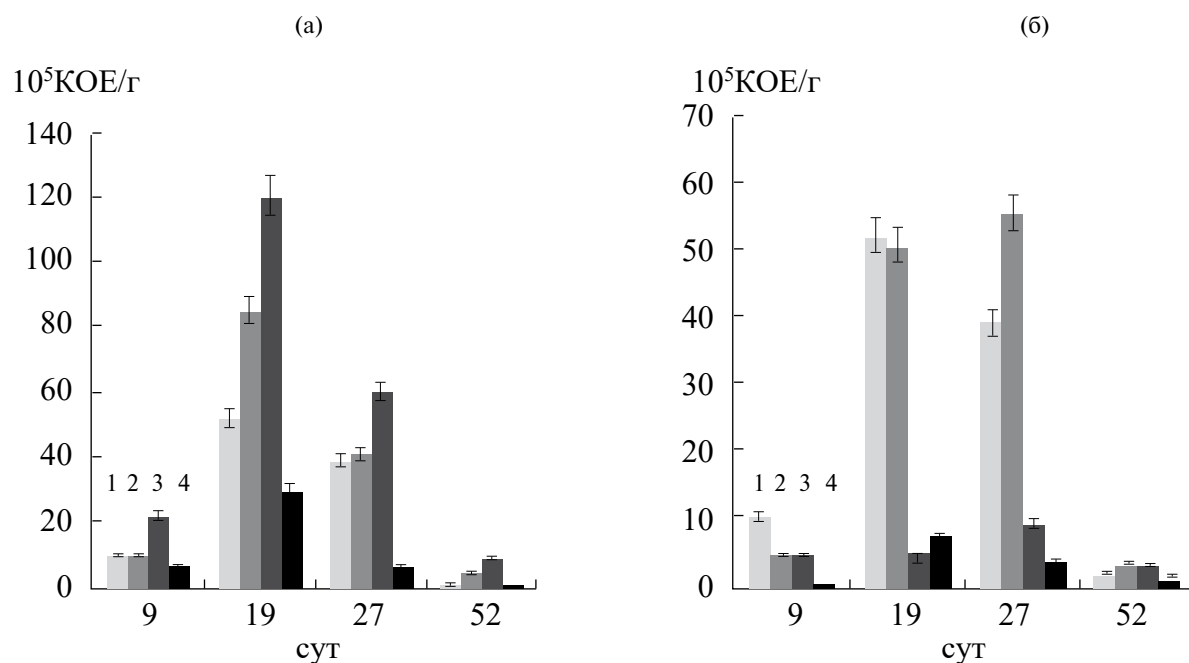


Рис. 5. Численность клеток штамма *Serratia* sp. 22S (KOE) в чистой (1) и загрязненной 2,4,5-Т (а) и 2,4-Д (б) почве при 100 ПДК (2), 1000 ПДК (3) и 10000 ПДК (4).

гидроксильными группами (*орто*-расщепление), так и по соседству с одним из гидроксильных групп (*мета*-расщепление, рис. 4) [36, 37].

Обнаруженное в среде культивирования штамма 22S соединение — 2-гидрокси-2-гексендионовая кислота, вероятно, является продуктом реакции расщепления ароматического кольца. Наличие гидроксильной группы при втором атоме углерода рядом с одной из карбоксильных групп интермедиата свидетельствовало о происходящем метараскрытии ароматического кольца катехола как вероятного центрального метаболита пути (рис. 4). При классическом *мета*-расщеплении катехола образуется 2-гидроксимуконный полуальдегид, альдегидная группа которого затем может подвергнуться окислению с образованием соответствующей кислоты, как это видно в пути расщепления гидрохинона.

Необходимо отметить, что классическим путем деградации хлорароматических соединений у бактерий считается модифицированный *орто*-путь расщепления хлоркатехола, а *мета*-путь больше характерен для метаболизма метилароматических углеводородов [36].

Ранее в культуральных средах штаммов *R. planticola* 33–4ch, *R. planticola* 36D, *R. planticola* 36T, а также *Cellulosimicrobium* sp. NPZ-121 было обнаружено соединение 2-кет-3-метилмуконный полуальдегид, которое также является производным 2-гидроксимуконного полуальдегида [25, 35]. На основании сходных промежуточных метаболитов можно предположить существование единого

для изучаемого штамма и вышеперечисленных де-структоров пути катаболизма хлорфеноксиуксусных кислот посредством полного восстановительного дехлорирования субстрата с последующим мета-разрывом ароматического кольца катехола.

Для проверки предположения о возможной роли катехола в качестве центрального метаболита пути деградации хлорфеноксиуксусных кислот у штамма *Serratia* sp. 22S был проведен опыт с бактериальными клетками, выращенными отдельно на 2,4-Д или 2,4,5-Т как единственных источниках углерода и энергии.

Инкубация интактных клеток в фосфатно-натриевом буфере, содержащем 100 мг/л катехола, с последующей спектрофотометрией показала, что по сравнению с контролем происходило смещение основного пика поглощения катехола (274.0 нм) в длинноволновую область спектра и появление нового пика при 375.0 нм. При этом среда инкубации окрашивалась в желто-оранжевый цвет, что указывало на формирование 2-гидроксимуконного полуальдегида, который образуется из катехола при мета-разрыве ароматического кольца. Следует отметить, что при формировании муконной кислоты, продукта орто-разрыва ароматического кольца катехола, наблюдалось бы смещение максимума поглощения в коротковолновый участок спектра. Отрицательный результат реакции Ротера, которая детектирует превращение муконной кислоты в β -кетoadипат, также показал отсутствие активности ферментов β -кетoadипатного пути.

Полученные результаты подтвердили предположение о том, что деградация 2,4-Д и 2,4,5-Т у штамма 22S идет единым путем через образование катехола с последующим мета-расщеплением его ароматического кольца.

Традиционное изучение бактерий-деструкторов на лабораторных питательных средах, важное для понимания различных аспектов их биологии, не объясняет поведения данных микроорганизмов в почвенных условиях. В связи с этим необходимым этапом исследований является изучение потенциальных интродуцентов в модельных экосистемах, позволяющее оценить их адаптенность и приживаемость в составе почвенного микробиоценоза.

В модельных системах “почва—интродуцент” и “почва—интродуцент—гербицид” была изучена приживаемость штамма 22S в нестерильной почве, а также адаптенность культуры к высоким концентрациям гербицидов 2,4-Д и 2,4,5-Т (рис. 5). Наличие маркера (способность к конверсии гербицидов) обеспечило возможность контроля за их развитием в почве путем высева почвенных суспензий на бедную агаризованную среду М9 с 2,4-Д/2,4,5-Т в качестве единственного источника энергии.

Анализ плотности популяции клеток штамма 22S в модельной системе “почва—интродуцент” показал, что численность штамма поддерживалась на достаточно высоком уровне — порядка 10^5 кл./г почвы на протяжении всего опыта (52 сут). При этом в начале опыта, по-видимому, происходила адаптация культуры к новым условиям, а после 9 сут титр штамма увеличился почти в 5 раз, а затем начал снижаться и к 27 сут стабилизировался на уровне $1.5\text{--}1.8 \times 10^5$ кл./г почвы и сохранялся таким до конца эксперимента.

В модельной системе “почва—интродуцент—гербицид” при содержании 2,4-Д в 100 ПДК с 9 по 37 сут наблюдался рост титра клеток более чем в 12 раз, затем происходило его снижение до уровня 3×10^5 кл./г почвы. В почвенных сосудах с концентрацией 2,4-Д в 1000 и 10000 ПДК не происходило увеличение титра клеток штамма, вероятно, такие высокие концентрации гербицида подавляли его рост.

При исследовании способности к адаптации и приживаемости штамма 22S при высоких концентрациях 2,4,5-Т наилучшие результаты наблюдались при использовании более высокой, чем для 2,4-Д, концентрации гербицида — 1000 ПДК, при этом титр штамма на 19 сут вырос до значения 1.3×10^7 . Далее происходило снижение и стабилизация биомассы культуры до 9×10^5 кл./г почвы.

Проведенные эксперименты выявили хорошую адаптенность и приживаемость штамма 22S

в почве, причем содержание хлорфеноксиуксусных кислот до определенной концентрации (2,4-Д не выше 100 ПДК, а 2,4,5-Т не выше 1000 ПДК) оказывали положительное влияние на динамику роста культуры, вероятно в результате их селективирующего воздействия.

Полученные результаты показали, что природный штамм *Serratia* sp. 22S способен использовать в своем метаболизме (хлор)ароматические соединения, включая хлорфеноксиуксусные кислоты. На основании идентифицированных промежуточных метаболитов предложен единый путь конверсии хлорфеноксиуксусных кислот у штамма 22S посредством полного восстановительного дехлорирования субстрата с последующим мета-разрывом ароматического кольца катехола. Эксперимент с интактными клетками подтвердил наличие активности фермента мета-расщепления ароматического кольца катехола. Была показана безопасность применения изучаемой культуры для человека и животных, а также ее высокая адаптенность и приживаемость в почве. Следовательно, штамм *Serratia* sp. 22S может быть перспективным для применения как агента ремедиации территорий, загрязненных хлорфеноксиуксусными кислотами.

При проведении исследований использовали оборудование ЦКП “Агидель” УФИЦ РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России по теме № 220131100163-4 “Межвидовые взаимодействия в микробных сообществах и растительно-микробных ассоциациях естественных и техногенных экосистем (генетические, биохимические и биотехнологические аспекты)”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. Исследования на лабораторных мышах проводили в строгом соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей (European Treaty Series, № 123).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Nguyen T. L. A., Dao A. T. N., Dang H. T. C., Koekkoek J., Brouwer A. de Boer T. E., van Spanning R. J. M.* // *Biodegradation*. 2022. V. 33. P. 301–316. <https://doi.org/10.1007/s10532-022-09982-1>
2. *Donald D. B., Cessna A. J., Sverko E., Glozier N. E.* // *Environ. Health Perspect.* 2007. V. 115. № 8. P. 1183–1191. <https://doi.org/10.1289/ehp.9435>
3. *Watanabe K.* // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2001. V. 12. № 3. P. 237–241. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(00\)00205-8](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(00)00205-8)

4. Don R. H., Weightman A. J., Knackmuss H. J., Timmis K. N. // J. Bacteriol. 1985. V. 161. P. 85–90.
5. Fulthorpe R. R., McGowan C., Maltseva O. V., Holben W. E., Tiedje J. M. // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. P. 3274–3281.
6. McGowan C., Fulthorpe R., Wright A., Tiedje J. M. // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. № 10. P. 4089–4092.
7. Cavalca L., Hartmann A., Rouard N., Soulas G. // FEMS Microb. Ecol. 1999. V. 29. P. 45–58.
8. Vallaeys T., Courde L., McGowan C., Wright A., Fulthorpe R. R. // FEMS Microb. Ecol. 1999. V. 28. P. 373–382.
9. Sakai Y., Ogawa N., Fujii T., Sugahara K., Miyashita K., Hasebe A. // Microbes Environ. 2007. V. 22. P. 145–156.
10. Baelum J., Jacobsen C. S., Holben W. E. // Syst. Appl. Microbiol. 2010. V. 33. P. 67–70.
11. Daubaras D. L., Saido K., Chakrabarty A. M. // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. № 11. P. 4276–4279.
12. Zaborina O., Daubaras D. L., Zago A., Xun L., Saido K., Klem T., Nikolic D., Chakrabarty A. M. // J. Bacteriol. 1998. V. 180. № 17. P. 4667–4675.
13. Huong N. L., Itoh K., Suyama K. // Microbes Environ. 2007. V. 22. P. 243–256.
14. Golovleva L. A., Pertsova R. N., Evtushenko L. I., Baskunov B. P. // Biodegradation. 1990. V. 1. № 4. P. 263–271.
15. Rice J. F., Menn F.-M., Hay A. G., Sanseverino J., Sayler G. S. // Biodegradation. 2005. V. 16. P. 501–512. <https://doi.org/10.1007/s10532-004-6186-8>
16. Hayashi S., Sano T., Suyama K., Itoh K. // Microbiol. Res. 2016. V. 188–189. P. 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.04.014>
17. Kilbane J. J., Chatterjee D. K., Karns J. S., Kellogg S. T., Chakrabarty A. M. // Appl. Environ. Microbiol. 1982. V. 44. № 1. P. 72–78.
18. Соляникова И. П., Протопопова Я. Ю., Травкин В. М., Головлева Л. А. // Биохимия. 1996. Т. 61. № 4. С. 635–642.
19. Han L., Zhao D., Li C. // Braz. J. Microbiol. 2015. V. 46. № 2. P. 433–441. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246220140211>
20. Manual of Methods for General Bacteriology. / Ed. P. Gerhardt. Washington: American Society for Microbiology, 1981. 536 p.
21. Birnboim H. C., Doly J. // Nucleic Acids Res. 1979. V. 7. № 6. P. 1513–1523.
22. Lane D. J. 16S/23S Sequencing // Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. / Eds. E. Stackebrandt and M. Goodfellow. Chichester: John Wiley & Sons, 1991. P. 115–175.
23. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
24. Методы определения микроколичеств пестицидов. / Ред. Клисенко М. А. М.: Медицина, 1984. 256 с.
25. Zharikova N. V., Iasakov T. R., Zhurenko E. I., Korobov V. V., Markusheva T. V. // Appl. Biochem. Microbiol. 2021. Т. 57. № 3. P. 335–343. <https://doi.org/10.1134/S0003683821030157>
26. Миронов А. Д., Крестьянинов В. Ю., Корженевич В. И., Евтушенко И. Я., Барковский А. Л. // Прикл. биохимия и микробиология. 1991. Т. 27. № 4. С. 571–576.
27. Головлева Л. А., Перцова Р. Н. // Доклады Академии наук СССР. 1990. Т. 314. № 4. С. 981–983.
28. Ajithkumar B., Ajithkumar V. P., Iriye R., Doi Y., Sakai T. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2003. V. 53. P. 253–258. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02158-0>
29. Doijad. S., Chakraborty T. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2019. V. 69. P. 3924–3926.
30. Cho G. S., Stein M., Brinks E., Rathje J., Lee W., Suh S. H., Franz C. M. A. P. // Syst. Appl. Microbiol. 2020. V. 43. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126055>
31. Zabalo M. C., Gómez M. A. // Argentina Annals of Microbiology. 2014. V. 64. P. 969–974. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0731-9>
32. Жарикова Н. В., Ясаков Т. Р., Журенко Е. Ю., Коробов В. В., Маркушева Т. В. // Успехи современной биологии. 2017. Т. 137. № 5. С. 514–528. <https://doi.org/10.7868/S0042132417050076>
33. Коробов В. В., Маркушева Т. В., Кусова И. В., Журенко Е. Ю., Галкин Е. Г., Жарикова Н. В., Гафиятова Л. Р. // Биотехнология. 2006. № 2. С. 63–65.
34. Balajee S., Mahadevan A. // Xenobiotica. 1990. V. 20. № 6. P. 607–617. <https://doi.org/10.3109/00498259009046876>
35. Korobov V. V., Zhurenko E. Y., Galkin E. G., Zharikova N. V., Iasakov T. R., Starikov S. N., Sagitova A. I., Markusheva T. V. // Microbiology. 2018. Т. 87. № 1. С. 147–150. <https://doi.org/10.1134/S0026261718010101>
36. Harwood C. S., Parals R. E. // Ann. Rev. Microbiol. 1996. V. 50. P. 553–590. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.553>
37. Enguita F. J., Leitão A. L. // Biomed Res. Int. 2013. V. 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/542168>

Metabolic Potential of *Serratia* sp. 22S for Chlorphenoxyacetic Acids Conversion

N. V. Zharikova^{a, *}, E. I. Zhurenko^a, V. V. Korobov^a, L. G. Anisimova^b, and G. E. Aktuganov^a

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

^bResearch Technological Institute of Herbicides and Plant Growth Regulators with Pilot Production Academy of Sciences of Republic of Bashkortostan, Ufa, 450029 Russia

*e-mail: puzzle111@yandex.ru

A bacterial strain 22S belonging to the genus *Serratia* was isolated from soil samples contaminated with chemical production wastes. The strain was found to be non-pathogenic based on the study of its virulence, toxicity, infectivity and invasiveness. In batch culture, *Serratia* sp. 22S was able to separately utilize chlorophenoxyacetic acids (100 mg/L) as the sole source of carbon and energy. The catabolism pathway for chlorophenoxyacetic acids were suggested through complete reductive dechlorination of the substrate followed by *meta*-cleavage of the aromatic ring of catechol based on the compounds found in the culture medium (2,4-dichloro-6-methylphenoxyacetic, phenoxyacetic, and 2-hydroxy-2-hexenedioic acids). Intact cells experiments confirmed this assumption. In model systems, good adaptability and survival of the 22S strain in the soil was revealed, and the content of chlorophenoxyacetic acids up to a certain concentrations had a positive effect on the growth of the strain, most likely due to its selective effect.

Keywords: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid, chlorophenoxy herbicides, 2-hydroxymuconic semialdehyde, *Serratia*

УДК 579.64:571.27:633.11

ДОЗАЗАВИСИМЫЕ ЭФФЕКТЫ ЛЕКТИНА АЗОСПИРИЛЛ НА РОСТ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ В УСЛОВИЯХ СОЛЕВОГО СТРЕССА

© 2024 г. С. А. Аленкина^{1, *}, М. А. Купряшина¹

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ «Саратовский научный центр РАН» (ИБФРМ РАН), Саратов, 410049 Россия

*e-mail: s.alenkina@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.06.2023 г.

После доработки 09.08.2023 г.

Принята к публикации 31.08.2023 г.

Исследовали дозозависимое действие лектина *A. brasiliense* Sp7 на корни 4-дневных проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L. сорта Саратовская 29), выращенных в условиях смоделированного солевого стресса. В корнях проростков пшеницы в условиях засоления лектин повышал активность пероксидазы и супероксиддисмутазы, но снижал активность каталазы. В корнях проростков, подвергшихся стрессу, лектин снижал общее содержание белка и перекисное окисление липидов, вызывающее повреждение мембраны, но увеличивал содержание вторичных метаболитов, таких как общее количество фенолов и флавоноидов. Сделан вывод об участии лектинов азоспирилл в адаптационных изменениях корней проростков пшеницы, благодаря которым взаимоотношения бактерий и их хозяев могут регулироваться при изменении почвенно-климатических факторов.

Ключевые слова: ассоциативные бактерии, *Azospirillum*, пшеница, лектин, солевой стресс, вторичные метаболиты

DOI: 10.31857/S0555109924010067, **EDN:** HCNLNC

Засоление почвы является одним из основных абиотических стрессов, который ограничивает рост и продуктивность растений. Пшеница (*Triticum aestivum* L. сорта Саратовская 29) умеренно солеустойчива, однако ее урожайность сильно снижается при высоких уровнях солености. Исследования приспособления растений к засолению показывают, что этот процесс в онтогенезе протекает неравномерно. Наибольшую чувствительность к высоким концентрациям солей проявляют растения на первых стадиях развития, то есть при прорастании семян и появлении всходов [1]. Основной ущерб растениям, обусловленный засолением, вызван накоплением ионов натрия, которые токсичны для большинства организмов [2, 3]. NaCl является преобладающей солью в большинстве засоленных сред. Когда корни растений находятся в среде с высоким содержанием NaCl, внешние Na^+ и Cl^- создают большой электрохимический градиент, который стимулирует приток ионов соли, нарушая ионный гомеостаз и в конечном итоге повреждая проростки [4, 5]. Корень — это часть растения, непосредственно контактирующая с солями и реагирующая на солевой стресс, посылая химические сигналы через стебель листву [6]. Засоление вызывает окислительный стресс у растений, причинами которого являются образование активных форм кислорода, таких как супероксид (O_2^-), пероксид

водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал ($\cdot\text{OH}$) и синглетный кислород ($^1\text{O}_2$). Активные формы кислорода обладают чрезвычайно высокой реакционной способностью и в конечном итоге приводят к апоптозу и гибели клеток [7, 8]. Однако растения разработали эффективные ферментативные антиоксидантные системы для предотвращения окислительного повреждения [9]. Супероксиддисмутаза (КФ 1.15.1.1) превращает O_2^- в H_2O_2 . Каталаза (КФ 1.11.1.6) и различные пероксидазы (КФ 1.11.1.7) катализируют расщепление H_2O_2 . Эффективность антиоксидантных ферментов гасить O_2^- и H_2O_2 связана со стрессоустойчивостью растения [7].

Среди первичных механизмов повреждения клеток при окислительном стрессе лидирует перекисное окисление остатков жирных кислот в мембранных фосфолипидах. При этом снижается их гидрофобность и нарушается стабильность мембран, изменяется работа мембраносвязанных ферментов, повышается проницаемость мембран для ионов, исчезает способность избирательно накапливать вещества. В этом случае соли попадают в клетку пассивно, что еще больше увеличивает повреждение [7]. Как правило, процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивают по скорости и количеству образования одного из конечных продуктов окисления — малонового диальдегида (МДА).

Окислительное повреждение белков заключается в модификации аминокислот, разрыве пептидной цепи, агрегации сшитых продуктов реакции и т.д., тогда как окисление некоторых аминокислотных остатков приводит к образованию оксогрупп, которые усиливают восприимчивость белков к протеолизу [10].

Считается, что флавоноиды являются участниками антиоксидантной защиты клеток, так как являются ловушками для свободных радикалов, а также способны хелатировать ионы металлов, участвующие в радикальных процессах [11].

Изучение потенциала химических веществ, регулирующих рост растений, для минимизации образования свободных радикалов и смягчения повреждения мембран является ступенькой к управлению солевым стрессом у растений [12]. Учитывая необходимость экологизации сельского хозяйства, актуальным является поиск веществ, продуцируемых высшими растениями, грибами и микроорганизмами. Большинство почвенных микроорганизмов могут колонизировать растения, связываясь с ними и усиливая рост и урожайность. Эти микроорганизмы обычно называют ризобактериями, способствующими росту растений (PGPR — Plant Growth-Promoting Rhizobacteria). Среди PGPR представители рода *Azospirillum* хорошо известны и широко используются в сельском хозяйстве [13]. Азотфиксирующие азоспириллы привлекли внимание из-за их роста в тесной связи с корнями различных трав и злаков, их широкого географического распространения и стимулирования роста и развития растений. Эти бактерии приносят пользу растениям несколькими прямыми и косвенными способами. Положительные эффекты объясняются биологической фиксацией азота; производством растительных гормонов, таких как индолилуксусная кислота, которые способствуют развитию корней и увеличивают поглощение воды и питательных веществ; производством соединений, повышающих мембранную активность и пролиферацию тканей корня; смягчением последствий стрессора и борьбой с многочисленными патогенами растений [13]. Механизмы биоконтроля, опосредованного растениями, включают способность бактерий вызывать защитные реакции растений, повышающие устойчивость [14]. В последнее время гораздо больше внимания уделяется анализу роли PGPR в улучшении роста растений в условиях стресса [15].

Бесспорным фактом является участие лектинов, молекул белковой природы в установлении межклеточных биологических взаимодействий, в том числе N_2 -фиксирующих систем. Долгое время считалось, что при взаимодействии углеводов с белками при образовании N_2 -фиксирующих ассоциаций и симбиозов растительные лектины действуют как узнающие молекулы [16]. Однако появились новые данные для лектинов N_2 -фиксирующих бактерий,

которые подчеркивают роль бактериальных лектинов в таких взаимодействиях [17, 18]. Никитина с соавт. [18] показали, что взаимодействие азоспирилл с корнями начинается как взаимодействие лиганд-рецептор и что лектины поверхности бактерий наряду с другими факторами участвуют в этом процессе. С поверхности бактерий *A. brasilense* Sp7 был выделен лектин, являющийся полифункциональным гликопротеином [18]. Эффекты этого лектина, такие как стимулирование прорастания семян, митогенная и фермент-модифицирующая активности, а также способность изменять содержание стрессовых метаболитов в растительных клетках являются дозозависимыми [19–22]. Многие лектин-индуцированные эффекты были зафиксированы при низких концентрациях лектина.

По-видимому, как и другие регуляторы роста, лектины могут оказывать дозозависимое действие на устойчивость пшеницы при солевом стрессе.

Цель работы — исследование влияния различных концентраций лектина на активность антиоксидантных ферментов, общее содержание белка, перекисное окисление липидов и содержание вторичных метаболитов, таких как общее количество фенолов и флавоноидов в корнях проростков пшеницы.

МЕТОДИКА

Получение препаратов лектинов. Лектин выделяли с поверхности клеток штамма *A. brasilense* Sp7 (IBPPM 150) из коллекции ризосферных микроорганизмов Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (<http://collection.ibppm.ru>). Очистку белка и определение лектиновой активности проводили как было описано ранее [21].

Стерилизация семян, получение корней проростков и их предобработка препаратами лектинов. Семена пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта “Саратовская 29” (ГНУ НИИ Сельского хозяйства Юго-Востока РСХА, Россия) были поверхностно стерилизованы в 70%-ном (об./об.) этаноле 1 мин, затем пятикратно отмыты стерильной водой. Семена проращивали в асептических условиях в чашках Петри на стерильной дистиллированной воде и инкубировали в темноте при 25°C. Для экспериментов были использованы корни четырехдневных проростков. Для изучения влияния лектина и засоления на изучаемые параметры, корни проростков выдерживали в течение 2 ч либо в растворе 1%-ного NaCl, либо в растворах лектина (концентрации 0.1–1.2 мМ) и 1%-ного NaCl.

Определение активности антиоксидантных ферментов. Свежие корни (0.5 г) гомогенизировали отдельно в 4 мл 50 мМ натрий-фосфатного буфера (pH 7.0), содержащего 0.1 мМ ЭДТА- Na_2 , 1%-ный (масса/об.) поливинилпирролидон и 0.05% (масса/об.) Triton X-100 в ледяной бане.

Гомогенат центрифугировали при 12000 g в течение 15 мин при 4°C. Надосадочную жидкость использовали для определения активности супероксиддисмутазы (СОД), пероксидазы (ПО) и каталазы (КАТ) в соответствии с методиками, описанными Хайруллиным с соавт. [23], Эби [24] и Альшер с соавт. [25] соответственно.

Определение растворимого белка. Надосадочную жидкость использовали также для определения содержания белка в корнях по методу Бредфорда [26], используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта.

Определение содержания фенольных соединений и флавоноидов. Свежие корни экстрагировали в течение 20 мин 50%-ным метанолом. Экстракты фильтровали под вакуумом с использованием фильтровальной бумаги Whatman № 1 (“Sigma-Aldrich”, США). В экстрактах спектрофотометрическим методом определяли суммарное количество растворимых фенольных соединений с реактивом Фолина–Дениса (поглощение при 725 нм) [27] и содержание флавоноидов по реакции с 1%-ным водным раствором хлористого алюминия (поглощение при 415 нм) [28]. Для сравнительного анализа вариантов содержание определяемых веществ выражали в% к контролю. За 100% принимали количество фенолов и флавоноидов, содержащихся в клетках контрольных корней.

Определение интенсивности ПОЛ. Перекисное окисление липидов в ткани листьев определяли

путем измерения количества малонового диальдегида (МДА) с использованием тиобарбитуровой кислоты. Свежие корни проростков (1 г) гомогенизировали в 4.0 мл 10%-ной трихлоруксусной кислоты и центрифугировали при 5000 g в течение 10 мин при 4°C. Надосадочную жидкость анализировали на МДА по методу Ву с соавт. [29]. Для расчета содержания МДА использовали коэффициент молярной экстинкции, равный $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Содержание МДА выражали в мкмоль/г сырого веса. Для сравнительного анализа вариантов содержание МДА выражали в% к контролю. За 100% принимали количество МДА, содержащегося в клетках контрольных корней.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку данных проводили с использованием дисперсионного анализа (ANOVA) с помощью пакета программ “AGROS” для статистического анализа (версия 2.09, Департамент статистического анализа Российской академии сельскохозяйственных наук). Результаты представлены как средние арифметические значения со стандартной ошибкой (объем выборки $n = 3$). Варианты, достоверно различающиеся по критерию Фишера (F-критерию) при $p \leq 0.05$, обозначены в таблицах с результатами разными буквами латинского алфавита.

Таблица 1. Влияние лектина *A. brasilense* Sp7 на активность пероксидазы, каталазы и СОД в корнях проростков пшеницы при воздействии смоделированного засоления

Лектин, мМ	Время инкубации, мин			
	15	30	60	120
Пероксидаза				
Контроль	3.0	3.4	3.8	4.0
0.1	105 ± 2a	102 ± 2a	110 ± 2b	110 ± 2a
0.3	110 ± 3b	110 ± 4b	112 ± 3b	105 ± 4a
0.6	120 ± 2c	160 ± 4d	120 ± 3c	100 ± 2a
1.2	122 ± 5c	175 ± 2c	120 ± 2c	98 ± 3a
Каталаза				
Контроль	10	15	20	22
0.1	98 ± 2a	100 ± 3a	65 ± 3c	89 ± 3b
0.3	100 ± 3a	98 ± 4a	71 ± 4d	100 ± 4a
0.6	98 ± 3a	96 ± 2a	85 ± 2d	98 ± 3a
1.2	100 ± 2a	100 ± 3a	95 ± 3b	96 ± 2a
СОД				
Контроль	0.8	1.5	2.0	2.4
0.1	100 ± 3a	100 ± 3a	105 ± 2a	110 ± 4b
0.3	100 ± 2a	105 ± 4a	115 ± 3b	115 ± 4b
0.6	100 ± 4a	110 ± 3b	150 ± 4c	105 ± 3a
1.2	110 ± 3b	115 ± 2b	110 ± 3b	110 ± 2b

Примечание. Результаты представлены как средние арифметические значения со стандартной ошибкой. Разными буквами обозначены достоверно отличающиеся величины ($P < 0.05$). За 100% приняты значения активности ферментов в корнях, не подвергавшихся обработке лектином.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Солевой стресс значительно усиливал активность пероксидазы корней в отсутствие лектина. У растений, подвергшихся стрессу, воздействие лектина на корни в течение 30 мин приводило к увеличению активности ПО линейным образом, зависящим от концентрации. Активность достигала пика при 0.6 мМ лектина, увеличение составляло 60%. Через 120 мин инкубации активность фермента снижалась до контрольного значения (табл. 1).

Активность КАТ в корнях увеличивалась при солевом стрессе и существенно снижалась после воздействия на корни лектина в течение 1 ч. Использование лектина в концентрации 1.2 мМ не влияло на активность КАТ у растений, подвергавшихся солевому стрессу, но при 0.1–0.6 мМ лектина активность значительно снижалась. Ингибирование достигало пика при 0.1 мМ лектина (табл. 1).

Активность СОД в корнях значительно повышалась при солевом стрессе. Через 1 ч инкубации в условиях стресса активность изменялась параболически с увеличением концентрации лектина (табл. 1). Наиболее эффективная концентрация лектина составила 0.6 мМ.

Продукт перекисного окисления липидов МДА являлся индикатором окислительного повреждения клеточных мембран. В условиях, имитирующих солевой раствор, воздействие лектина *A. brasilense* Sp7 приводило к максимальному снижению МДА после 60 мин инкубации с корнями проростков. Кроме того, содержание МДА в корнях изменялось параболически с увеличением концентрации лектина и было самым низким при 0.3 мМ лектина в условиях солевого стресса. Необходимо отметить, что обработка NaCl заметно увеличивала содержание МДА в корнях по сравнению с контролем (рис. 1а). В контрольных образцах содержание МДА составляло 3.2 мкмоль/г сырой массы корней.

Еще одним важным показателем защиты растений от стресса является восстановление содержания общего белка. Уменьшение общего содержания белка при стрессе может быть связано с ингибированием синтеза белка и с его деградацией. Солевой стресс приводил к максимальному снижению содержания белка в корнях после обработки в течение часа. Использование 0.3 мМ концентрации лектина значительно нивелировало вызванное стрессом снижение и увеличило содержание белка на 30% по сравнению с растениями, не обработанными лектином. Содержание белка в корнях также увеличивалось при более низкой и более высокой концентрации лектина (0.1 и 0.6 мМ соответственно), но в меньшей степени, чем в предыдущем случае. Однако использование лектина в концентрации 1.2 мМ не приводило к существенному изменению содержания белка в корнях по сравнению

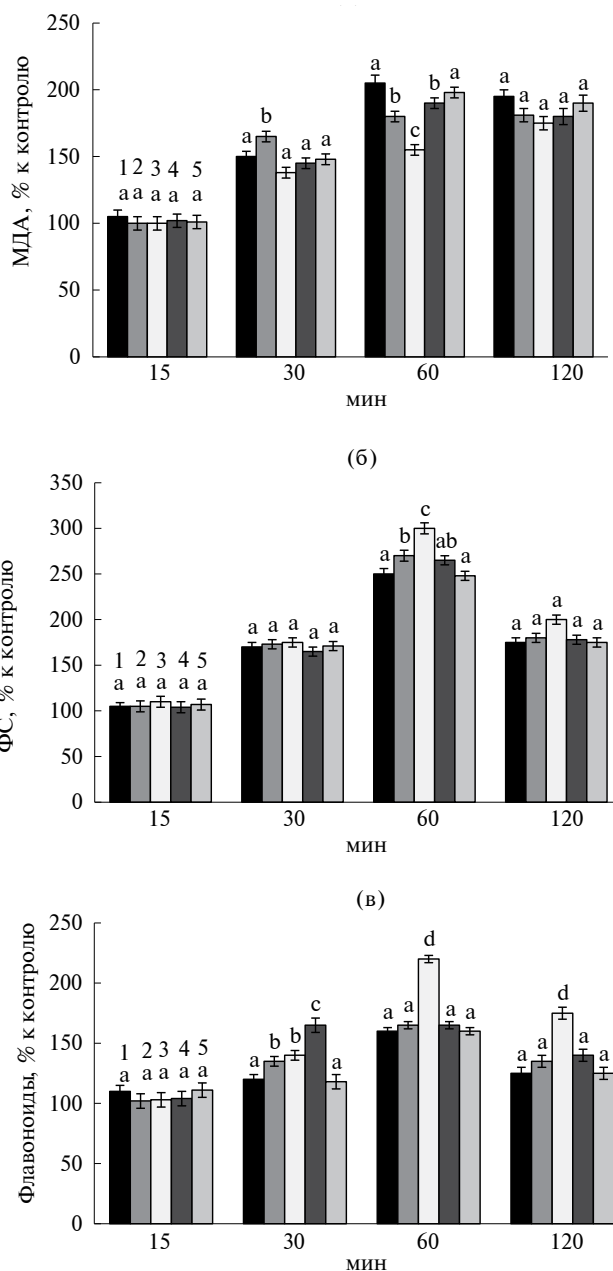


Рис. 1. Влияние лектина (2–5) *A. brasilense* Sp7 на содержание МДА (а), ФС (б) и флавоноидов (в) в корнях проростков пшеницы при засолении: 1 – контроль, без лектина; 2 – 0.1 мМ; 3 – 0.3 мМ; 4 – 0.6 мМ; 5 – 1.2 мМ. Результаты представлены как средние арифметические значения со стандартной ошибкой. Разными буквами обозначены достоверно отличающиеся величины ($P < 0.05$).

с таковым у необработанных лектином растений в условиях солевого стресса (табл. 2).

В условиях, имитирующих солевой стресс, общее содержание фенолов больше всего увеличивалось после 60-минутной инкубации с 0.3 мМ лектина с корнями проростков. Увеличение составило 50% по сравнению с контролем (рис. 1б).

Комбинированное воздействие на корни 0.3 мМ лектина и солевого стресса приводило к увеличению содержания флавоноидов, которое достигало максимума через 1 ч воздействия (непонятно). Увеличение составило 60% по сравнению с контролем (рис. 1в).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Азоспириллы могут синтезировать лектины — гликопротеины, обладающие способностью высокоспецифично связывать остатки углеводов на поверхности растительной клетки. Лектин *A. brasilense* Sp7 способствует росту растений, способен модифицировать активность ферментов, а также может изменять содержание стрессовых метаболитов в клетках растений, что свидетельствует о его способности индуцировать адаптационные процессы в корнях проростков пшеницы [19–21, 30–34].

Засоление является неблагоприятным экологическим фактором, который может снижать урожайность растений более чем на 50%. Засоление почвы в основном происходит из-за хлорида натрия. Самыми легкими мишенями прямого воздействия засоления являются семена и корни растений, поскольку соли в основном концентрируются в верхних слоях почвы [35]. Исследования адаптации растений к засолению показывают, что наибольшую чувствительность к высоким концентрациям солей проявляют растения при прорастании семян и появлении всходов [7].

Результаты данного исследования показали, что лектин *A. brasilense* Sp7 повышал устойчивость корней проростков пшеницы в условиях солевого стресса. NaCl не только непосредственно токсичен для клеточного метаболизма, но также способствует интенсивному образованию АФК и развитию окислительного стресса. Накопление АФК играет центральную роль в реакции растений

на стресс [36]. Инактивация избыточного количества АФК важно для защиты от окислительного повреждения в условиях стресса [12, 37].

Лектин существенно изменял уровень активности антиоксидантных ферментов в корнях, подвергшихся стрессу, уже через несколько минут после стресса. Происходило увеличение активности ПО и СОД и снижение активности КАТ. Наши данные подтверждают результаты Арзанеш с соавт. [38], которые показали, что азоспириллы могут повышать активность ПО и СОД растений при различных абиотических стрессах. Снижение активности КАТ могло быть связано с действием салициловой кислоты, синтез которой индуцируется лектинами азоспирилл [39].

При действии неблагоприятных факторов, в том числе и засоления, происходит ингибирование синтеза белка, увеличение деградации протеинов и в целом нарушение белкового метаболизма, о чем свидетельствует снижение показателя общего растворимого белка [40]. Действительно, в нашем исследовании солевой стресс несколько снижал содержание общего растворимого белка в корнях проростков пшеницы. Низкие концентрации лектина (0.3 мМ) значительно повышали уровень растворимого белка в корнях по сравнению с корнями, не обработанными лектином, в условиях стресса. Этот результат свидетельствует о том, что лектин, проявляя защитный эффект, способствует нормализации белкового метаболизма в условиях засоления.

Наиболее ранние изменения в ответ на неблагоприятные внешние факторы происходят на уровне наружной мембраны растительной клетки — плазмалеммы. Одной из быстрых и неспецифических реакций клеточных мембран, вызванных любым стрессом, является усиление перекисного окисления липидов мембраны, что является основной причиной повреждения и гибели растений. Количество малонового диальдегида — продукта перекисного окисления липидов является, показателем окислительного повреждения клеточных мембран. Предварительная обработка лектином в концентрации 0.3 мМ снижала уровень МДА в корнях, подвергшихся стрессу.

Фенольные соединения являются обязательными компонентами клеток высших растений и выполняют в них различные функции. Они участвуют в окислительно-восстановительных процессах (компоненты электрон-транспортных цепей дыхания и фотосинтеза), иммунных реакциях; они используются в качестве резервного энергетического материала; регулируют рост и развитие растений; защищают клетки от стресса. Обладая высокой реакционной способностью, эти вторичные метаболитические соединения могут инактивировать свободные радикалы, тем самым защищая клетки от АФК. Имеются отдельные данные,

Таблица 2. Влияние лектина *A. brasilense* Sp7 на содержание общего растворимого белка в корнях проростков пшеницы в условиях смоделированного засоления

Лектин, мМ	Растворимый белок			
	Время инкубации, мин			
	15	30	60	120
Контроль	20	15	10	16
0.1	98 ± 2a	100 ± 3a	71 ± 3c	100 ± 3a
0.3	98 ± 3a	96 ± 4a	83 ± 4d	89 ± 4a
0.6	100 ± 3a	98 ± 2a	75 ± 2c	98 ± 3a
1.2	100 ± 2a	100 ± 3a	54 ± 3b	96 ± 2a

Примечание. Результаты представлены как средние арифметические значения со стандартной ошибкой. Разными буквами обозначены достоверно отличающиеся величины ($P < 0.05$). За 100% приняты значения содержания растворимого белка в корнях, не подвергавшихся обработке лектином.

свидетельствующие об увеличении содержания фенолов в стрессовых тканях растений [41]. Фенольные кислоты и флавоноиды являются наиболее распространенными фенольными соединениями в пшенице и встречаются как в свободной, так и в связанной форме в различных концентрациях. Оценка содержания фенолов в корнях проростков пшеницы, обработанных лектинами, показала, что лектин *A. brasilense* Sp7 может значительно увеличить содержание фенольных соединений в корнях в начальный период моделирования солевого стресса.

Таким образом, обработка лектином *A. brasilense* Sp7 оказывает дозозависимое действие на активность антиоксидантных ферментов, ПОЛ, общее содержание растворимого белка и содержание фенолов в корнях пшеницы при солевом стрессе. Настоящие результаты являются дополнением к полученным ранее данным о том, что лектины азоспирилл могут участвовать в адаптации и вызывать индукцию защитных механизмов растений. Было показано, что лектины азоспирилл способны изменять содержание ряда стрессовых метаболитов — пероксида водорода, цАМФ [19], оксида азота, диацилглицерина, салициловой кислоты [21, 30] низкомолекулярных антиоксидантов [34]. Таким образом, протекторный эффект лектинов в растениях носит мультинаправленный (полифункциональный) характер. Это является одной из причин считать эти белки способными повышать выживаемость растений в условиях действия стрессоров и тем самым выполнять роль одного из компонентов общих клеточных защитных систем. Все это позволяет рассматривать лектины как перспективное для практического применения соединения для защиты растений от стресса и повышения их продуктивности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ashraf M., Ahmad S. // Field Crops Research. 2000. V. 66. P. 115–127.
- Munns R., Tester M. // Annual Review of Plant Biology. 2008. V. 59. P. 651–681.
- Dong H. Z., Kong X. Q., Luo Z., Li W. J., Xin C. S. // European Society for Agronomy. 2010. V. 33. P. 285–292.
- Silva P., Facanha A. R., Tavares R. M., Geros H. // Journal of Plant Growth Regulation. 2010. V. 29. P. 23–34.
- Sun J., Wang M. J., Ding M. Q., Deng S. R., Liu M. Q., Lu C. F. et al. // Plant Cell and Environment. 2010. V. 33. P. 943–958.
- Meloni D. A., Oliva M. A., Martinez C. A., Cambraia J. // Environmental and Experimental Botany. 2003. V. 49. P. 69–76.
- Ashraf M. // Biotechnology Advances. 2009. V. 27. P. 84–93.
- Velarde-Buendia A. M., Shabala S., Cvikrova M., Oaxana D., Pottosin I. // Plant Physiology and Biochemistry. 2012. V. 61. P. 18–23.
- Horvath E., Pal M., Szalai G., Paldi E., Janda T. // Biologia Plantarum. 2007. V. 5. P. 1480–1487.
- Georgiadou E. C., Ntourou T., Goulas V., Manganaris G. A., Kalaitzis P., Fotopoulos V. // Front. Plant Sci. 2015. V. 6. P. 871.
- Es-Safi N. E., Kollmann I., Khelifi S., Ducrot P. H. // Food Sci. Technol. 2007. V. 40. P. 1246–1252.
- Verma S., Mishra S. N. // Journal of Plant Physiology. 2005. V. 162. P. 669–677.
- Puente M. L., Gualpa G. L., Lopez G. A., Molina R. M., Carletti S. M., Cassán F. D. // Symbiosis. 2018. V. 76. P. 41–49.
- Bhattacharyya P. N., Jha D. K. // World J. Microbiol. Biotechnol. 2012. V. 28. P. 1327–1350.
- Cassána F., Diaz-Zorita M. // Soil Biology and Biochemistry. 2016. V. 103. P. 117–130.
- Антонюк Л. П., Евсеева Н. В. // Микробиология. 2006. Т. 75. № 4. С. 544–549.
- Castellanos T., Ascencio F., Bashan Y. // Current Microbiology. 1998. V. 36. P. 241–244.
- Нукитина В. Е., Пономарева Е. Г., Аленькина С. А. Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями. / Ред. В. В. Игнатов. М.: Наука, 2005. С. 70–97.
- Alen'kina S. A., Bogatyrev V. A., Matora L. Yu., Sokolova M. K., Chernysheva M. P., Trutneva K. A., Nikitina V. E. // Plant Soil. 2014. V. 381. P. 337–349.
- Alen'kina S. A., Romanov N. I., Nikitina V. E. // Brazilian Journal of Botany 2018. V. 41. P. 579–587.
- Alen'kina S. A., Nikitina V. E. // Appl. Biochem. Microbiol. 2020. V. 56. P. 211–218.
- Alen'kina S. A., Nikitina V. E. // Russian Journal of Plant Physiology. 2021. V. 68. P. 315–321.
- Хайруллин Р. М., Яруллина Л. Г., Трошина Н. Б., Ахметова И. Э. // Биохимия. 2001. Т. 66. № 3. С. 354–358.
- Aebi H. Catalase in Vitro. / Ed. L. Packer. Methods in Enzymology. San Diego: Acad. Press, 1984. P. 121–126.
- Alscher R. G., Erturk N., Heath L. S. // J. Exp. Bot. 2002. V. 53. P. 1331–1341.
- Makkar H. P. S., Sidhuraju P., Becker K. Plant Secondary Metabolites. Totowa: Humana Press, 2007. 496 p.
- Marinova D., Ribarova F., Atanassova M. // Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy. 2005. V. 40. № 3. P. 255–260.
- Wu H. L., Wu X. L., Li Z. H., Duan L. S., Zhang M. C. // Journal of Plant Growth Regulation. 2012. V. 31. P. 113–123.
- Alen'kina S. A., Payusova O. A., Nikitina V. E. // Plant Soil. 2006. V. 283. P. 147–151.
- Чернышева М. П., Аленькина С. А., Нукитина В. Е., Игнатов В. В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 4. С. 444–448.
- Аленькина С. А., Нукитина В. Е. // Микробиология. 2015. Т. 84. № 5. С. 553–560.
- Alen'kina S. A., Nikitina V. E. // J. Plant Regul. 2017. V. 36. P. 522–527.
- Alen'kina S., Kupryashina M. // Soil Research. 2022. V. 60. P. 197–209.

34. Orcutt D. M., Nilsen E. T. The Physiology of Plants Under Stress: Soil and Biotic Factors. N.Y.: Wiley, 2000. 696 p.
35. Foyer C. H., Noctor G. // Plant, Cell and Environment. 2015. V. 38. P. 239–239.
36. Reddy A. R., Chaitanya K. V., Jutur P. P., Sumithra K. // Environmental and Experimental Botany. 2004. V. 52. P. 33–42.
37. Arzanesh M. H., Alikhani H. A., Khavazi K., Rahimi-an H. A., Miransari M. // International Journal of Botany. 2009. V. 5. P. 244–249.
38. Аленькина С. А., Трутнева К. А., Никитина В. Е. // Известия РАН. Серия биологическая. 2013. № 6. С. 760–764.
39. Cramer G. R., Van Sluyter S. C., Hopper D. W. et al. // BMC Plant Biol. 2013. V. 13. P. 49.
40. Darko E., Fodor J., Dulai S., Ambrus H., Szenzenstein A., Kiraly Z., Barnabas B. // Journal of Agronomy and Crop Science. 2011. V. 197. P. 454–465.

Dose-dependent Effects of Azospirilla Lectin on the Growth of wheat Seedlings under Salt Stress

S. A. Alen'kina^a, *, and M. A. Kupryashina^a

^aInstitute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms,
Saratov Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences (IBPPM RAS),
Saratov, 410049 Russia

*e-mail: s.alenkina@yandex.ru

The dose-dependent effect of the *A. brasilense* Sp7 lectin on the roots of 4-day-old wheat seedlings (*Triticum aestivum* L. cv. Saratovskaya 29) grown under simulated salt stress was studied. In the roots of wheat seedlings under salt stress, lectin increased the activity of peroxidase and superoxide dismutase, but decreased the activity of catalase. In the roots of stressed seedlings, lectin reduced the total protein content and lipid peroxidation causing membrane damage, but increased the content of secondary metabolites, such as the total amount of phenols and flavonoids. It was concluded that azospirillum lectins are involved in adaptive changes in the roots of wheat seedlings, due to which the relationship between bacteria and their hosts can be regulated when soil and climatic factors change.

Keywords: lectin, Azospirillum, wheat seedlings

УДК 582.282.123.4:577.152.34

СВОЙСТВА ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ПРОТЕАЗЫ — РЕГУЛЯТОРА ГЕМОСТАЗА, ОБРАЗУЕМОЙ МИКРОМИЦЕТОМ *Aspergillus tabacinus*

© 2024 г. В. Н. Лавренова^{1, *}, В. Г. Крейер¹, Ж. Савкович²,
А. А. Осмоловский¹

¹Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
Москва, 119234 Россия

²Биологический факультет Белградского университета, Белград, Республика Сербия
*e-mail: pkviktoria@mail.ru

Поступила в редакцию 31.07.2023 г.

После доработки 05.08.2023 г.

Принята к публикации 03.09.2023 г.

Из культуральной жидкости микромицета *Aspergillus tabacinus* ВЕОФВ3260m выделена протеаза с протеин С-подобной и плазминоподобной активностями. Установлено, что фермент относится к группе сериновых протеаз, не гликозилирован, имеет молекулярную массу около 30 кДа. Протеаза активна и стабильна в диапазоне температур от 25–37°C и при pH 7–12. Выделенный фермент может быть перспективным кандидатом для разработки новых антикоагулянтных препаратов.

Ключевые слова: *Aspergillus tabacinus*, протеазы, фибринолитические ферменты, антикоагулянты, хромогенные пептидные субстраты

DOI: 10.31857/S0555109924010076, **EDN:** HCNICP

Гемостаз — это сложная многокомпонентная система, существующая для сохранения целостности сосудистого русла, предотвращения кровопотери и поддержания крови в жидком состоянии. Одной из составляющих гемостаза является система коагуляции, представляющая собой каскад реакций, в которых взаимодействующие белки (факторы свертывания) последовательно активируют друг друга за счет конформационных изменений и/или частичного протеолиза. Результатом коагуляции является формирование тромба — фибринового сгустка, закупоривающего повреждение стенки сосуда. Различные нарушения этой системы могут привести к избыточному и/или несвоевременному формированию фибриновых сгустков, что, в свою очередь, может привести к тромбозам.

Большинство лекарственных средств, используемых для борьбы с тромбозами разного генеза, являются либо антикоагулянтами, то есть веществами, ингибирующими вторичный гемостаз и/или активирующими противосвертывающую систему (антитромбины, тромбомодулин, протеин С, протеин S и др.), либо фибринолитиками, то есть веществами, расщепляющими фибриновые сгустки и/или способствующими активации собственных тромболитических ферментов организма. Следует отметить, что превентивным противотромбозным эффектом обладают только антикоагулянты. Среди распространенных в медицинской практике антикоагулянтов следует выделить четыре группы:

гепарин и гепарин-подобные препараты, кумарины и индандионы — ингибиторы фактора свертывания Ха, ингибиторы тромбина. Все эти препараты имеют побочные эффекты в виде кровотечений, а использование гепаринов также может спровоцировать тромбоцитопению [1]. В связи с этим поиск новых антикоагулянтов, лишенных перечисленных выше побочных эффектов, является актуальной задачей как для фундаментальной науки, так и для фармакологии.

Перспективными продуцентами новых антикоагулянтов могут быть микроорганизмы [2], в том числе грибы-микромицеты, так как они секретируют во внешнюю среду множество гидролитических ферментов, включая протеазы. Протеазы с определенной субстратной специфичностью могут осуществлять ограниченный протеолиз и/или активацию компонентов каскада коагуляции, а также компонентов противосвертывающей системы, что может приводить к разным последствиям, в том числе и к противотромботическому действию. В последнее время ведутся активные исследования антикоагулянтных и фибринолитических ферментов представителей отделов Mucoromycota [3] и Ascomycota [4]. К примеру, в 2022 г. была впервые выделена протеаза аскомицета *Aspergillus versicolor*, проявляющая одновременно антикоагулянтные и фибринолитические свойства [5].

Цель данной работы — выделение и изучение свойств внеклеточной протеазы микромицета *Aspergillus tabacinus*, являющегося близким родственником *Aspergillus versicolor*, а также исследование потенциальных мишеней этой протеазы в системе гемостаза человека.

МЕТОДИКА

Условия культивирования продуцента. Глубинное культивирование микромицета *Aspergillus tabacinus* BEOFB3260m, полученного из коллекции Белградского университета (Республика Сербия), проводили в две стадии [6]. Для засева посевной среды гриб выращивали на скошенном сусле-агаре 7 сут при 25°C, споровую суспензию получали смывом с поверхности. Посевная среда имела следующий состав (%): сусло — 6.7, глюкоза — 1.0, пептон — 0.1, pH 5.5–6.0. Культивирование в посевной среде проводили в течение 48 ч при 28°C и постоянном перемешивании при 200 об./мин. Далее для индукции образования протеолитических ферментов 3% посевной среды переносили в среду для ферментации следующего состава (%): глюкоза — 3.5, крахмал — 1.0, гидролизат рыбной муки — 0.5, пептон — 0.5, NaCl — 0.2, KH_2PO_4 — 0.05, MgSO_4 — 0.05, pH 7.0–7.5. Культивирование в ферментационной среде проводили в течение 7 сут при 28°C и постоянном перемешивании при 200 об./мин.

Выделение и очистка протеазы. Для выделения фермента из культуральной жидкости, полученной после выращивания гриба и отделения мицелия, белки осаждали сульфатом аммония. Сульфат аммония добавляли постепенно до степени насыщения 80%. Через 48 ч инкубации при 4°C белковый осадок отделяли центрифугированием в течение 40 мин при 15000 g, ресуспендировали в 10 мл 0.005 М Трис-НСl буфера, pH 8.2, и проводили диализ против того же буфера в течение 36 ч с последовательными сменами буфера через каждые 12 ч. После диализа нерастворимые белки отделяли центрифугированием при том же режиме. Полученный супернатант лиофильно высушивали и хранили при –20°C.

Очистка протеазы из полученного лиофильного препарата была проведена методом изоэлектрофокусирования в градиенте pH амфолинов 2–12 и градиенте плотности сахарозы 0–40% при 4°C и напряжении 800 В в течение 36 ч [7, 8]. Для изоэлектрофокусирования использовали колонку объемом 110 мл (“LKB”, Швеция). В каждой фракции определяли pH, оптическую плотность при длине волны 280 нм, а также протеолитическую активность с использованием хромогенных пептидных субстратов тромбина Chromozym TH (Tos-Gly-Pro-Arg-pNA) (“DiaPharma”, США) и активированного протеина С S-2366 (pGlu-Pro-Arg-pNA) (“DiaPharma”, США).

Электрофорез в денатурирующих условиях. Белковый состав фракций с наибольшей протеолитической активностью исследовали методом электрофореза в денатурирующих условиях по Лэммли [9]. Использовали маркеры молекулярных масс Unstained Protein Molecular Weight Marker (“Thermo Fisher Scientific”, США), гель окрашивали ацетатно-спиртовым раствором Кумасси R-250. Для удаления неспецифически сорбировавшегося красителя использовали 7%-ный раствор уксусной кислоты.

Зимография. Для определения протеолитически активного компонента во фракции, представляющей смесь белков, использовали зимографию [10]. Для этого проводили электрофорез в денатурирующих условиях по методу Лэммли со следующими изменениями: в разделяющий гель добавляли казеин до конечной концентрации 0.2%, в качестве буфера для образцов использовали пятикратный буфер следующего состава: 0.5 М Трис-НСl, pH 6.8, 10% додецилсульфата натрия, 20% глицерина, 0.5% бромфенолового синего. Перед нанесением проб в гель не проводили их нагревание. После проведения электрофореза гель инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в 50 мМ Трис-НСl буфере, pH 7.0, содержащем 2.5%-ный Трипон-X100. Далее отмывали гель в течение 30 мин в дистиллированной воде, после чего инкубировали в течение 12 ч при 37°C в 30 мМ Трис-НСl буфере, pH 7.0, содержащем 0.02% азида натрия. Окрашивание геля проводили так же, как и при проведении электрофореза по Лэммли.

Выявление гликозилирования в геле. Присутствие углеводного компонента в молекуле протеазы определяли при проведении денатурирующего электрофореза [11]. В течение 30 мин гель инкубировали в 50%-ном этаноле, а затем в течение 10 мин отмывали дистиллированной водой, после чего помещали гель на 30 минут в раствор, содержащий 1%-ную йодную и 3%-ную уксусную кислоты. Далее отмывали 30 мин в дистиллированной воде, 20 мин инкубировали в 0.1%-ном растворе метабисульфита натрия в 10 мМ НСl и инкубировали в течение 1 ч в темноте с реактивом Шиффа. После описанных процедур гель повторно помещали в 0.1%-ный раствор метабисульфита натрия в 10 мМ НСl на 1 ч, а затем в 0.5%-ный раствор метабисульфита натрия в 10 мМ НСl на 2 ч.

Определение протеолитической активности с хромогенными пептидными субстратами. Специфическую ферментативную активность культуральной жидкости и фракций после изоэлектрофокусирования определяли спектрофотометрически при длине волны 405 нм по накоплению *para*-нитроанилина после гидролиза различных хромогенных пептидных субстратов при 37°C [12]. К 100 мкл соответствующего субстрата с концентрацией 0.5 мг/мл, приготовленного в 0.05 М Трис-НСl

буфере, pH 8.2, прибавляли 50 мкл такого же буфера. Реакцию инициировали добавлением 200 мкл нужной фракции или культуральной жидкости. Через 5 мин реакцию останавливали добавлением 200 мкл 50%-ной уксусной кислоты. Контролем служила проба, в которой реакцию останавливали сразу же после добавления к раствору субстрата фермента. За 1 ед. ферментативной активности принимали число мкмоль *para*-нитроанилина, образовавшегося в 1 мл раствора за 1 мин.

Анализ субстратной специфичности. Для определения субстратной специфичности использовали следующие хромогенные пептидные субстраты [13]: субстрат плазмينا — H-D-Val-Leu-Lys-pNA (S-2251), фактора Ха — Bz-Ile-Glu(γ -OR)-Gly-Arg-pNA (S-2222) и Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA (S-2765), урокиназы — pGlu-Gly-Arg-pNA (S-2444), тромбина — Tos-Gly-Pro-Arg-pNA (Chromozym TH) и H-D-Phe-Pip-Arg-pNA (S-2238), тканевого активатора пламиногена — H-D-Ile-Pro-Arg-pNA (S-2288), активированного протеина С — pGlu-Pro-Arg-pNA (S-2366); а также хромогенные субстраты трипсина Bz-Arg-pNA и химоотрипсина Ac-Phe-pNA и субстраты с разным сочетанием аминокислот в хромопептиде: Ac-Leu-Gly-Arg-pNA, Z-Ala-Ala-Met-Lys-pNA, Z-Ala-Ala-Phe-Lys-pNA, For-Ala-Phe-Lys-pNA, Z-Gly-Gly-Leu-pNA.

Ингибиторный анализ. Для изучения ингибирования фермента использовали следующие растворы ингибиторов: ингибитор сериновых протеаз фенолметилсульфонилфторид в концентрации 0.3 мг/мл (PMSF), ингибиторы трипсин-подобных протеаз тозиллизилхлорметилкетон (TLCK, 0.4 мг/мл) и соевый ингибитор трипсина (1.1 мг/мл), ингибитор химоотрипсин-подобных протеаз тозилфенилаланилхлорметилкетон (TPCK, 0.4 мг/мл), ингибитор цистеиновых протеаз пара-хлормеркурибензоат (СМВ, 0.5 мг/мл), ингибитор металлопротеаз ЭДТА (1.1 мг/мл). Фермент инкубировали с раствором ингибитора в течение 2 ч при комнатной температуре в молярном соотношении фермент: ингибитор 1 : 10 и 1 : 100 [14], далее проводили реакцию с субстратом S-2366 по методике, описанной выше. В качестве контроля использовали пробу, в которой фермент инкубировали в течение 2 ч в буферном растворе Трис-HCl, pH 8.2, без ингибитора. Ферментативную активность контрольной пробы принимали за 100%, активности в присутствии ингибиторов выражали в % относительно активности в контрольной пробе.

Определение оптимума активности фермента и его стабильности. Для исследования pH-оптимума использовали 0.4 М универсальный (натрий-ацетат-фосфат-боратный) буфер со значениями pH от 3.0 до 13.0. Определение активности по субстрату S-2366 проводили по методике, описанной выше, заменяя только буферный раствор в реакционной смеси. Для анализа стабильности

проводили двухчасовую инкубацию фермента в объеме 200 мкл с 50 мкл 0.1 М универсального буфера в пределах pH от 2.0 до 13.0 при 25°C, после чего добавляли 100 мкл субстрата S-2366 в концентрации 0.5 мг/мл в 0.5 М Трис-HCl буфере, pH 8.2. Реакцию проводили в течение 5 минут и останавливали добавлением 200 мкл 50%-ной уксусной кислоты. Для определения температурного оптимума реакцию проводили при 25, 30, 37, 45, 55, 65°C. Для определения температурной стабильности проводили двухчасовую инкубацию фермента при указанных температурах, а затем проводили реакцию при 37°C по стандартной методике, описанной выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Секретируемую *A. tabacinus* ВЕОФВ3260м протеазу выделяли из культуральной жидкости, частично очищали с помощью осаждения сульфатом аммония, осажденные белки растворяли и диализовали, а затем лиофильно высушивали. Полученный препарат разделяли методом изоэлектрофокусирования. Протеолитическая активность культуральной жидкости до очистки составляла 83×10^{-3} Е по субстрату активированного протеина С S-2366 и 62×10^{-3} Е по субстрату тромбина Chromozym TH. Полученные значения превышали аналогичные для протеолитических ферментов 7 изученных ранее представителей рода *Aspergillus* [7], что делает протеазу *A. tabacinus* перспективным кандидатом для разработки антикоагулянтных препаратов с протеин С-подобной активностью.

После изоэлектрофокусирования была выявлена фракция с наибольшей активностью по отношению к субстратам S-2366 и Chromozym TH. Фракция соответствовала pH 2.9 и области наибольшей оптической плотности при 280 нм (рис. 1, фракции 1–3). Скорее всего, такие значения оптической плотности объясняются не высокой концентрацией белка во фракциях, а поглощением пигмента, присутствие которого было выявлено при визуализации фракций 1–3. Вероятнее всего, исследуемая протеаза *A. tabacinus* является пигмент-ассоциированным белком. Активность фракции 3 по субстрату S-2366 составила 81×10^{-3} Е, по субстрату Chromozym TH — 69×10^{-3} Е. По результатам изоэлектрофокусирования также был выявлен второй секретируемый протеолитический фермент, неактивный в отношении субстрата Chromozym TH, но активный в отношении S-2366 (рис. 1, фракция 11). Активность этой фракции по субстрату S-2366 составила 42×10^{-3} Е, что ниже, чем соответствующая активность фракции 3, поэтому для дальнейшей работы была выбрана более активная фракция.

Электрофорез фракции 3 по Лэммли выявил наличие в ней нескольких белков (рис. 2, дорожка 1). Для идентификации протеолитически активного

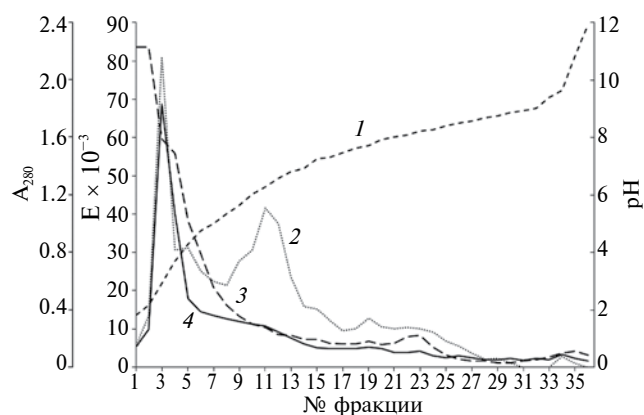


Рис. 1. Изоэлектрофокусирование внеклеточных белков культуральной жидкости *A. tabacinus* BEOFB3260m: 1 — pH, 2 — активность по отношению к субстрату S-2366 ($E \times 10^{-3}$), 3 — A_{280} , 4 — активность по отношению к субстрату Chromozym TH ($E \times 10^{-3}$).

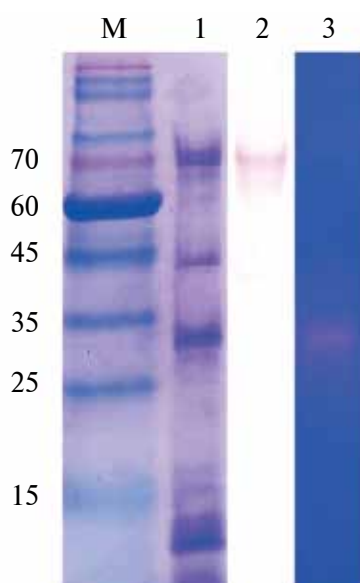


Рис. 2. Электрофоретический анализ внеклеточной протеазы *A. tabacinus* в ПААГ с ДСН-Na: М — метчики; 1 — электрофореграмма по Лэммли; 2 — окраска на наличие углеводного компонента; 3 — казеиновая зимограмма.

компонента была выполнена казеиновая зимография (рис. 2, дорожка 3), по результатам которой во фракции была найдена единственная протеаза с молекулярной массой около 30 кДа. Так как фракция содержала только один протеолитически активный компонент, все дальнейшие исследования свойств ферментативного препарата проводилось именно с этой фракцией без дополнительной очистки. Выявление гликозилированных белков также проводилось после денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле (рис 2, дорожка 2). Был идентифицирован только один высокомолекулярный гликозилированный белок,

не являющийся протеолитически активным. Отсутствие у протеазы *A. tabacinus* углеводного компонента сближает ее с другими внеклеточными протеазами, продуцируемыми представителями рода *Aspergillus* [15], а также делает ее перспективным кандидатом для разработки препаратов протеолитических ферментов, так как гетерологичная экспрессия негликозилированных белков является более экономически выгодной.

При анализе субстратной специфичности протеазы *A. tabacinus* было обнаружено, что фермент неактивен в отношении субстратов трипсин-(Bz-Arg-pNA) и химотрипсин-подобных (Ac-Phe-pNA) протеаз (табл. 1), однако проявлял высокую активность в отношении субстратов белков системы гемостаза: тромбина (Tos-Gly-Pro-Arg-pNA), протеина С (pGlu-Pro-Arg-pNA), плазмينا (H-D-Val-Leu-Lys-pNA), фактора Ха (Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA). Изучаемый фермент активно расщеплял субстраты, содержащие остаток аргинина в положении P1 и остаток пролина в положении P2. При этом замена аминокислотного остатка в положении P3 могла изменять уровень амидолитической активности более, чем в два раза. Другой группой предпочтительных для фермента субстратов были субстраты, содержащие остаток аргинина в положении P1 и остаток глицина в положении P2. В данном случае изменение аминокислотного остатка в положении P3 также сильно сказывалось на активности. Единственным активно расщепляемым субстратом, содержащим остаток лизина в P1, являлся H-D-Val-Leu-Lys-pNA. Субстраты, не содержащие в положении P1 остатков аргинина или лизина, протеазой *A. tabacinus* не гидролизировались.

Результаты ингибиторного анализа протеазы *A. tabacinus* во многом подтвердили эксперименты по изучению субстратной специфичности фермента. Так как протеаза микромицета активно расщепляла субстраты активированного протеина С, плазмينا, тромбина и фактора Ха, можно предположить, что она относится к тому же классу, что и перечисленные белки, то есть к сериновым протеазам. Зависимое от дозы ингибирование фермента *A. tabacinus* соевым ингибитором трипсина подтвердило принадлежность изучаемого белка к сериновым протеазам (табл. 2), в то же время фермент не ингибировался классическими ингибиторами цистеиновых и металлопротеаз. Однако универсальный ингибитор сериновых протеаз PMSF не влиял на активность исследуемой протеазы. Возможно, это объясняется структурными особенностями активного центра фермента, так как известны представители сериновых протеаз, активность которых не подавляется PMSF [16, 17]. Вероятно, эти же структурные особенности активного центра объясняют нечувствительность фермента к другому ингибитору трипсин-подобных сериновых протеаз TLCK.

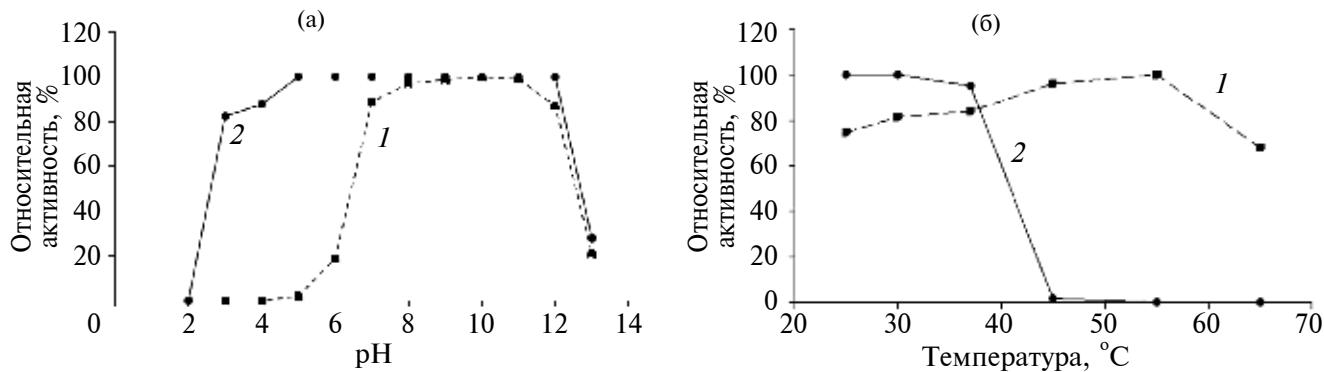


Рис. 3. Влияние pH (а) и температуры (б) на активность (1) и стабильность (2) протеазы *A. tabacinus* BEOFB3260m.

Таблица 1. Субстратная специфичность внеклеточной протеазы *A. tabacinus*

Субстрат	Амидолитическая активность, Е × 10 ⁻³
Tos-Gly-Pro-Arg-pNA	69.0
pGlu-Pro-Arg-pNA	81.7
H-D-Ile-Pro-Arg-pNA	24.0
pGlu-Gly-Arg-pNA	33.8
Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA	61.6
Ac-Leu-Gly-Arg-pNA	84.1
Bz-Ile-Glu(γ-OR)-Gly-Arg-pNA	9.0
H-D-Phe-Pip-Arg-pNA	11.1
Bz-Arg-pNA	1.5
H-D-Val-Leu-Lys-pNA	75.4
Z-Ala-Ala-Met-Lys-pNA	2.1
Z-Ala-Ala-Phe-Lys-pNA	5.1
For-Ala-Phe-Lys-pNA	5.0
Z-Gly-Gly-Leu-pNA	2.2
Ac-Phe-pNA	1.5

При исследовании влияния pH реакционной смеси на стабильность и активность протеазы *A. tabacinus* по отношению к субстрату S-2366 было показано, что фермент стабилен в диапазоне pH от 3 до 12 и проявлял максимальную активность при pH 10 (рис. 3а). При значениях pH 8, 9 и 11 ферментативная активность снижалась не более, чем на 5% от максимальной, а при pH 7 и 12 не более, чем на 15%. Полученные результаты позволили предположить, что исследуемый фермент является щелочной протеазой, что также характерно для других протеаз, секретируемых микромицетами рода *Aspergillus* [18].

При исследовании влияния температуры на стабильность и активность протеазы *A. tabacinus* по отношению к субстрату S-2366 было показано, что фермент стабилен в диапазоне температур от 25 до 37 °C и проявлял максимальную активность при температуре 55 °C (рис. 3б). Сохранение высокой

ферментативной активности при температуре тела человека делает протеазу *A. tabacinus* перспективным кандидатом для разработки терапевтических препаратов. Максимальная активность фермента проявлялась при нефизиологических температурах, что было описано и для других протеаз микромицетов рода *Aspergillus* [19]. Следует отметить, что активность при прочих исследованных температурах (30, 37, 45 °C) ниже, чем активность при 55 °C, но не более чем на 20%.

Протеаза, выделенная из культуральной жидкости *A. tabacinus* BEOFB3260m, является высоко активным ферментом с протеин С-подобной активностью. Дефицит протеина С связан с тромбозами и другими патологиями гемостаза, так как этот белок является компонентом противосвертывающей системы. В связи с этим протеаза *A. tabacinus* может быть использована для разработки препаратов заместительной терапии при дефицитах протеина С. Более того, исследуемый фермент обладал

Таблица 2. Ингибиторный анализ протеазы *A. tabacinus*

Ингибитор	Молярное соотношение фермент: ингибитор	Относительная активность*, %
PMSF	1 : 10	100
	1 : 100	
Соевый ингибитор трипсина	1 : 10	34
	1 : 100	10
TLCK	1 : 10	100
	1 : 100	
TPCK	1 : 10	100
	1 : 100	
CMB	1 : 10	100
	1 : 100	
ЭДТА	1 : 10	100
	1 : 100	

* За 100% принимали активность в отсутствие ингибиторов.

также и плазминоподобной активностью, что может означать потенциальную способность протеазы к прямому лизису фибриновых сгустков. Таким образом, изученный фермент, представляющий собой негликозилированную сериновую протеазу массой около 30 кДа, активную при температурах от 25 до 37°C и pH 7–12, может стать новым белковым регулятором системы гемостаза человека.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Li T., Yuan D., Yuan J. // Adv. Exp. Med. Biol. 2020. V. 1177. P. 101–131.
2. Barzkar N., Jahromi S. T., Vianello F. // Mar. Drugs. 2022. V. 20. № 1. P. 46.
<https://doi.org/10.3390/md20010046>
3. Zhang S., Wang Y., Zhang N., Sun Z., Shi Y., Cao X., Wang H. // Food Technol. Biotechnol. 2015. V. 53. № 2. P. 243–248.
4. Duan Y., Katrolia P., Zhong A., Kopparapu N. K. // Prep. Biochem. Biotechnol. 2022. V. 52. № 9. P. 1008–1018.
5. Zhao L., Lin X., Fu J., Zhang J., Tang W., He Z. // Mar. Drugs. 2022. V. 20. № 6. P. 356.
<https://doi.org/10.3390/md20060356>
6. Батомункеева Б. П., Егоров Н. С. // Микробиология. 2001. Т. 70. № 5. С. 602–606.
7. Осмоловский А. А., Звонарева Е. С., Крейер В. Г., Баранова Н. А., Егоров Н. С. // Биоорганическая химия. 2014. Т. 40. № 6. С. 688–694.
8. Звонарева Е. С., Осмоловский А. А., Крейер В. Г., Баранова Н. А., Котова И. Б., Егоров Н. С. // Биоорганическая химия. 2015. Т. 41. № 5. С. 559–564.
9. Laemly U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
10. Hu Y., Yu D., Wang Z., Hou J., Tyagi R., Liang Y., Hu Y. // Scientific Reports. 2019. V. 9. № 9235.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-45686-y>
11. Thornton D. J., Carlstedt I., Sheehan J. K. // Methods Mol. Biol. 1994. V. 32. P. 119–128.
12. Звонарева Е. С., Осмоловский А. А., Крейер В. Г., Баранова Н. А., Котова И. Б., Егоров Н. С. // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 2. С. 195–200.
13. Proteolytic Enzymes. A practical approach. / Ed. R. Beynon, J. S. Bond. Oxford: Oxford Univ. Press, 2001. 340 p.
14. Biaggio R. T., Silva R. R., Rosa N. G., Leite R. S., Arantes E. C., Cabral T. P., Juliano M. A., Juliano L., Cabral H. // Prep. Biochem. Biotechnol. 2016. V. 46. № 3. P. 298–304.
15. Осмоловский А. А., Крейер В. Г., Баранова Н. А., Кураков А. В., Егоров Н. С. // Прикл. биохимия микробиология. 2015. Т. 51. № 1. С. 86–92.
16. Das A. K., Bellizzi J. J., Tandel S., Biehl E., Clardy J., Hofmann S. L. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. № 31. P. 23847–23851.
17. Richmond G. S., Smith T. K. // Biochem. J. 2007. V. 405. № 2. P. 319–329.
18. Chakrabarti S. K., Matsumura N., Ranu R. S. // Curr. Microbiol. 2000. V. 40. № 4. P. 239–244.
19. Звонарева Е. С., Осмоловский А. А., Баранова Н. А., Котова И. Б., Крейер В. Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2023. Т. 59. № 4. С. 369–375.

Properties of Extracellular Protease — Regulator of Hemostasis Produced by Micromycete *Aspergillus tabacinus*

V. N. Lavrenova^{a,*}, V. G. Kreyer^a, Z. Savkovic^b, and A. A. Osmolovskiy^a

^aFaculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

^bFaculty of Biology, University of Belgrade, Belgrade, Republic of Serbia

*e-mail: pkviktoria@mail.ru

The extracellular protease with protein C-like and plasmin-like activities was isolated from the culture fluid of the micromycete *A. tabacinus* BEOF3260m. It has been established that *A. tabacinus* extracellular protease is a non-glycosylated serine protease with mol. weight about 30 kDa. The enzyme is active and stable at temperature of 25–37°, active at pH 7.0–12.0 and stable at pH 3.0–12.0 and is a perspective candidate for new anticoagulant drugs development.

Keywords: *Aspergillus tabacinus*, proteases, fibrinolytic enzymes, anticoagulants, chromogenic peptide substrates

УДК 579.66

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРОТЕАЗ РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИЗОЛЯТОВ БЕЛКА ГОРОХА

© 2024 г. И. В. Кравченко^{1, *}, В. А. Фуралев¹, Е. В. Костылева²,
А. С. Серeda², Е. И. Курбатова², Н. В. Цурикова², Е. С. Пшеникова¹,
Т. В. Бояринцева¹, В. О. Попов¹, А. Н. Федоров¹

¹Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, 119071 Россия

²Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии — филиал Федерального
исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва, 111033 Россия

*e-mail: ink71@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.07.2023 г.

После доработки 25.08.2023 г.

Принята к публикации 03.09.2023 г.

Исследовано влияние четырех ферментных препаратов — бациллолизина, агропрота, протозима и протозима С (Россия) — на растворимость, эмульгирующую активность, стабильность эмульсии, пенообразование и стабильность пены изолятов, выделенных из двух сортов гороха. Показано, что обработка ферментами позволяет повысить растворимость изолятов при pH 5 более чем в 7 раз, индекс эмульгирующей активности при pH 5 — в 1.5–2 раза, а при pH 6 — почти в 1.5 раза; индекс стабильности эмульсии при pH 5 увеличить примерно на 20%, а при pH 6 — в 1.7 раза (у одного из сортов); пенообразование при pH 5 — в 2.4–3 раза, а при pH 6 — в 1.8–3.7 раза; стабильность пены при pH 5 — на 25–33%, а при pH 6 — более чем в 1.5 раза (у одного из сортов). Полученные результаты позволили подобрать ферментный препарат (бактериальная щелочная сериновая протеаза) для улучшения параметров изолятов горохового белка, предназначенных для изготовления аналогов кисломолочных продуктов.

Ключевые слова: изолят горохового белка, щелочные протеазы, кислая протеаза, нейтральная протеаза

DOI: 10.31857/S0555109924010089, **EDN:** HCHFTG

Использование изолятов горохового белка для производства растительных аналогов пищевых продуктов животного происхождения является весьма перспективным направлением прикладной биотехнологии. Основным методом получения изолятов горохового белка является использование щелочной экстракции с последующим осаждением при pH в области изоэлектрической точки. Получаемый таким способом белковый продукт обладает хорошей растворимостью при нейтральных значениях pH, однако при слабокислом pH его растворимость ограничена. В то же время для производства целого ряда продуктов, включая растительные аналоги кисломолочных продуктов, соусы, определенные виды спортивного и лечебного питания и т.п., необходим изолят с хорошей растворимостью именно в слабокислой среде, поскольку именно этот параметр определяет содержание ценного в питательном отношении белка в конечном продукте. Более того, изолят должен обладать хорошей эмульгирующей активностью при этих значениях pH, а также образовывать достаточно

стабильные эмульсии. Эмульгирующая активность позволяет включать в конечный продукт растительные масла, содержащие высокоценные в пищевом отношении ненасыщенные жирные кислоты. Еще одним важным параметром изолятов является пенообразование. Хотя оно и не оказывает большого влияния на содержание ценных пищевых компонентов в конечном продукте, этот параметр существенно влияет на его органолептические свойства, важные для потребителя.

Наиболее технологичным способом повышения растворимости белка является его обработка протеолитическими ферментами. Описано улучшение растворимости изолятов различных белков (люпин, соя, нут, рис, чечевица и др.) пищевого назначения под воздействием таких ферментов, как алкалаза, папаин, нейтраза, трипсин, химотрипсин, королаза [1–7]. В то же время количество работ, в которых изучалось воздействие протеаз на изолят горохового белка, относительно невелико. В этой связи представляет особенный интерес сравнение воздействия протеаз различных классов (щелочных,

нейтральных и кислых) на свойства изолята горохового белка, имеющие значение при изготовлении продуктов типа растительный йогурт.

Цель работы — изучение влияния таких протеаз, как нейтральная протеаза *Bacillus subtilis*-96 (БНП), кислая грибная аспартатная протеаза (ГКП), бактериальная щелочная сериновая протеаза (БЩП), грибная щелочная сериновая протеаза (ГЩП), на растворимость в слабокислой среде, эмульгирующую активность, стабильность эмульсии, пенообразование и стабильность пены.

МЕТОДИКА

Выделение изолята горохового белка. Для выделения изолята горохового протеина использовалась общепринятая методика [8]. Гороховую муку (150 г) суспендировали в 1.5 л воды, доводили pH до 9.0 с помощью 1 М NaOH и экстрагировали 2 ч. Суспензию центрифугировали при 4200 g в течение 20 мин, осадок отбрасывали, pH супернатанта доводили до 4.5 с помощью 5 М HCl и инкубировали 2 ч. Суспензию центрифугировали при 4200 g в течение 20 мин при 4°C, осадок белка растворяли в 200 мл воды, доводили pH с помощью 1 М NaOH до 7.0 и высушивали на распылительной сушке.

Измерение растворимости белка. Измерение растворимости проводили согласно методу [9]. Суспензии выделенного изолята в 10 mM буферных растворах (цитратном с pH 5 или фосфатном с pH 6) с концентрацией 10 мг/мл по белку встряхивали в течение 1 ч на шейкере при 350 об./мин, центрифугировали при 17000 g в течение 10 мин и измеряли концентрацию растворившегося белка в супернатанте методом Бредфорда. Растворимость рассчитывали как отношение концентрации белка изолята в растворе при данном pH к исходной концентрации белка (10 мг/мл), выраженное в процентах. Все измерения были сделаны в трех повторях.

Измерение индекса эмульгирующей активности. Измерение эмульгирующей активности проводили по методу [10]. Для измерения индекса эмульгирующей активности в системе “масло — раствор белка” турбидиметрическим методом оценивали стабилизированную межфазную площадь на единицу массы белка. Раствор выделенного изолята (0.3%-ный) в 10 mM буферном растворе (цитратном с pH 5 или фосфатном с pH 6) смешивали с рафинированным подсолнечным маслом в объемном соотношении 9: 1, гомогенизировали 2 мин и измеряли мутность эмульсии. Для этого 50 мкл эмульсии смешивали с 5 мл 0.1%-ного ДДС-Na и измеряли оптическую плотность при 595 нм. Индекс эмульгирующей активности ИЭА ($\text{м}^2/\text{г}$) = $(4.606 \times D_{595} \times N) / (10000 \times C \times j)$, где D_{595} — оптическая плотность при 595 нм; N — фактор разведения;

C — концентрация белка, г/мл; j — объемная доля масла. Все измерения были сделаны в трех повторях.

Измерение индекса стабильности эмульсии. Измерение проводили по методу [10]. Для измерения индекса стабильности эмульсии оценивали ее способность противостоять изменениям с течением времени. Раствор выделенного изолята (0.3%-ный) в 10 mM трис-HCl буфере, pH 7.2, смешивали с рафинированным подсолнечным маслом в объемном соотношении 9: 1, гомогенизировали 2 мин на гомогенизаторе Glas-Col при 4000 об./мин, измеряли мутность эмульсии, 50 мкл эмульсии смешивали с 5 мл 0.1%-ного ДДС-Na и измеряли оптическую плотность при 595 нм. Через 10 мин повторно измеряли мутность эмульсии тем же способом. Индекс стабильности эмульсии ИСЭ (мин) = $(D_0/\Delta D) \times t$, где D_0 — оптическая плотность при 595 нм пробы, отобранной немедленно; D_{10} — оптическая плотность при 595 нм пробы, отобранной через 10 мин; $\Delta D = D_0 - D_{10}$; t — временной интервал (10 мин). Все измерения были сделаны в трех повторях.

Измерение пенообразования. Измерение проводили по методу [11]. Для измерения пенообразования оценивали относительный объем пены, образуемый суспензией белка после встряхивания. Суспензию выделенного изолята (1%-ная) в 10 mM цитратном (pH 5) или фосфатном (pH 6) буфере встряхивали на шейкере в течение 1 ч при 300 об./мин. Аликвоту отбирали в мерный цилиндр, встряхивали 70 с, оставляли на 30 с и измеряли объем пены. Пенообразование = $(V_{\text{пены}}/V_{\text{исх}}) \times 100\%$, где $V_{\text{пены}}$ — объем пены в цилиндре, $V_{\text{исх}}$ — исходный объем аликвоты суспензии белка в мерном цилиндре. Все измерения были сделаны в трех повторях.

Измерение стабильности пены. Измерение проводили по методу [11]. Для измерения стабильности пены оценивается отношение объема пены, оставшейся через 60 мин к исходному объему пены. Суспензию (1%-ную) выделенного изолята в 10 mM цитратном (pH 5) или фосфатном (pH 6) буфере встряхивали на шейкере в течение 1 ч при 300 об./мин. Аликвоту отбирали в мерный цилиндр, встряхивали 70 с, оставляли на 30 с и измеряли объем пены. Мерный цилиндр оставляли на 60 мин и повторно измеряли объем пены. Стабильность пены через 60 мин составляла $(V_{60}/V_{\text{исх}}) \times 100\%$, где V_{60} — объем пены через 60 мин, $V_{\text{исх}}$ — исходный объем пены, измеренный через 30 сек после встряхивания вручную. Все измерения были выполнены в трех повторях.

Электрофорез. Электрофорез проводили по методу Лэммли в ПААГ в 10%-ном разделяющем геле и 3.75%-ном концентрирующем.

Определение степени гидролиза изолятов. Степенью гидролиза считали отношение концентрации свободных аминокрупп в белковом образце к концентрации аминокрупп, которая образовалась бы при полном гидролизе данного белкового образца, в%: степень

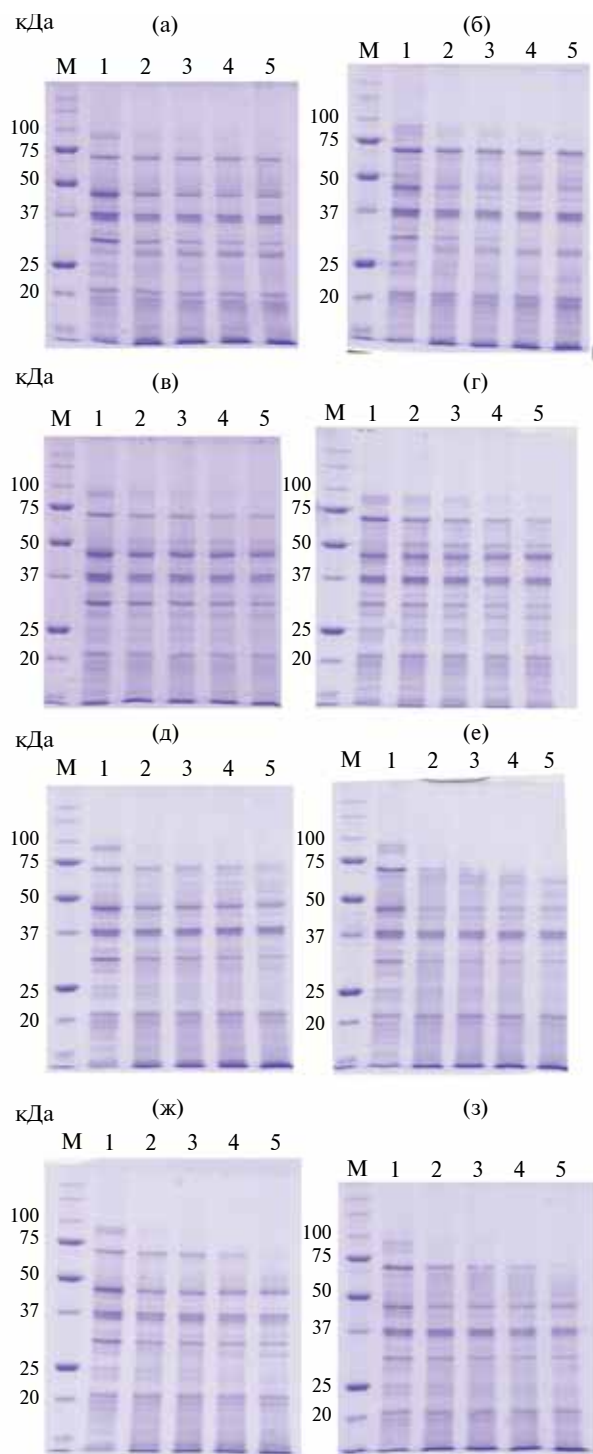


Рис. 1. Электрофорез по Лэммли изолятов белка, выделенных из гороха сорта Родник (а, в, д, ж) и Фокор (б, г, е, з) и обработанных 8.9 мед./мл БНП (а, б), 1.5 ед./мл ГКП (в, г), 1.5 ед./мл ГШП (д, е) и 1.5 ед./мл БШП (ж, з): 1 — необработанный изолят, 2 — 15 мин, 3 — 30 мин, 4 — 1 ч, 5 — 2 ч обработки; М — метки молекулярной массы.

гидролиза = $(C_{\text{своб}}/C_{\text{общ}}) \times 100\%$ [12]. Концентрацию аминокрупп определяли с помощью набора Primary Amino Nitrogen Kit фирмы “Megazyme” (Ирландия), все процедуры проводили в соответствии с инструкцией производителя. Общее количество свободных аминокрупп при полном гидролизе белка выделенного из гороха составляет 8 мМ/г белка [13].

Обработка ферментами. В работе были использованы следующие ферментные препараты: бактериальной нейтральной протеазы (КФ 3.4.24.28, БНП) — бациллолизин (лабораторный образец предоставлен ВНИИПБТ). Препарат кислой грибной аспартагной протеазы (КФ 3.4.23.20) (ГКП) — пенициллопсин (агропрот, ООО “Агрофермент”, Россия). Препарат бактериальной щелочной сериновой протеазы (КФ 3.4.21.62) (БШП) — субтилизин бакт (протозим, ТД “Биопрепарат”, Россия). Препарат грибной щелочной сериновой протеазы (КФ 3.4.21.62, ГШП) — субтилизин гр (протозим С, ТД “Биопрепарат”, Россия).

Для проведения ферментативной обработки изолят горохового белка суспендировали в дистиллированной воде в концентрации 50 мг/мл, инкубировали в течение 30 мин при встряхивании на шейкере ИКА МТС2/4 при 300 об./мин. Затем pH суспензии доводили до требуемого значения для обработки БШП и ГШП — до 8.0, БНП — до 7.0, ГКП — до 5.0 и прогревали на водяной бане до 50°C. Далее добавляли к суспензии фермент и инкубировали в термостате при перемешивании, отбирая пробы через 15 мин, 30 мин, 1 ч и 2 ч. Рабочие концентрации ферментов были подобраны таким образом, чтобы белковый спектр изолятов в течение 2 ч ограниченного протеолиза изменялся постепенно и степень гидролиза не превышала 10%, поскольку при превышении этого значения у изолята появлялся горьковатый привкус. В результате выбранная рабочая активность БШП, ГШП и ГКП составила 1.5 ед./мл, а БНП — 8.9 мед./мл. Ферменты инактивировали нагреванием на водяной бане 10 мин при 85°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определение степени гидролиза изолятов после обработки ферментами. Изоляты белка, выделенные из гороха сортов Родник и Фокор, были подвергнуты обработке препаратами БНП, ГКП, ГШП и БШП в течение 15 мин, 30 мин, 1 и 2 ч (табл. 1). При проведении ограниченного протеолиза степень гидролиза изолятов постепенно повышалась по мере увеличения времени обработки ферментами, однако нигде не превышала 10%. Различия эффективности протеолиза изолятов из гороха разных сортов можно объяснить различным соотношением мажорных белков (конвицилин/вицилин и/или вицилин/легумин) в соответствующих сортах гороха.

Электрофорез продуктов ограниченного протеолиза изолятов. Результаты электрофоретического

разделения белков гороховых изолятов представлены на рис. 1. Общая картина изменения белкового спектра у изолятов из разных сортов гороха очень похожа. Из литературных данных известно [14–16], что мажорная белковая полоса с молекулярной массой около 70 кДа соответствует белку конвицилину, две мажорных полосы с молекулярной массой около 50 и 30 кДа — белку вицилину, а полосы с молекулярной массой 40 и 20 кДа — кислой и щелочной субъединицам белка легумина соответственно.

Все исследованные ферменты расщепляли высокомолекулярные белки с массой около 100 кДа. Кроме них БНП расщеплял полосы вицилина в обоих изолятах (рис. 1а и б). ГКП расщеплял конвицилин, вицилин (в основном полосу 30 кДа) и слабокислую субъединицу легумина (рис. 1в и г). ГЩП расщеплял конвицилин и обе полосы вицилина (рис. 1д и е). БЩП расщеплял конвицилин, обе полосы вицилина и слабокислую субъединицу легумина (рис. 1ж и з).

Влияние обработки протеолитическими ферментами на растворимость изолятов. Обработка всеми исследованными ферментами увеличивала растворимость изолятов белка, выделенных из гороха обоих сортов, при pH 5.0. Исходная растворимость необработанных изолятов была практически одинакова и составляла около 6%. Однако величина эффекта повышения растворимости изолята при обработке различными ферментами, равно как и кинетика данного процесса, различалась у двух исследованных изолятов. Так, в случае изолята, выделенного из сорта Родник, наибольшее повышение растворимости наблюдалось при воздействии БНП: после двухчасовой обработки растворимость увеличилась почти до 44% (рис. 2а). Почти столь же эффективна была обработка препаратом БЩП: через 2 ч инкубации растворимость достигала более 41%. ГКП и ГЩП были менее эффективны: после двухчасовой обработки они повышали растворимость только до 34–35%. Все препараты довольно плавно повышали растворимость изолята из сорта Родник в процессе ферментализации. В случае изолята, выделенного из сорта Фокор, наибольшее увеличение растворимости наблюдалось

после обработки ГКП в течение 1 ч, в результате чего она повысилась до 45% (рис. 2б). При этом, в отличие от изолята из сорта Родник, кинетика эффекта была сложной: постепенное увеличение растворимости наблюдалось при инкубации длительностью до 1 ч, а при увеличении времени инкубации до 2 ч эффект уменьшался до 34%. Различия в кинетике изменения растворимости могут объясняться различным соотношением мажорных белков в соответствующих сортах гороха. Обработка БЩП и ГЩП в течение 2 ч повышала растворимость данного изолята до 41%, обработка БНП — до 37.5%. В отличие от ГКП, препараты нейтральных и щелочных протеаз плавно повышали растворимость изолята из сорта Фокор в процессе гидролиза.

Совершенно другая картина наблюдалась при исследовании влияния обработки ферментами на растворимость изолятов при pH 6.0: ни один из исследованных ферментов не повышал растворимость изолятов при этом значении pH (рис. 2в и г). Следует сразу же отметить, что исходная растворимость необработанных изолятов при pH 6.0 была значительно выше, чем при pH 5.0, причем у изолята из сорта Фокор она была выше, чем у изолята из сорта Родник. При обработке изолята из сорта Родник некоторыми ферментами растворимость не менялась, другими — существенно падала. В случае изолята из сорта Фокор все ферменты понижали растворимость данного изолята. По-видимому, из-за очень высокой сходной растворимости изолятов при данном pH, дальнейшее ее повышение с помощью использованных нами ферментов было невозможно.

Таким образом, для повышения растворимости при pH 5.0 для изолята из сорта Родник можно рекомендовать обработку БНП, а из сорта Фокор — ГКП. Если же приходится иметь дело с изолятом, полученным из разных сортов гороха, то предпочтительнее использовать БЩП, поскольку его эффект более стабилен и менее зависим от взятого сорта гороха. Ни один из исследованных ферментов не повышал растворимость изолятов при pH 6.0, однако у обоих изолятов она и так была

Таблица 1. Степень гидролиза (в %) изолятов белка, выделенных из гороха сортов Родник и Фокор, после обработки четырьмя ферментными препаратами

Препарат	Степень гидролиза белка, %							
	Родник				Фокор			
	15 мин	30 мин	60 мин	120 мин	15 мин	30 мин	60 мин	120 мин
БНП	2.1	4.1	5.5	8.2	1.5	2.4	4.0	7.7
ГКП	1.2	3.9	5.9	10.0	1.9	2.6	5.5	6.9
ГЩП	1.8	3.1	4.5	6.1	1.2	2.8	6.3	8.8
БЩП	2.0	3.9	5.0	8.0	1.6	3.8	5.4	9.4

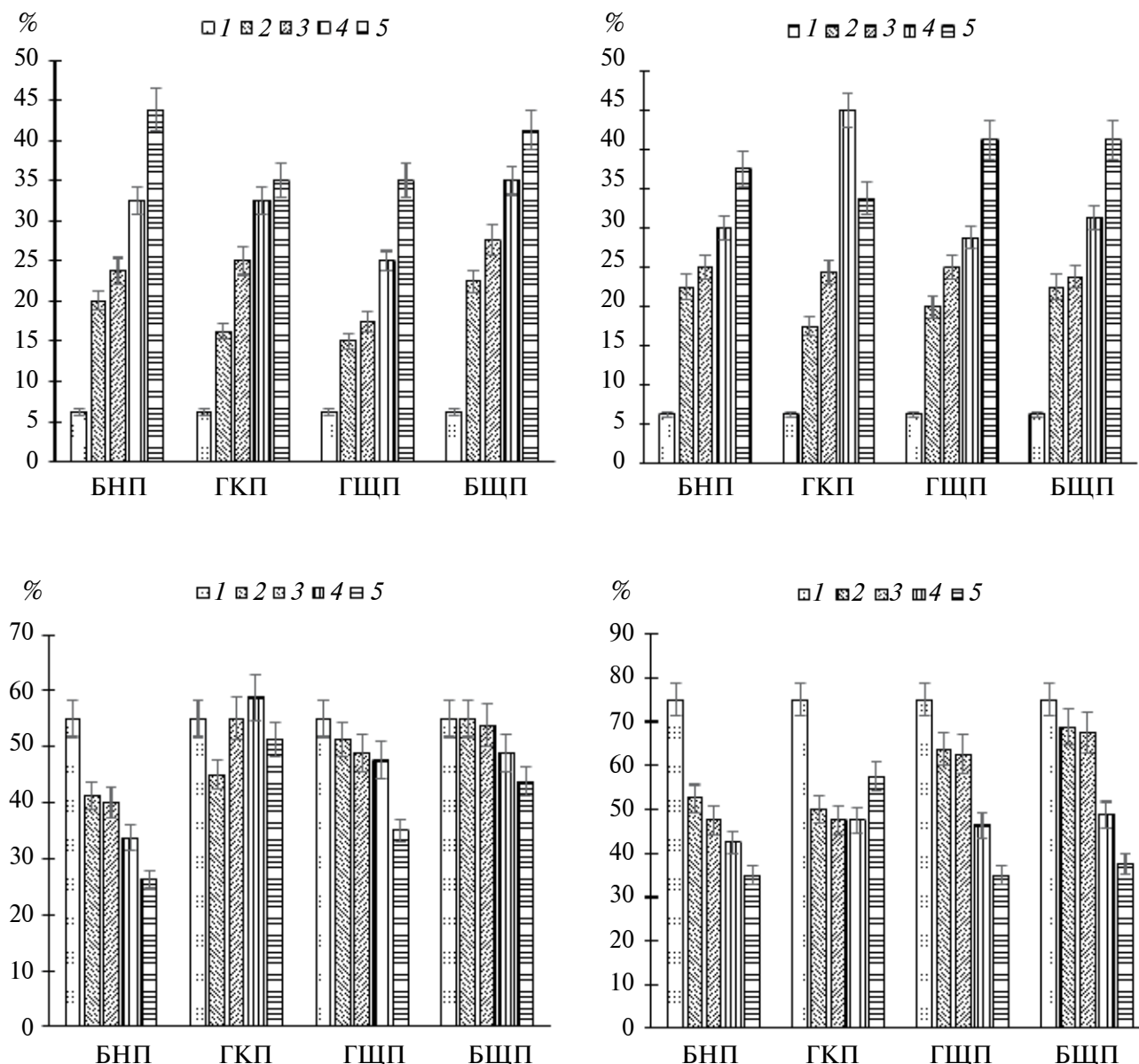


Рис. 2. Влияние обработки препаратами БНП, ГКП, ГЩП и БЩП на растворимость изолятов горохового белка сортов Родник (а, в) и Фокор (б, г) при pH 5.0 (а, б) и 6 (в, г) и различном времени обработки: 1 — без обработки, 2 — 15 мин; 3 — 30 мин; 4 — 1 ч; 5 — 2 ч.

довольно высокой, что позволяет обойтись без ее дальнейшего повышения.

Влияние обработки протеолитическими ферментами на индекс эмульгирующей активности изолятов. Исходный индекс эмульгирующей активности (ИЭА) при pH 5.0 был довольно близок у обоих необработанных изолятов и составлял 40.1 м²/г в случае сорта Родник и 36.4 м²/г в случае сорта Фокор. Обработка обоих изолятов всеми исследованными ферментами, кроме ГКП, повышала ИЭА. В случае изолята из гороха сорта Родник наибольший эффект наблюдался при воздействии БНП: после

получасовой инкубации с ферментом данный показатель превысил 63 м²/г (рис. 3а). Уже через 15 мин инкубации с ферментом эффект почти достигал максимального, а затем вплоть до 2 ч инкубации оставался почти на том же уровне. Обработка ГЩП и БЩП приводила к меньшему повышению индекса эмульгирующей активности: в случае ГЩП максимум наблюдался после 15 мин инкубации (51 м²/г), а в случае БЩП — через 30 мин инкубации (более 54 м²/г), причем при увеличении времени инкубации эффект исчезал.

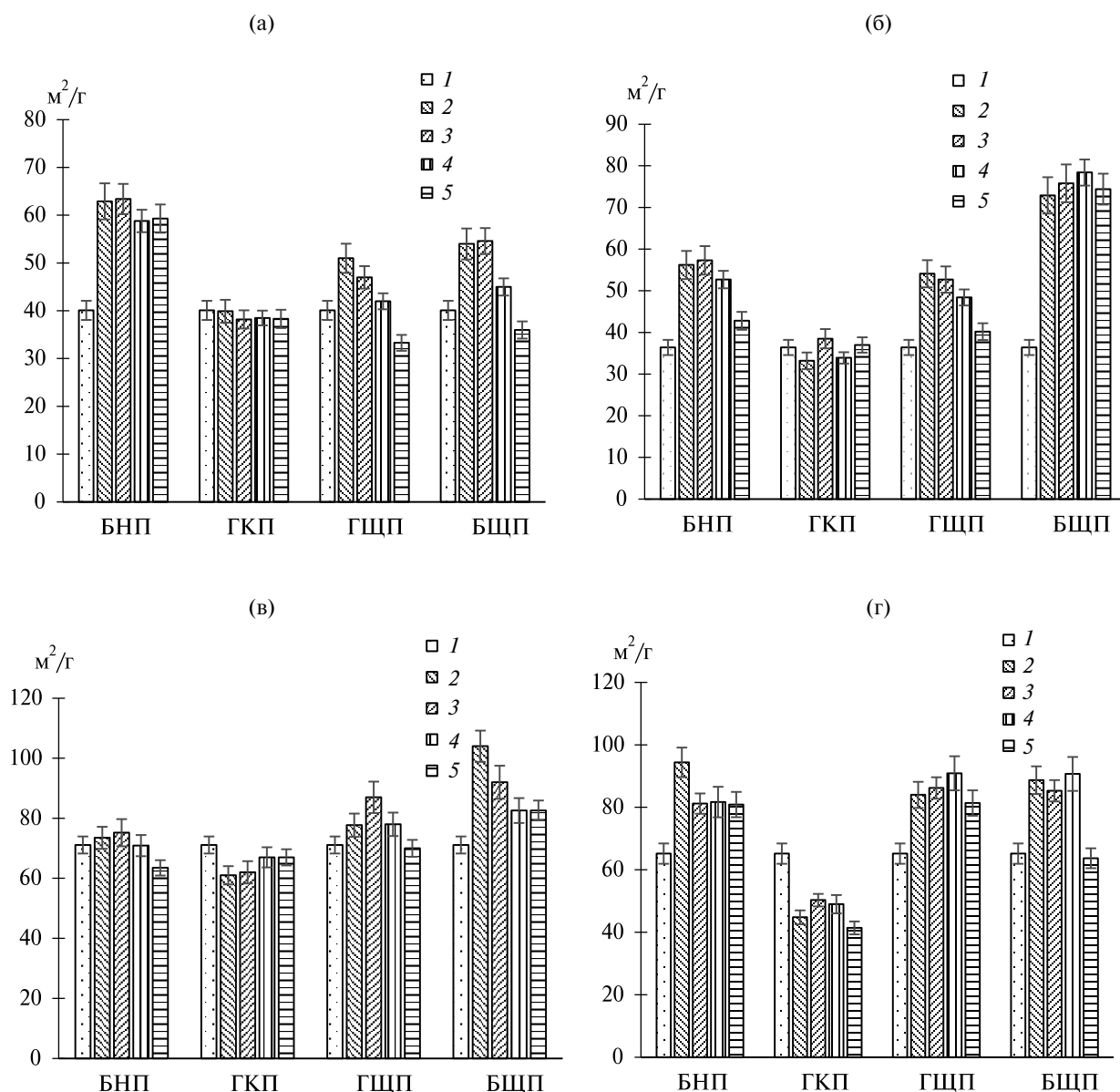


Рис. 3. Влияние обработки БНП, ГКП, ГШП и БШП на индекс эмульгирующей активности изолятов горохового белка сортов Родник (а, в) и Фокор (б, г) при pH 5.0 (а, б) и 6.0 (в, г) при различном времени обработки: 1 — без обработки, 2 — 15 мин; 3 — 30 мин; 4 — 1 ч; 5 — 2 ч.

При использовании изолята из сорта **Фокор** ИЭА при pH 5.0 повышали те же 4 фермента (рис. 3б), однако наибольший эффект наблюдался при воздействии БШП (более 78 м²/г после часовой инкубации). Уже через 15 мин инкубации с ферментом эффект почти достигал максимального, а затем вплоть до 2 ч инкубации оставался почти на том же уровне. БНП и ГШП продемонстрировали меньшее повышение ИЭА (57.3 и 54.1 м²/г соответственно), при этом эффект достигал максимума через 30 и 15 мин соответственно. При увеличении времени инкубации данный эффект исчезал.

При pH 6.0 исходный ИЭА у необработанного изолята из сорта **Родник** составлял 71.1 м²/г, а у необработанного изолята из сорта **Фокор** — 65.2 м²/г. БНП и ГКП не повышали значение данного параметра изолята из гороха сорта **Родник**. Наиболее значимого повышения ИЭА удалось добиться с помощью обработки БШП: после инкубации с ферментом в течение 15 мин индекс эмульгирующей активности достигал 104 м²/г (рис. 3в). Получасовая обработка ГШП повышала значение данного параметра лишь до 87 м²/г. При увеличении времени инкубации эффект уменьшался (в случае ГШП исчезал).

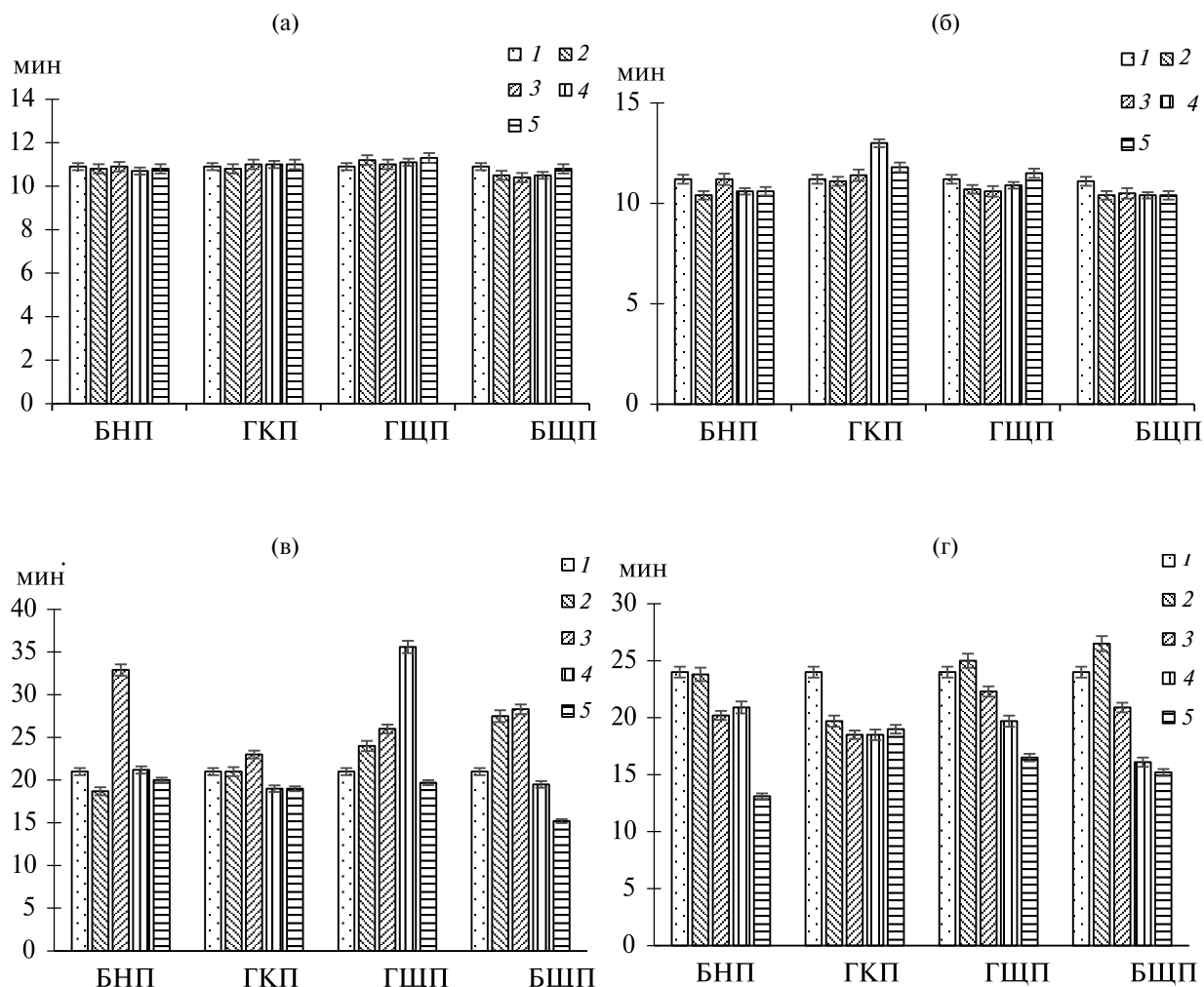


Рис. 4. Влияние обработки БНП, ГКП, ГЩП и БЩП на индекс стабильности эмульсии изолятов горохового белка сортов Родник (а, в) и Фокор (б, г) при pH 5 (а, б) и 6 (в, г) при различном времени обработки: 1 — без обработки, 2 — 15 мин; 3 — 30 мин; 4 — 1 ч; 5 — 2 ч.

Обработка всеми ферментами кроме ГКП повышала ИЭ изолята из гороха сорта Фокор при pH 6.0 так же, как и при pH 5.0. Обработка БНП повышала величину этого параметра более, чем до 94 м²/г (рис. 3г), а ГЩП и БЩП — более, чем до 90 м²/г. Кинетика развития эффекта у четырех ферментных препаратов была похожей: при дальнейшей инкубации после достижения максимума эффект снижался (в случае БЩП исчезал). В случае БНП максимальный эффект развивался после инкубации в течение 15 мин, ГЩП и БЩП — в течение 1 ч.

Таким образом, для повышения ИЭ при pH 5.0 для обработки изолята из сорта Родник можно рекомендовать обработку БНП, а из сорта Фокор — БЩП. Для изолятов, полученных из разных сортов гороха, предпочтительнее использовать БЩП, поскольку его эффект более стабилен и менее зависим от взятого сорта гороха. Чтобы повысить ИЭ при pH 6.0 для изолята из сорта Родник

можно рекомендовать обработку БЩП, а из сорта Фокор — БНП. Как было выше указано для изолятов, полученных из разных сортов гороха, предпочтительнее использовать БЩП по вышеуказанной причине.

Влияние обработки протеолитическими ферментами на индекс стабильности эмульсии изолятов. Исходный индекс стабильности эмульсии (ИСЭ) при pH 5.0 был довольно близок у обоих необработанных изолятов (около 11 мин.). Обработка обоих изолятов исследованными ферментами довольно слабо влияла на индекс стабильности эмульсии при pH 5.0.

Только обработка ГКП немного повышала ИСЭ (рис. 4б) изолята из сорта Фокор: после часовой обработки значение данного параметра возрастало до 13 мин. Обработка остальными ферментами не влияла на индекс стабильности эмульсии.

При pH 6.0 исходный ИСЭ у необработанного изолята из сорта Родник составлял 21 мин,

а у необработанного изолята из сорта Фокор — 24 мин. При исследовании влияния на данный параметр обработки ферментами при pH 6.0 наблюдалась иная картина, чем при pH 5.0. Препараты повышали ИСЭ изолята из сорта Родник с разной эффективностью (рис. 4в). Наибольшее повышение наблюдалось при обработке ГЩП: после инкубации с ферментом в течение 1 ч ИСЭ достигал 35.6 мин. Эффект увеличивался по мере инкубации вплоть до 1 ч, а затем снижался. БНП повышал ИСЭ данного изолята только после получасовой инкубации (до 32.9 мин), БЩП — после инкубации в течение 15 и 30 мин (до 27.5 и 28.3 мин соответственно), ГКП — после получасовой инкубации (только до 23 мин).

В случае сорта Фокор (рис. 4г) способностью повышать ИСЭ при pH 6.0 обладал только ферментный препарат БЩП (после инкубации в течение 15 мин параметр возрос до 26.5 мин). Возможно, различия с изолятом из сорта Родник объясняются более высоким исходным значением ИСЭ изолята из сорта Фокор.

Таким образом, для повышения стабильности эмульсии при pH 5.0 для изолята из сорта Родник можно рекомендовать обработку БЩП, а из сорта Фокор — ГКП, хотя величина эффекта обработки обоими ферментами невелика. При получении изолята из разных сортов гороха дать какие-либо рекомендации заранее весьма затруднительно, необходимо экспериментальное изучение воздействия того или иного фермента на конкретный изолят. Для повышения стабильности эмульсии при pH 6.0 для изолята из сорта Родник можно рекомендовать обработку БНП, ГЩП или БЩП, а из сорта Фокор — БЩП. С изолятом, полученным из разных сортов гороха, предпочтительнее использовать БЩП, поскольку его эффект более стабилен и менее зависим от взятого сорта гороха.

Влияние обработки протеолитическими ферментами на пенообразование изолятов. Исходное пенообразование при pH 5.0 у изолята, выделенного из сорта Родник, было заметно меньше, чем у выделенного из сорта Фокор, 88.3% против 132%. Обработка обоих изолятов всеми четырьмя исследованными ферментами заметно повышала их пенообразование. Однако величина эффекта при обработке различными ферментами, равно как и кинетика данного процесса, немного различалась у двух исследованных изолятов. Так, в случае изолята, выделенного из сорта Родник, была эффективна обработка препаратами ГЩП и БЩП: через 2 ч инкубации пенообразование достигало 260%. Ферменты БНП и ГКП были менее эффективны: после обработки в течение 2 ч они повышали пенообразование только до 206 и 193% соответственно. Кинетика развития эффекта у четырех последних ферментных препаратов была в общем похожей. В случае изолята, выделенного из сорта Фокор,

обработка препаратами БНП, ГЩП и БЩП также существенно повышала пенообразование: после получасовой инкубации с первым из них значение данного параметра достигло 246%, а после двухчасовой инкубации со вторым и третьим — 246 и 230% соответственно. ГКП продемонстрировал наименьший эффект: после инкубации в течение 15 мин пенообразование достигало лишь 180%. При этом эффект ГЩП постепенно увеличивался по мере инкубации, эффект БЩП и ГКП выходил на плато уже через 15 мин инкубации, а эффект БНП — через 30 мин.

При pH 6 исходное пенообразование у изолята, выделенного из сорта Родник, также было заметно меньше, чем у выделенного из сорта Фокор: 66,6% против 133%. Обработка изолята, выделенного из сорта Родник, всеми четырьмя исследованными ферментами также повышала их пенообразование. Наибольшее повышение данного параметра наблюдалось при воздействии ГЩП: после двухчасовой обработки пенообразование увеличилось до 250% (рис. 5в). Почти столь же эффективна была обработка препаратом бактериальной сериновой протеазы БЩП: через час инкубации с первым ферментом пенообразование достигало 240%, а через два часа инкубации со вторым — 230%. БНП и ГКП оказались менее эффективны: двухчасовая обработка первым из них повышала пенообразование только до 173%, а часовая обработка вторым — до 167%. Обработка изолята БНП, ГЩП и БЩП приводила к постепенному повышению пенообразования, эффект обработки ГКП достигал максимума через час инкубации, затем немного снижался. В случае изолята, выделенного из сорта Фокор, наибольшее повышение пенообразования также наблюдалось при воздействии БЩП и ГЩП — 250 и 236% соответственно (рис. 5г). БНП повышал данный параметр только до 200%. ГКП не повышал пенообразование изолята, выделенного из гороха сорта Фокор, статистически достоверно. У всех испытанных ферментов максимальный эффект наблюдался после двухчасовой инкубации, при этом у четырех ферментов (кроме ГКП) он становился статистически достоверным после получасовой инкубации.

Таким образом, для повышения пенообразования изолятов, полученных из различных сортов гороха (в том числе из разных), можно порекомендовать обработку препаратами сериновых протеаз (БЩП, ГЩП). Они продемонстрировали хорошую способность повышать данный параметр как при pH 5.0, так и при pH 6.0.

Влияние обработки протеолитическими ферментами на стабильность пены изолятов. Исходная стабильность пены при pH 5 у изолята, выделенного из сорта Родник, была заметно выше, чем у выделенного из сорта Фокор: 68 против 55%. Среди исследуемых ферментов стабильность пены изолята

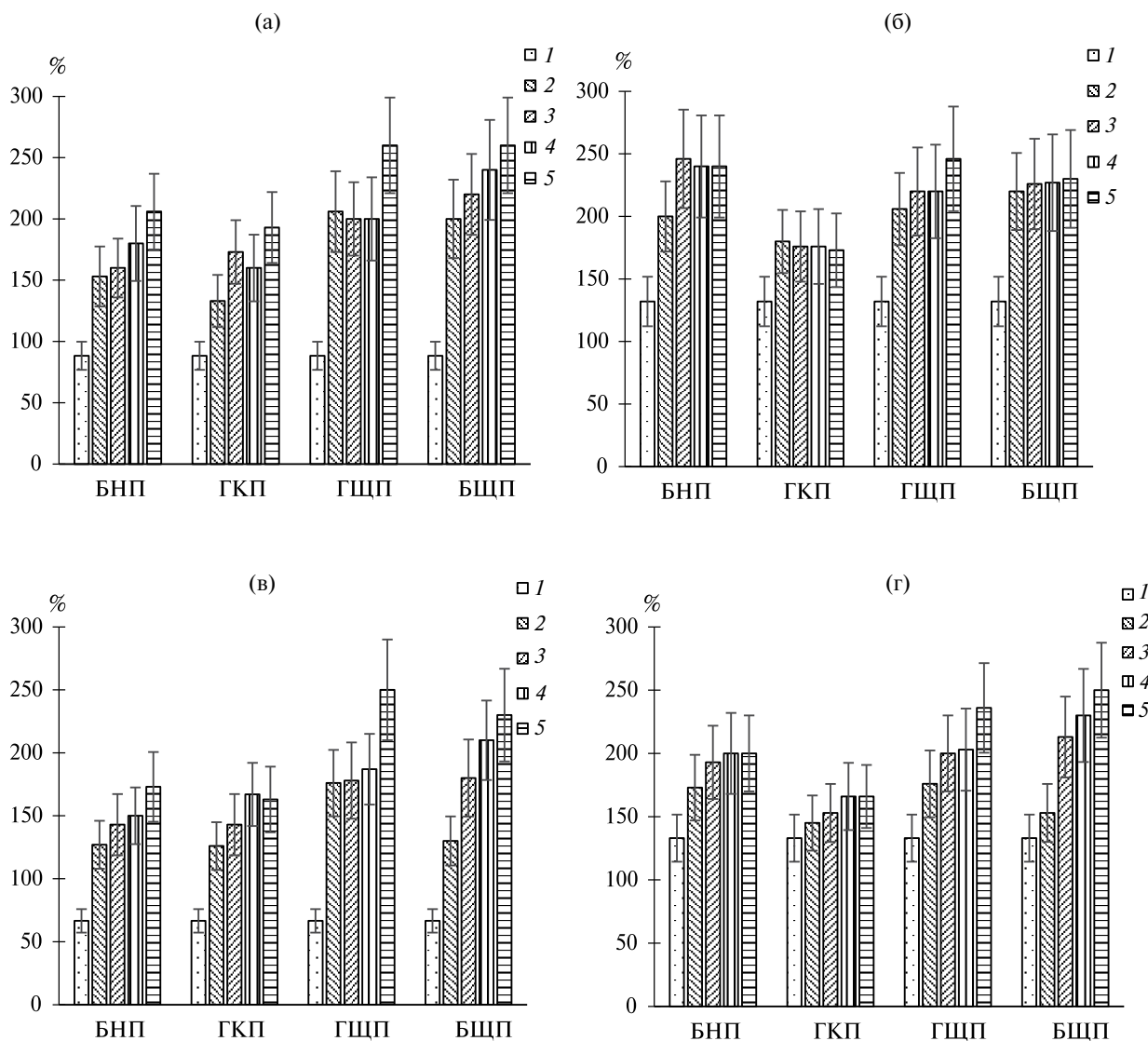


Рис. 5. Влияние обработки БНП, ГКП, ГЩП и БЩП на пенообразование изолятов горохового белка сортов Родник (а, в) и Фокор (б, г) при pH 5 (а, б) и 6 (в, г) при различном времени обработки: 1 — без обработки; 2 — 15 мин; 3 — 30 мин; 4 — 1 ч; 5 — 2 ч.

из сорта Родник повышали БЩП до 85%, БНП и ГКП — до 80%. При этом БЩП плавно повышал стабильность пены изолята Родник с течением времени (рис. 6а), максимальный эффект обработки БНП наступал после часовой инкубации, а обработки ГКП — после инкубации в течение 15 мин, после чего эффект этих двух ферментов исчезал.

В случае изолята, выделенного из сорта Фокор, стабильность пены повышалась при обработке всеми четырьмя исследованными ферментами. Наибольший эффект продемонстрировали БНП, ГЩП и БЩП: они повышали данный параметр до 72–73%, тогда как ГКП только до 66% (рис. 6). При обработке БНП статистически достоверное

повышение стабильности пены изолята из сорта Фокор наблюдалось, начиная с часовой инкубации и достигало максимума после двухчасовой, эффект ГЩП и БЩП выходил на плато после инкубации в течение 15 мин, а эффект ГКП достигал максимума после получасовой инкубации, а затем исчезал. Возможно, различия с изолятом из сорта Родник объяснялись более низкой исходной стабильностью пены изолята из сорта Фокор.

При pH 6.0 исходная стабильность пены у изолята, выделенного из сорта Родник, была заметно выше, чем у выделенного из сорта Фокор: 68 против 46% (рис. 6в). При обработке изолята из сорта Родник всеми изученными ферментами ни в одном

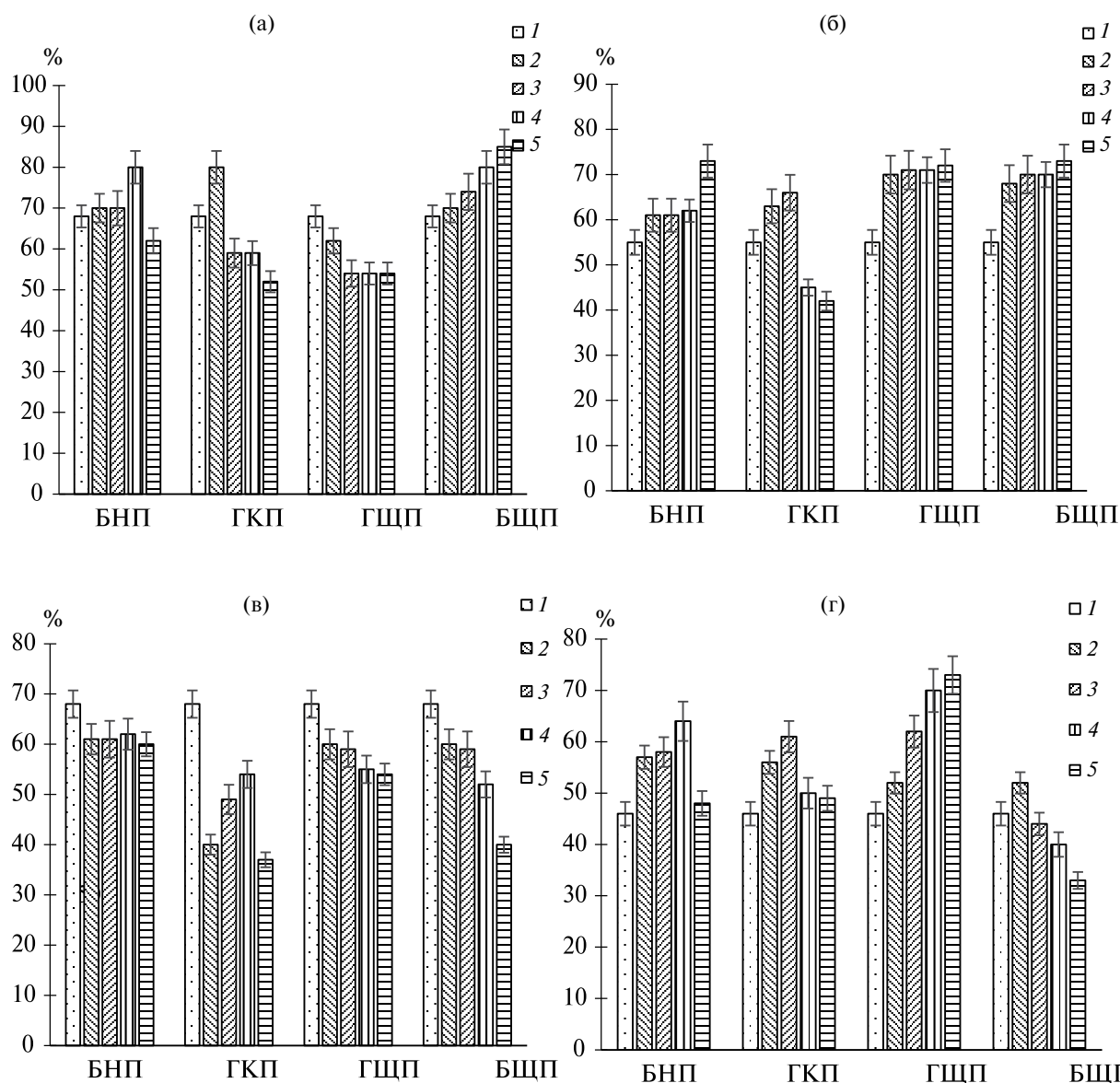


Рис. 6. Влияние обработки БНП, ГКП, ГЩП и БЩП на стабильность пены изолятов горохового белка сортов Родник (а, в) и Фокор (б, г) при pH 5.0 (а, б) и 6 (в, г) при различном времени обработки: 1 — без обработки, 2 — 15 мин; 3 — 30 мин; 4 — 1 ч; 5 — 2 ч.

случае не наблюдалось повышение стабильности пены при pH 6.0: протеолиз приводил только к уменьшению данного параметра. В отличие от изолята из сорта Родник, ограниченный протеолиз изолята из сорта Фокор увеличивал стабильность пены (рис. 6г). Наибольшее увеличение данного параметра наблюдалось при двухчасовой обработке изолята ГЩП (до 73%). БНП и ГКП показали меньший эффект: часовая инкубация с первым из них повышала стабильность пены до 64%, а получасовая инкубация со вторым — до 61%. Наименьший эффект наблюдался при обработке БЩП: после инкубации в течение 15 мин стабильность пены увеличилась только до 52%. Обработка ГЩП постепенно повышала стабильность пены изолята Фокор по

мере инкубации с ферментом, эффект БНП достигал максимума после часовой инкубации, эффект ГКП после получасовой, а эффект БЩП — после инкубации в течение 15 мин, при дальнейшей инкубации с этими ферментами стабильность пены изолята из сорта Фокор снижалась. Вероятно, различия с изолятом из сорта Родник также объясняются более низкой исходной стабильностью пены изолята из сорта Фокор. Таким образом, для повышения стабильности пены при pH 5.0 изолята из сорта Родник можно рекомендовать обработку БНП, ГКП или БЩП, а из сорта Фокор — БНП, ГЩП или БЩП. Если же приходится иметь дело с изолятом, полученным из разных сортов гороха, то предпочтительнее использовать БНП или БЩП, поскольку их

эффект более стабилен и менее зависим от взятого сорта гороха. Ни один из исследованных ферментов не повышал стабильность пены изолята из сорта Родник при pH 6.0, однако у этого изолята она и так была значительно выше, чем у изолята из сорта Фокор, последний только после самой эффективной обработки начинал превосходить изолят из сорта Родник по этому показателю, да и то ненамного. Это обстоятельство позволяет использовать изолят из сорта Родник без дальнейшего повышения стабильности пены. Что же касается изолята из сорта Фокор, то можно рекомендовать его обработку ГЩП. Препарат умеренно понижал стабильность пены изолята, полученного из сорта Родник, в связи с чем его можно использовать и для обработки изолятов, полученных из разных сортов гороха.

В случае необходимости комплексного улучшения функционально-технологических свойств изолята, предназначенного для производства продуктов с pH в диапазоне 5.0–6.0, с помощью обработки одним ферментом, то наиболее предпочтительным выбором будет использование БЩП. Этот фермент весьма существенно повышал растворимость изолятов при pH 5.0, эмульгирующую активность при pH 5.0 и 6.0, стабильность эмульсии при pH 6.0, пенообразование при pH 5.0 и 6.0, а также стабильность пены при pH 5.0.

Таким образом, в результате проведенной работы было исследовано влияние различных протеолитических ферментных препаратов отечественного производства на целый ряд характеристик изолятов горохового белка при слабокислых значениях pH, включая растворимость, эмульгирующую активность, стабильность эмульсии, пенообразование и стабильность пены. Были идентифицированы ферменты и отработаны условия обработки, позволяющие существенно повысить эти параметры изолятов, имеющие важнейшее значение при производстве растительных аналогов животных продуктов, а также продуктов для спортивного и лечебного питания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tesarowicz I., Zawislak A., Maciejaszek I., Surówka K.* // International J. Food Sciences. 2022. V. 2022. P. 6187441. <https://doi.org/10.1155/2022/6187441>
2. *Schlegel K., Sontheimer K., Eisner P., Schweiggert-Weisz U.* // Food Science & Nutrition. 2019. V. 8. P. 3041–3051. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1286>
3. *Meinlschmidt P., Schweiggert-Weisz U., Brode V., Eisner P.* // LWT — Food Science & Technology. 2016. V. 68. P. 707–716. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.023>
4. *Yust M. M., Pedroche J., Millán-Linares M. C., Alcaide-Hidalgo J. M., Millán F.* // Food Chemistry. 2010. V. 122. № 4. P. 1212–1217. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.053>
5. *Yust M. M., Millán-Linares M. D. C., Alcaide-Hidalgo J. M., Millán F., Pedroche J.* // Food Science & Technology International. 2013. V. 19. P. 217–223. <https://doi.org/10.1177/1082013212442197>
6. *Paraman I., Hettiarachchy N. S., Schaefer C., Beck M. I.* // Cereal Chemistry. 2007. V. 84. P. 343–349. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-84-4-0343>
7. *Neves V. A., Lourenço E. J., da Silva M. A.* // Arch. Latinoam. Nutr. 1996. V. 46. № 3. P. 238–242.
8. *Higgins T. J., Chandler P. M., Randall P. J., Spencer D., Beach L. R., Blagrove R. J., Kortt A. A., Inglis A. S.* // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. P. 11124–11130. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)67357-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)67357-0)
9. *Stone A. K., Karalash A., Tyler R. T., Warkentin T. D., Nickerson N. T.* // Food Research International. 2015. V. 76. P. 31–38. [doi:10.1016/j.foodres.2014.11.017](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.017)
10. *Asen N. D., Aluko R. E.* // Front Nutr. 2022. V. 9. P. 852225. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.852225>
11. *Ivanova P., Kalaydzhiyev H., Dessev T. T., Silva C. L. M., Rustad T., Chalova V. I. J.* // Food Sci. Technol. 2018. V. 55. № 9. P. 3792–3798. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3311-y>
12. *Nielsen P. M., Petersen D., Dammann C.* // J. Food Sci. 2001. V. 66. № 5. P. 642–646. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04614.x>
13. *Adler-Nissen J.* Enzymic Hydrolysis of Food Proteins. // New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1986. 427 p.
14. *Matoba T.* // Agric Biol Ghem. 1972. V. 36. P. 1423–1443. <https://doi.org/10.1080/00021369.1972.10860410>
15. *Barac M., Cabrilo S., Pesiesic M., Stanojevic S., Zilic S., Macej O., Ristic N.* // Int. J. Mol. Sci. 2010. V. 1. P. 4973–4990. <https://doi.org/10.3390/ijms11124973>
16. *Robinson G. H., Domoney C.* // Plant Physiol. Biochem. 2021. V. 158. P. 353–362. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.11.020>
17. *Klost M., Drusch S.* // Food Hydrocoll. 2019. V. 86. P. 134–140. <https://doi.org/10.14279/depositonce-9553>

Effect of Different Classes of Proteases on Techno-functional Properties of Pea Protein Isolates

**I. V. Kravchenko^{a, *}, V. A. Furalyov^a, E. V. Kostyleva^b, A. S. Sereda^b,
E. I. Kurbatova^b, N. V. Tsurikova^b, E. S. Pshennikova^a, T. V. Boyarintseva^a,
V. O. Popov^a, and A. N. Fedorov^a**

^a*Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the RAS, Moscow, 119071 Russia*

^b*All-Russian Scientific Research Institute of Food Biotechnology — a Branch of the Federal Research Center for Nutrition, Biotechnology and Food Safety, Moscow, 111033 Russia*

**e-mail: ink71@yandex.ru*

The effect of four enzyme preparations: bacillolysin, agroprot, protozyme and protozyme C (Russia) on solubility, emulsifying activity, emulsion stability, foaming and foam stability of isolates prepared from two varieties of peas was studied. It is shown that treatment with enzymes can increase the solubility of isolates at pH 5 by more than 7 times, the index of emulsifying activity at pH 5 by 1.5 to 2 times, and at pH 6 by almost 1.5 times; the stability index of the emulsion increased by about 20% at pH 5, and by 1.7 times (in one of the varieties) at pH 6; foaming increased by 2.4 to 3 times at pH 5, and at pH 6 by 1.8 to 3.7 times; foam stability increased by 25 to 33% at pH 5 and by more than 1.5 times (in one of the varieties) at pH 6. The results obtained made it possible to select an enzyme preparation (bacterial alkaline serine protease) to improve the parameters of pea protein isolates intended for the manufacture of analogues of fermented milk products.

Key words: pea protein isolate, alkaline proteases, acid protease, neutral protease

УДК 547.992+577.175

ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ СТЕРОИДНЫХ ФИТОГОРМОНОВ В ГУМИНОВЫХ ПРЕПАРАТАХ

© 2024 г. Р. П. Литвиновская¹, *, А. Л. Савчук¹, Д. В. Денисюк¹,
Д. Г. Переход², Г. В. Переход², В. А. Хрипач¹

¹Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси,
Минск, 220084 Республика Беларусь

²ЗАО “Органик Фарминг Бел”, Минск, 220033 Республика Беларусь

*e-mail: litvin@iboch.by

Поступила в редакцию 06.06.2023 г.

После доработки 09.08.2023 г.

Принята к публикации 31.08.2023 г.

Впервые показано, что в составе гуминовых препаратов содержатся стероидные фитогормоны — брассиностероиды (БС), количество и состав которых варьируют в зависимости от источника сырья и способа его обработки. Установлено, что качественный и количественный состав БС коррелирует с содержанием гуминовых веществ (гуминовых кислот). На примере гуминовых препаратов, полученных из сапропеля, обнаружено, что щелочная обработка приводит к высвобождению заметного количества БС, находившихся в виде конъюгатов. Данные результаты свидетельствуют о том, что БС являются важными компонентами гуминовых препаратов и, несомненно, вносят вклад в широкий спектр физиологического действия данных агропрепаратов.

Ключевые слова: брассиностероиды, гуминовые препараты, иммуноферментный анализ

DOI: 10.31857/S0555109924010092, **EDN:** HBXAMF

Гуминовые вещества являются составной частью органического вещества почвы. Они образуются при разложении растительных и животных остатков под действием микроорганизмов и абиотических факторов среды и являются основным компонентом почвенного гумуса. Известно, что при обработке растений гуминовыми препаратами происходит повышение клеточного метаболизма и скорости фотосинтеза, ускоряется транспортировка питательных веществ, улучшается работа корневой системы, подавляется развитие грибковых заболеваний и обеспечивается устойчивость к фитопатогенам [1].

Положительное действие гуминовых препаратов на рост и развитие растений неоднократно отмечалось многими исследователями. На примере растений герберы показано, что гуминовые кислоты способствуют росту растений, развитию корневой системы, улучшая усвоение питательных веществ, и в целом проявляют гормоноподобную активность [2]. Применение гуминового препарата на посевах озимой пшеницы позволяет снизить токсическое действие гербицида на основе сульфонилмочевины, улучшить обеспеченность почвы минеральными элементами питания и повысить урожайность сельскохозяйственных культур [3]. В работе [4] показано, что применение гумата калия на растениях бобов привело к повышению урожайности данной

культуры за счет увеличения индекса стабильности мембраны и относительного содержания воды, снижения утечки электролитов и накопления питательных веществ (аминокислот, сахаров).

Одной из особенностей биологической активности гуминовых препаратов является повышение устойчивости растений к воздействию неблагоприятных условий окружающей среды (абиотические и биотические стрессы) и, как следствие, расширение диапазона климатических условий их роста, развития и плодоношения. Ряд исследований посвящены изучению защитного действия гуминовых препаратов при развитии растений в условиях солевого стресса [5–8]. Неоднократно показано, что применение гумата калия снижает токсическое действие соли и повышает устойчивость растений за счет повышения эффективности процессов фотосинтеза и снижения окислительного стресса, а также увеличивает процент всхожести семян и урожайность. Данный эффект показан на примере различных растительных культур — растений базилика [5], пшеницы [6, 7], фасоли [8] и др. Положительный эффект гумата калия при токсическом воздействии солями мышьяка на растения риса заключался в повышении процента прорастания семян, стимуляции роста проростков, повышении содержания питательных веществ, фотосинтетических пигментов, а также снижении

уровня окислительного стресса за счет уменьшения накопления мышьяка в растительных тканях [9]. Внекорневая обработка растений лука гуматом калия способствовала росту, повышала продуктивность и питательную ценность лука в условиях дефицита орошения [10, 11].

При определении соединений, отвечающих за биологическую активность гуминовых препаратов, кроме гуминовых и фульвовых кислот, называют каротиноиды, металлопорфирины, тритерпеноиды, алкалоиды, стероиды и др. [12]. Учитывая тот факт, что гуминовые препараты являются биостимуляторами широкого спектра действия, можно предположить, что важной составляющей в этом контексте могут быть брассиностероиды (БС) — фитогормоны растений [13]. БС играют важную роль в регуляции роста, развития и ряда ключевых

физиологических функций, проявляют стимулирующее и стресспротекторное действие. Необходимо отметить, что БС проявляют свое биологическое действие в очень низких концентрациях. Благодаря своим свойствам стероидные фитогормоны являются основой экологически безопасных препаратов для растениеводства Эпин, Эпин плюс, причем количество необходимое для обработки 1 га посевов составляет 5–50 мг.

Проведенное нами недавно исследование образцов угля и торфа (основных источников гуминовых препаратов) разного возраста из месторождений Беларуси показало, что все они содержат стероидные фитогормоны основных природных групп (ряда 24-эпибрассинолида, брассинолида и 28-гомобрассинолида) [14]. Мы пришли к выводу, что, несмотря на сложную химическую структуру, эти

Таблица 1. Характеристика исследуемых образцов

№	Наименование образца (Производитель)	Состав гуминового препарата*	Содержание гуминовых веществ в препарате**, г/л	Содержание гуминовых кислот в препарате **, г/л
1	Жидкий биогумус (ООО “БЕЛГРУНТ”, РБ)	Органическое удобрение, получаемое при биотехнологической переработке органических отходов животноводства методом вермикомпостирования с помощью технологической линии дождевого навозного червя вида <i>Eisenia foetid</i> . Состав: гуминовые кислоты не менее 2.0 г/л, Fe, Mg, B, Mn, Cu, Mo, Zn	Нет данных	2.0
2	Лигногумат марки В калийный (ООО “Агро Эксперт Груп”, РФ)	Соли гуминовых веществ 18%, гуминовые кислоты 11%, фульвовые кислоты 5%, калий не менее 1.8%, сера не менее 0.6%	180.0	110.0
3	Гидрогумат калия (УП “Белуниверсал-продукт”, РБ)	Массовая доля гуминовых веществ/ массовая доля органических веществ — не менее 50%, массовая доля органического вещества — не менее 7.0%	35.0	Нет данных
4	HumiFirst (“Tradecorp”, Испания)	Содержание гуминовых веществ 165.0 г/л (15.0%), гуминовых кислот 132.0 г/л (12.0%), фульвовых кислот 33.0 г/л (3.0%)	165.0	132.0
	SatoHum®K (ЗАО “Органик фарминг Бел”, РБ)	Массовая доля сухого вещества ≥9.0%, органических веществ ≥7.0%, содержание гуминовых кислот ≥35.0 г/л, фульвовых кислот ≥41.0 г/л, азота ≥1.5 г/л, фосфора ≥0.1 г/л, калия ≥10.0 г/л	76.0	35.0
6	SatoHum®Complex (ЗАО “Органик фарминг Бел”, РБ)	Массовая доля сухого вещества ≥6.0%, органических веществ ≥4.5%, содержание гуминовых кислот ≥20.0 г/л, фульвовых кислот ≥60.0 г/л, аминокислот ≥28.0 г/л, азота ≥25.0 г/л, фосфора ≥17.0 г/л, калия ≥25.0 г/л	80.0	20.0
7	SatoHum®K-G24 (ЗАО “Органик фарминг Бел”, РБ)	Массовая доля сухого вещества ≥8.0%, органических веществ ≥7.5%, содержание гуминовых кислот ≥35.0 г/л, фульвовых кислот ≥45.0 г/л	80.0	35.0
8	Сухой сапропель (ЗАО “Органик фарминг Бел”, РБ)	Влажность ~ 50%.	Нет данных	Нет данных

* Состав указан согласно каталогу компании.

** Содержание гуминовых веществ и гуминовых кислот указано согласно каталогу компании, пересчитанное в г/л для установления корреляции с содержанием БС.

гормоны достаточно стабильны в различных условиях. Поскольку гуминовые препараты в своей основе являются продуктами растительного происхождения (их, как правило, получают из бурых углей, торфа или сапропелей с помощью щелочной обработки), то, вероятно, в своем составе они имеют растительные гормоны и другие биоактивные компоненты, за счет которых, в том числе, они обладают гормоноподобной активностью и проявляют широкий спектр физиологического действия.

Цель работы — исследование гуминовых препаратов различного происхождения на предмет содержания стероидных фитогормонов — brassinosterоидов.

МЕТОДИКА

В качестве объектов исследования использовали коммерчески доступные гуминовые препараты различных производителей (табл. 1). Все исследуемые образцы, кроме образца сухого сапропеля **8**, имели жидкую препаративную форму. Образцы препаратов **1–4** приобретены через торговую сеть, **5–8** предоставлены фирмой-производителем. Последние получены из сапропеля, добытого в Лельчицком районе Гомельской области (Беларусь), месторождение Прибыловичи.

Получение образцов SatoHum (5–7) из сапропеля. Сапропель органический обрабатывают горячим воздухом (450°C) и измельчают (одновременно с обработкой горячим воздухом) молотковой дробилкой (100 кВт) в течение 40–80 сек. Процесс прекращают при достижении влажности ~50% и размера минимальных частиц 100 мкм (размер частиц регулируется классификатором сушильного агрегата). Таким образом получают сухой сапропель (образец **8**). В реактор загружают 1560 кг воды, нагревают до 80°C и при перемешивании (140 об./мин) добавляют 15 кг КОН и 1560 кг сухого сапропеля. Состав перемешивают в течение 2.5 ч, пропускают через декантерную центрифугу и расфасовывают в тару. Конечное содержание гуминовых и фульвовых кислот в образцах препаратов **5, 6 и 7** варьирует из-за внесения различного количества добавок. Так, для получения образца **6** добавляют аминокислоты в количестве не менее 28.0 г/л. Образец **7** является экспериментальным, поэтому его описание и полный состав отсутствуют в каталоге компании.

Анализ содержания БС в гуминовых препаратах. Образцы гуминовых препаратов для анализа готовили методом последовательного разведения в буферном растворе (0.05 М Трис, рН 7.4, содержащий 0.9% NaCl, 0.1% БСА, 0.02% ТвинTM20) в 10, 50, 100, 200, 400, 800 раз. Полученные растворы перед анализом центрифугировали в течение 15 мин на приборе BioSun LMC-4200R (2257 g).

Количественную оценку содержания БС в образцах гуминовых препаратов проводили методом двухстадийного иммуоферментного

анализа (ИФА) [15] с использованием разработанных нами ранее тест-систем (ТУ ВУ100185129.178–2020) для следующих групп brassinosterоидов: 24-эпи- (24-эпибрасинолид, 24-эпикастастерон) [16], 24S-метил- (брасинолид, кастастерон) [17], 28-гомо- (28-гомобрасинолид, 28-гомокастастерон) [18], В-лактон- (брасинолид, 24-эпибрасинолид, 28-гомобрасинолид, 28-норбрасинолид) [19] и 6-кетобрасиностероидов (кастастерон, 24-эпикастастерон, 28-гомокастастерон, 28-норкастастерон) [15].

Двухстадийный ИФА проводили следующим образом. Калибровочные пробы готовили методом серийных разведений исходного спиртового раствора brassinosterоида с известной концентрацией (10^{-4} М) буферным раствором (0.05 М Трис, рН 7.4, содержащий 0.9% NaCl, 0.1% БСА, 0.02% ТвинTM20). Раствор ферментативного конъюгата brassinosterоида с пероксидазой из корней хрена (ПХ) готовили также в буферном растворе. В полистирольные лунки планшета с иммобилизованными антителами вносили по 150 мкл калибровочных проб и анализируемых образцов в дубликатах. Концентрация стероида в калибровочных пробах составляла 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 и 5 нМ. Планшет инкубировали при 37°C в течение 2 ч, после чего содержимое лунок удаляли и промывали их промывочным раствором (1%-ный NaCl, содержащий 0.02% ТвинTM20). Затем во все промытые лунки добавляли по 150 мкл раствора конъюгата соответствующего brassinosterоида с ПХ и инкубировали 5 мин при 37°C. Затем удаляли содержимое, промывали, как описано выше, добавляли по 150 мкл хромоген-субстратной смеси (готовый раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина в субстратном буфере с перекисью водорода) и инкубировали при 37°C в течение 20 мин. Останавливали реакцию добавлением во все лунки по 50 мкл раствора стоп-реагента (5%-ного раствора H₂SO₄). Оптическую плотность раствора во всех лунках измеряли на фотометре универсальном Ф300ТП (РУПП “Витязь”, Беларусь) при длине волны 450 нм.

Для каждой калибровочной пробы рассчитывали средние арифметические значения оптической плотности, строили график зависимости показателя $B/B_0 \cdot 100\%$ от концентрации brassinosterоида в калибровочных пробах (нМ), где B и B_0 — значения оптической плотности продукта ферментативной реакции в присутствии свободного brassinosterоида и без него соответственно. Методом интерполяции по калибровочному графику рассчитывали концентрацию БС (нМ) в анализируемой пробе. Сигмоидальные калибровочные кривые линеаризовали с помощью преобразования log-logit:

$$\text{logit } B/B_0 = \ln((B/B_0)/(100 - B/B_0)).$$

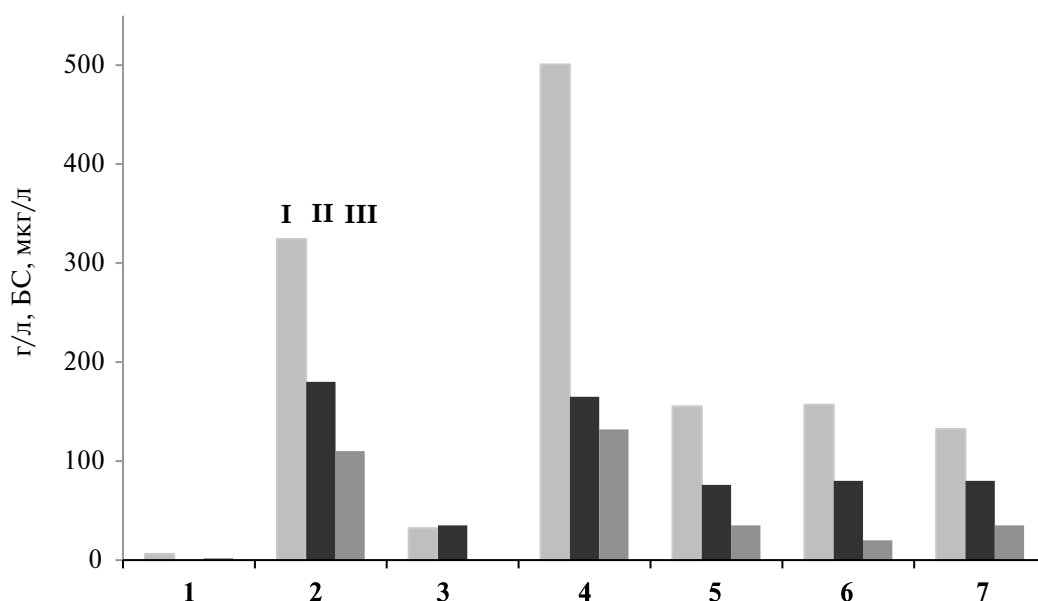


Рис. 1. Корреляция суммарного содержания БС (I, мкг/л) в гуминовых препаратах с содержанием гуминовых веществ (II — гуминовые вещества, г/л; III — гуминовые кислоты, г/л): 1 — жидкий биогу́мус, 2 — лигногу́мат марки В калийный, 3 — гидрогу́мат калия, 4 — HumiFirst, 5 — “SatoHum”®К, 6 — “SatoHum”®Complex, 7 — “SatoHum”®K-G24”.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программы Microsoft Office Excel 2010.

Анализ содержания БС в сухом сапропеле. Сухой сапропель получали высушиванием грязевого сапропеля до влажности 46–48%. Для высокой степени извлечения БС из сухого образца сапропеля в качестве экстрагента использовали 80%-ный водный метанол. Навеску сухого сапропеля 1 г экстрагировали 5 мл 80%-ного водного метанола. Полученную взвесь интенсивно перемешивали, выдержали при комнатной температуре в течение 18 ч, центрифугировали. Полученный супернатант анализировали методом конкурентного ИФА по следующей методике.

Конкурентный ИФА. Калибровочные пробы готовили методом серийных разведений исходного спиртового раствора с известной концентрацией (10^{-4} М) брассиностероида буферным раствором. Концентрация стероида в калибровочных пробах составляла 0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 и 30 нМ. Раствор ферментативного конъюгата брассиностероид-ПХ готовили также на буферном растворе. Концентрацию конъюгата подбирали с таким расчетом, чтобы оптическая плотность в лунке, содержащей калибровочную пробу с “нулевым” содержанием стероида, составляла не менее 2.0 опт. ед.

В полистирольные лунки планшета с иммобилизованными антителами к соответствующему брассиностероиду вносили по 100 мкл калибровочных проб в дубликатах, а затем в лунки с калибровочными пробами вносили по 25 мкл 80%-ного водного метанола. В лунки, предназначенные для

анализируемых образцов, вносили по 100 мкл буферного раствора (0.05 М Трис, pH 7.4), а затем вносили по 25 мкл метанольного экстракта сухого сапропеля в повторностях. Затем во все лунки вносили по 50 мкл раствора конъюгата соответствующего брассиностероида с ПХ в буферном растворе. Планшет инкубировали в течение 2 ч при 37°C в термостате, затем удаляли содержимое лунок и промывали их промывочным раствором (4×150 мкл). Дальнейшую процедуру анализа и расчет результатов проводили как описано выше для двухстадийного метода.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Гуминовые кислоты содержатся в таких осадочных породах, как бурый уголь, сапропель и торф. Бурый уголь содержит больше всего гуминовых кислот (до 86%) [20]. Ранее были исследованы образцы нефти [21], угля и торфа на предмет содержания БС [14]. Результаты показали, что эти объекты растительного происхождения содержали значительное количество БС, состав которых меняется в зависимости от отложений, глубины скважин и других факторов.

В настоящей работе впервые исследовано количественное содержание БС в коммерчески доступных гуминовых агропрепаратах, изготовленных из различного сырья растительного и животного происхождения, методом двухстадийного ИФА.

Двухстадийный ИФА является высокочувствительным экспресс-методом количественного определения БС в многокомпонентных сложных смесях,

Таблица 2. Содержание БС в образцах гуминовых препаратов и сухом сапропеле

№	Образец	24-эпиБС*	24S-метилБС**	28-гомоБС***	В-лактон-БС****	6-кето-БС*****	Суммарное содержание БС
		мкг/л					
1	Жидкий биогумус	4.82 ± 0.386	0.018 ± 0.004	0.910 ± 0.119	0.455 ± 0.035	0.036 ± 0.007	6.239
2	Лигногумат марки В калийный	222.0 ± 19.1	3.33 ± 0.500	35.72 ± 6.43	54.20 ± 6.27	9.13 ± 1.01	324.38
3	Гидрогумат калия	26.7 ± 3.20	0.136 ± 0.017	3.23 ± 0.251	1.65 ± 0.060	0.608 ± 0.073	32.324
4	HumiFirst	296.5 ± 32.6	5.60 ± 0.672	108.8 ± 21.76	72.25 ± 14.5	17.63 ± 3.50	500.78
5	SatoHum® К	31.3 ± 2.51	5.44 ± 0.34	22.9 ± 1.69	75.0 ± 4.41	20.7 ± 1.40	155.34
6	SatoHum® Complex	23.9 ± 2.73	8.32 ± 0.62	23.9 ± 2.45	76.7 ± 6.12	24.2 ± 2.97	157.02
7	SatoHum® К-G24	23.7 ± 2.72	15.9 ± 1.85	32.4 ± 0.74	39.5 ± 4.10	20.9 ± 2.52	132.4
8	Сухой сапропель (мкг/кг)	13.1 ± 1.01	1.36 ± 0.100	29.3 ± 2.55	4.11 ± 0.327	2.22 ± 0.294	50.09

*24-эпиБС – БС ряда 24-эпибрассиностероида (24-эпибрассинолид, 24-эпикастастерон, 24-эпи-6-дезоксокастастерон);
**24S-метилБС – БС ряда 24S-метилбрасиностероида (брасинолид, кастастерон, 6-дезоксокастастерон)
***28-гомоБС – 28-гомобрасиностероиды (28-гомобрасинолид и 28-гомокастастерон);
****В-лактон-БС – БС ряда В-лактон-брасиностероидов (24-эпибрассинолид, брасинолид, 28-гомобрасинолид, 28-норбрасинолид и др.)
*****6-кетоБС – БС ряда 6-кетобрассиностероидов (24-эпикастастерон, кастастерон, 28-гомокастастерон, 28-норкастастерон и др.).

эффективность и достоверность которого неоднократно подтверждена независимым инструментальным методом [14, 15, 22]. В основе двухстадийного метода ИФА лежит принцип разделения фаз взаимодействия определяемого и меченого антигенов с антителами, что позволяет существенно повысить чувствительность анализа и проводить измерения БС в различных объектах без многостадийной пробоподготовки. Высокая чувствительность метода позволяет в большей степени разводить исследуемые образцы, в частности гуминовые препараты, буферным раствором (рН 7.4), существенно снижая влияние матрикса на взаимодействие аналитов.

Полученные данные свидетельствуют о том, что все исследованные образцы содержали БС основных природных групп: 24-эпибрассинолида, брасинолида, 28-гомобрасинолида, В-лактонов и 6-кетонов (табл. 2). Из полученных данных видно, что содержание БС в образцах препаратов сильно различалось, однако сопоставимо с эндогенным уровнем в растительных объектах [23]. Очевидным является тот факт, что количественное содержание БС коррелировало с содержанием гуминовых веществ (рис. 1). Наиболее высокое суммарное содержание стероидных гормонов наблюдалось в образцах 4 (500.78 мкг/л) и 2 (324.38 мкг/л), в которых содержание гуминовых веществ составляло 165.0 и 180.0 г/л соответственно, что является максимальным среди представленных препаратов. Для образца 1, полученного не из растительного сырья, а из отходов животноводства, с низким содержанием гуминовой кислоты (2.0 г/л) показано и минимальное содержание БС (6.239 мкг/л). Довольно высокое содержание БС также показано в образцах 5, 6 и 7 (155.34, 157.02 и 132.4 нг/мл), полученных на основе сапропелей, причем содержание гуминовых веществ составляло 76.0–80.0 г/л.

Необходимо отметить, что для всех образцов гуминовых препаратов характерно низкое содержание БС ряда брасинолида. Такой факт был отмечен и при исследовании образцов угля и торфа [22, 23]. В данном случае, вероятнее всего, содержание БС определялось непосредственно источником растительного сырья, из которого был получен тот или иной образец препарата, и способом обработки.

Интересным является тот факт, что содержание БС всех изученных групп (в меньшей мере группы 28-гомобрасинолида) в сухом сапропеле (образец 8) значительно ниже, чем в препаратах, полученных на его основе (образцы 5–7). Полученные данные могут свидетельствовать о том, что БС в сухом сапропеле содержались, в основном, в виде производных, которые при щелочной обработке в процессе получения гуминовых препаратов претерпевали гидролиз, образуя свободные БС. В пользу таких рассуждений свидетельствуют выделенные из растительных источников и охарактеризованные производные брасиностероидов, такие, например, как сульфаты [24], конъюгаты с глюкозой [25, 26], глюкозилглюкозой и глюкозилгалактозой [27], жирными кислотами [28]. Все эти соединения принято относить к метаболитам брасиностероидов [29].

Таким образом, на основе полученных результатов можно сделать вывод, что изученные образцы гуминовых препаратов содержали значительное количество БС, состав и количество которых изменялся в зависимости от источника растительного сырья и способа обработки. Количество и состав БС коррелировал с содержанием гуминовых веществ (гуминовых кислот). Очевидно, что БС являются важными компонентами гуминовых препаратов и, несомненно, вносят вклад в широкий спектр физиологического действия данных агропрепаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке БР ФФИ (грант Х23РНФ-087).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lucini L., Miras-Moreno B., Ertani A. Biostimulants for Sustainable Crop Production. / Ed. Y. Roupheal, P. Jardin, P. Brown, S. de Pascale, G. Colla. Imprint Burleigh Dodds Science Publishing, 2020. 386 p.
2. Nikbakht A., Kafi M., Babalar M., Ping Xia Y., Luo A., Ettemadi N.-A. // Journal of Plant Nutrition. 2008. V. 31. № 12. P. 2155–2167.
3. Bezuglova O. S., Gorovtsov A. V., Polienko E. A., Zinchenko V. E., Grinko A. V., Lykhman V. A. et al. // Journal of Soils and Sediments. 2019. № 6. P. 2665–2675.
4. Mahdi A. H. A., Badawy Sh. A., Latef A. A. H. A., El Hosary A. A. A., Abd El Razek U. A., Taha R. S. // Agronomy. 2021. V. 11. № 3. P. 461.
5. Reyes-Perez J. J., Murillo-Amador B., Nieto-Garibay A., Hernández-Montiel L.G., Ruiz-Espinoza F. H., Rueda-Puente E. O. // Pak. J. Bot. 2021. V. 53. № 4. P. 1159–1165.
6. Salem H. M., Abo-Setta Y., Aiad M. A., Hussein H.-A. A., El-Awady R. A. // J. Soil Sci. Agric. Eng. 2017. V. 8. № 11. P. 565–569.
7. Osman M. E. H., Mohsen A. A., El-Feky S. S., Mohamed W. A. // Egypt. J. Bot. 2017. P. 85–102.
8. Taha S. S., Osman A. Sh. // J. Hortic. Sci. Biotechnol. 2018. V. 93. № 5. P. 545–554.
9. Mridha D., Paul I., Ray I., De A., Das A., Joardar M. et al. // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2021. V. 219. P. 112313.
10. Abdelrasheed Kh. G., Mazrou Y., Omara A. E.-D., Osman H. S., Nehela Y., Hafez E. M. et al. // Plants. 2021. V. 10. P. 2598.
11. Hefzy M. Mostafa H., Zahran M. // Env. Biodiv. Soil Security. 2020. V. 4. P. 239–251.
12. Wang Y., Lu Y., Wang L., Song G., Ni L., Xu M. et al. // Plant Science. 2023. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1122621>
13. Khrpach V. A. Brassinosteroids. A New Class of Plant Hormones / V. A. Khrpach, V. N. Zhabinskii, A. de Groot. San Diego: Academic Press, 1999. 456 p.
14. Гарецкий П. Г., Барановский А. В., Жабинский В. Н., Литвиновская Р. П., Прядко А. Г., Савчук А. Л. и др. // Доклады Российской академии наук. Науки о Земле. 2021. № 2. С. 128–132.
15. Pradko A. G., Litvinovskaya R. P., Sauchuk A. L., Drach S. V., Baranovsky A. V., Zhabinskii V. N. et al. // Steroids. 2015. V. 97. P. 78–86.
16. Хрипач В. А., Свиридов О. В., Прядко А. Г., Литвиновская Р. П., Драч С. В., Матвеев В. Д. и др. // Биоорганическая химия. 2007. Т. 33. № 3. С. 371–378.
17. Хрипач В. А., Литвиновская Р. П., Драч С. В., Аверькова М. А., Жабинский В. Н., Свиридов О. В. и др. // Доклады НАН Беларуси. 2009. Т. 53. № 6. С. 82–85.
18. Хрипач В. А., Литвиновская Р. П., Райман М. Э., Драч С. В., Жабинский В. Н., Свиридов О. В. и др. // Весці НАН Беларусі, сер. хім. навук. 2008. № 3. С. 47–58.
19. Khrpach V. A., Sviridov O. V., Pryadko A. G., Litvinovskaya R. P., Drach S. V., Matveitsev V. D. et al. // Nat. Prod. Commun. 2008. V. 3. № 5. P. 735–748.
20. Kambatyrov M., Nazarbek U., Abdurazova P., Nazarbekova S., Raiymbekov Y. // Rasayan J. Chem. 2020. V. 13. № 3. P. 1308–1312.
21. Гарецкий П. Г., Грибик Я. Г., Литвиновская Р. П., Савчук А. Л., Мардосевич М. А., Хрипач В. А. // Доклады Российской академии наук. Науки о Земле. 2020. Т. 494. № 1. С. 29–32.
22. Литвиновская Р. П., Савчук А. Л., Томанова М. А., Хрипач В. А. // Химия природных соединений. 2019. Т. 55. № 5. С. 847–848.
23. Bajguz A., Tretyn A. // Phytochemistry. 2003. V. 62. № 7. P. 1027–1046.
24. Rouleau M., Marsolais F., Richard M., Nicolle L., Voigt B. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 20925–20930.
25. Soeno K., Kyokawa Y., Natsume M., Abe H. // Biosci. Biotech. Biochem. 2000. V. 64. P. 702–709.
26. Suzuki H., Kim S. K., Takahashi N., Yokota T. // Phytochem. 1993. V. 33. P. 1361–1367.
27. Kolbe A., Schneider B., Porzel A., Adam G. // Phytochem. 1998. V. 48. P. 467–470.
28. Asakawa S., Abe H., Nishikawa N., Natsume M., Koshioka M. // Biosci. Biotech. Biochem. 1996. V. 60. P. 1416–1420.
29. Fujioka S., Yokota T. // Annu. Rev. Plant Biol. 2003. V. 54. P. 137–164.

Evaluation of the Content of Steroid Phytohormones in Humic Preparations

R. P. Litvinovskaya^{a, *}, A. L. Sauchuk^a, D. V. Denisiuk^a,
D. G. Perakhod^b, R. V. Perakhod^b, and V. A. Khrpach^a

^aInstitute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220084 Belarus

^bCJSC “Organic Farming Bel”, Minsk, 220033 Belarus

*e-mail: litvin@iboch.by

It was shown for the first time that humic preparations contain steroidal phytohormones — brassinosteroids (BS), the amount and composition of which vary depending on the source of raw materials and the method of its processing. It has been established that the qualitative and quantitative composition of BS correlates with the content of humic substances (humic acids). Using the example of humic preparations obtained from sapropel, it was found that alkaline treatment leads to the release of a noticeable amount of BS present in the form of conjugates. These results indicate that BS are important components of humic preparations and undoubtedly contribute to a wide range of physiological effects of these agricultural preparations.

Keywords: brassinosteroids, humic preparations, enzyme immunoassay

УДК 658.562.012.7

ОЦЕНКА НУТРИЕНТНОГО И МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ КЕТЫ ТИХООКЕАНСКОЙ (*Oncorhynchus keta*)

© 2024 г. Л. С. Абрамова¹, А. В. Козин^{1, *}

¹Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии, Москва, 105187 Россия

*e-mail kozin82a@gmail.com

Поступила в редакцию 26.04.2023 г.

После доработки 06.06.2023 г.

Принята к публикации 06.07.2023 г.

Анализ биологической ценности кеты показал, что по сбалансированности аминокислотного состава белка кета с нерестовыми изменениями не уступает кете без нерестовых изменений (кета “серебрянка”). Отмечено более высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот в общих липидах, в том числе омега-3 в кете с нерестовыми изменениями, по сравнению с кетой “серебрянкой”. Метаболический профиль образцов мышечной ткани кеты, полученный методом ЯМР-спектроскопии показал, что уровень Асп, Глу и Глю заметно повышался во время нерестовой миграции, что объясняется ограниченным питанием рыбы. Рассчитан суммарный индекс вкуса мышечной ткани кеты “серебрянки”, который составил 4.06 ± 0.11 , а для кеты с нерестовыми изменениями — 3.46 ± 0.09 , следовательно, мясо кеты “серебрянки” имеет более насыщенный вкус, по сравнению с кетой, имеющей нерестовые изменения. Результаты анализа пищевой ценности и метаболического профиля мышечной ткани кеты с нерестовыми изменениями могут быть использованы при изготовлении рыбного фарша и последующего производства специализированной пищевой продукции путем введения добавок, стабилизирующих консистенцию, цвет, а также при изготовлении функциональных пищевых добавок.

Ключевые слова: кета тихоокеанская, нерестовые изменения, биологическая ценность, метаболический профиль, ЯМР-спектроскопия, индекс вкуса.

DOI: 10.31857/S0555109924010109, **EDN:** HBTKQM

Вопросу обеспечения потребителя рыбной продукцией безопасной и гарантированного качества уделяется большое внимание как со стороны добывающих, так и рыбоперерабатывающих предприятий. Для решения данной задачи необходимо хорошо знать изменения, протекающие в рыбе, связанные с сезоном добычи, возрастом, полом рыбы, а также с нерестом, и иметь возможность объективно контролировать основные показатели, характеризующие сырье.

В этом отношении значительный интерес представляют тихоокеанские лососи (горбуша *Oncorhynchus gorbuscha*, кета *O. keta*, нерка *O. nerka*, кижуч *O. kisutch*, чавыча *O. tshawytscha*), которые являются наиболее ценными в пищевом отношении видами среди промысловых рыб Дальнего Востока и составляют 10% от среднегодового общего улова Российской Федерации [1, 2]. Одним из важных промысловых видов тихоокеанских лососевых рыб является кета *Oncorhynchus keta* (Walbaum, 1792) — второй по численности вид после горбуши *O. gorbuscha* (Walbaum, 1792) [3, 4]. Основным критерием качества кеты в качестве сырья для дальнейшей переработки является цвет мяса, предпочтительно розовый, оранжевый или

красный. В морской период жизни кета имеет серебристую окраску тела, без полос и пятен. В состав пищи в местах нагула в корм кеты включается зоопланктон, который является источником каротиноида астаксантина, который придает характерные розовые оттенки мясу. С входом в опресненную воду начинается мобилизация астаксантина в кожу и овоциты, вследствие чего серебристая окраска начинает заменяться “брачным нарядом”, цвет поверхности становится темным, на боках появляются малиново-лиловые вертикальные полосы, а цвет мяса становится вплоть до светло-серого [5, 6]. В это время происходит также изменение нутриентного состава, что отражается на пищевой ценности как сырья, так и продукции, которая производится из этого вида рыбы. Изучение особенностей динамики биохимического состава мышечной ткани в процессе онтогенеза у кеты представляет научный и практический интерес для оценки промысловых запасов и технологии ее переработки с целью получения продукции с заданными свойствами и комплексом органолептических показателей [7].

Известно, что тихоокеанские лососи являются источником липидов, которые в основном на

45–55% сосредоточены в мышцах. Перед нерестом до 15–20% суммарных липидов накапливается в зрелых гонадах лососевых рыб, а масса яичников (ястыков) достигает 20–25% общей биомассы рыб [8]. При оценке основных биоэнергетических параметров мышечной ткани тихоокеанских лососей Охотского моря по данным, собранным в 2003–2015 гг. установлено, что доля липидов в сыром веществе у неполовозрелых и половозрелых особей кеты составляла 4.2 и 4.4% соответственно. С переходом на IV стадию зрелости гонад у кеты наблюдается снижение калорийности, в основном за счет уменьшения количества липидов в тканях, которое связано с интенсивным созревaniem икры и молок [8]. Однако показано, что при снижении содержания липидов в мышцах кеты на этапе нерестовой миграции количество фосфолипидов осталось постоянным [9]. Благодаря высоким эмульгирующим свойствам фосфолипидов возникают предпосылки для использования сырья с нерестовыми изменениями при получении структурированных продуктов.

Установлено, что во время нерестовой миграции в мышечной ткани кеты *O. keta* происходит также изменение фракционного состава белков, что определяет консистенцию мышечной ткани и ее технологические свойства. Глубина процессов может быть охарактеризована по содержанию свободных аминокислот, нуклеотидов, нуклеозидов, олигопептидов в экстрактах мышечной ткани. Свободные аминокислоты попадают в ткань как при питании рыбы, так и в результате гидролитических процессов при апоптозе, а также некрозе и патологиях. В зависимости от глубины этих процессов меняется содержание свободных аминокислот в мышцах. Отмечено большое количество ансерина (**Анс**) в экстрактах мышечной ткани кеты при довольно низком уровне Тау, Ала, Гли, Глу и Лиз в экстракте [10, 11]. После гидролиза экстрактов было обнаружено значительное увеличение содержания метилгистидин (**Мгис**), β -Ала, которые образовались за счет распада Анс. Сумма нуклеотидов и нуклеозидов составляла 3.32–9.22 мкг/г, а преобладающим соединением был инозин-5-монофосфат (**ИМФ**).

Степень изменения миофибрилярного белка во время нерестовой миграции кеты *O. keta* оценивали путем исследования экстрактов мышечной ткани с помощью ионообменной колоночной хроматографии [12]. Установлено, что уровень Мгис заметно повышается во время нерестовой миграции, особенно у самок, как в миофибрилярных белках, так и в актине. Одновременно с нерестовыми изменениями происходило значительное увеличение таких свободных аминокислот, как Глу, Гли, Лей, Лиз и резкое снижение содержания Гис. Сделано заключение, что изменение количества Мгис в экстрактах мышечной ткани рыб можно

рассматривать как показатель степени изменения белка во время нерестовых миграции кеты и являться маркером при оценке качества сырья для дальнейшего использования.

Одним из перспективных подходов для более глубокого изучения тканей мышц кеты в разном биологическом состоянии является использование методов метаболомики, которая позволяет получить дополнительные сведения об изменениях комплекса биохимических показателей объекта [13]. Анализ метаболома является ключевым моментом для понимания динамических процессов, происходящих в организме. При нормальных условиях концентрация тех или иных соединений в ткани или жидкости определяется их ролью в метаболических процессах и, как правило, меняется в небольших пределах. Однако при патологии метаболомный профиль пораженной ткани может резко измениться. Изучение динамики состава и концентрации метаболитов дает возможность понять молекулярные основы возникновения изменений в организме и охарактеризовать глубину процесса нерестовых изменений для объективной характеристики пищевой ценности, органолептических показателей и технологической пригодности сырья [14, 15].

В связи с этим вопросы рационального и более эффективного использования кеты с нерестовыми изменениями с целью создания полноценной в пищевом отношении продукции требует современных подходов и является весьма актуальной проблемой.

Цель работы — оценить нутриентный и метаболический профиль мышечной ткани кеты с нерестовыми изменениями для определения рационального использования сырья при получении продукции с заданными органолептическими и функциональными свойствами.

МЕТОДИКА

Объекты исследований. В качестве объектов исследования использовали образцы половозрелых особей кеты *Oncorhynchus keta* (Walbaum, 1792) различного биологического состояния по 4 экземпляра в каждой выборке. Кета с нерестовыми изменениями выловлена в устье реки Ударница (сентябрь, Сахалинская обл., Россия), рыба без нерестовых изменений (далее кета “серебрянка”) выловлена в заливе Святой Ольги (октябрь, Приморский край, Россия). Образцы после вылова были сразу заморожены и доставлены для исследований в лабораторию.

Анализ химического состава. В образцах определяли содержание белковых веществ на автоанализаторе “Kjeltec” модель 1003 (“Tecator”, Швеция) по методу Кьельдаля с коэффициентом пересчета содержания азота на содержание белка 6.25.

при 104°C, содержание жира по методу Сокслета на автоматическом экстракторе SER148/6 (“VELP”, Италия). Аминокислотный состав белка определяли по методике, описанной в работе [16].

Определение фракционного и жирнокислотного состава липидов. Для экстракции липидов навеску образца 1–2 г помещали в пробирку на 50 мл, приливали 20 мл смеси хлороформ/метанол (2 : 1 по объему), плотно закрывали пробкой и взбалтывали в течение 1.5 ч на лабораторном шейкере. Затем приливали 6.6 мл дистиллированной воды, перемешивали и центрифугировали в течение 5 мин при 3000 g. Нижнюю фазу смеси (хлороформный раствор липофильной фракции) каждого образца отбирали в предварительно доведенные до постоянной массы и взвешенные на аналитических весах круглодонные колбы емкостью 50 мл. Хлороформ из колб отгоняли на вакуумном ротационном испарителе. Оставшуюся липофильную фракцию сушили до постоянной массы (10–20 мин) при температуре 100–105°C, охлаждали в эксикаторе и взвешивали колбу на аналитических весах до постоянной массы.

Фракционный состав липидов определяли методом тонкослойной хроматографии на пластине Silica gel 60 F254 (“Merck”, Германия) в системе растворителей гексан: диэтиловый эфир: уксусная кислота (80 : 30 : 1.5 по объему), как описано в работе [17].

Состав жирных кислот в образцах мышечной ткани определяли путем получения метиловых эфиров жирных кислот общих липидов с использованием метанола и ацетилхлорида с последующим разделением на газовом хроматографе “Agilent 7890A” (“Agilent Technologies”, США) с пламенно-ионизационным детектором на хроматографической колонке 100 м × 0.25 мм × 0.25 мкм “Agilent J&W GC Columns Select FAME” (США). Условия ГХ-анализа: объем пробы 1 мкл, режим с делением потока 30 : 1, газ-носитель азот, скорость потока 0.9 мл/мин, температура инжектора 260°C; температура детектора 270°C. Условия разделения: начальная температура 140°C (изотерма в течение 5 мин), затем увеличение температуры до 220°C со скоростью 4°C/мин, изотерма 25 мин. Сбор и обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения Agilent ChemStation Rev.B.04.03.

Подготовка образцов для спектроскопии ЯМР.

Для экстракции водорастворимых полярных метаболитов 25 г гомогенизированной мышечной ткани заливали 50 мл 7.5%-ного раствора ТХУ, перемешивали в гомогенизаторе и фильтровали через бумажный фильтр. Фильтрат нейтрализовали 9 М раствором КОН до значения pH 7.8, фильтровали через бумажный фильтр (№ 1) и центрифугировали при температуре 4°C и 12000 g в течение 10 мин. Аликвоту полученного раствора 500 мкл переносили пипеткой в стандартную ЯМР-ампулу

диаметром 5 мм, добавляли 50 мкл раствора TSP (3-(trimethylsilyl)-propionic-2,2,3,3-d₄ acid sodium salt) в D₂O с концентрацией 5.46 ммоль/л (в качестве внутреннего стандарта) и регистрировали на приборе “Bruker Avance III” (“Bruker Biospin GmbH”, Германия) с рабочей частотой по протонам 800 МГц при 303 К. Обработку спектров проводили с использованием программного обеспечения TopSpin 3.6.1 (“Bruker BioSpin”, США), идентификацию и количественное определение метаболитов — с применением Chenomx NMR Suite 9.02 (“Chenomx Inc”, Канада), а также сопоставляя международные базы данных: Human Metabolome Database (<http://www.hmdb.ca/>), Biological Magnetic Resonance Data Bank (<http://www.bmrb.wisc.edu/metabolomics/>).

Расчет показателей пищевой адекватности белковых компонентов рыбного сырья. При оценке биологической ценности белковых компонентов сырья использовали следующие показатели и критерии, предложенные Липатовым с соавт. [18].

Коэффициент утилитарности j -ой незаменимой аминокислоты — α_j :

$$\alpha_j = \frac{C_{\min}}{C_j}, \quad (1)$$

где $C_{\min}$ — минимальный скор незаменимых аминокислот оцениваемого белка по отношению к физиологической норме (эталону); C_j — скор j -ой незаменимой аминокислоты оцениваемого белка по отношению к физиологической норме (эталону).

Коэффициент рациональности аминокислотного состава — R_c , численно характеризующий сбалансированность незаменимых аминокислот по отношению к физиологически необходимой норме (эталону). В случае, когда $C_{\min} \leq 1$, коэффициент рациональности аминокислотного состава может быть рассчитан по следующей формуле:

$$R_c = \frac{\sum_{j=1}^n (\alpha_j A_j)}{\sum_{j=1}^n A_j}, \quad (2)$$

где A_j — массовая доля j -ой незаменимой аминокислоты в сырье, г/100 г белка.

Показатель “сопоставимой избыточности” содержания незаменимых аминокислот — σ , характеризующий суммарную массу незаменимых аминокислот, не используемых на анаболические нужды в таком количестве белка оцениваемого продукта, которое эквивалентно по их потенциально утилизируемому содержанию 100 г белка эталона:

$$\sigma = \frac{\sum_{j=1}^n (A_j - C_{\min} \cdot A_{ej})}{C_{\min}}, \quad (3)$$

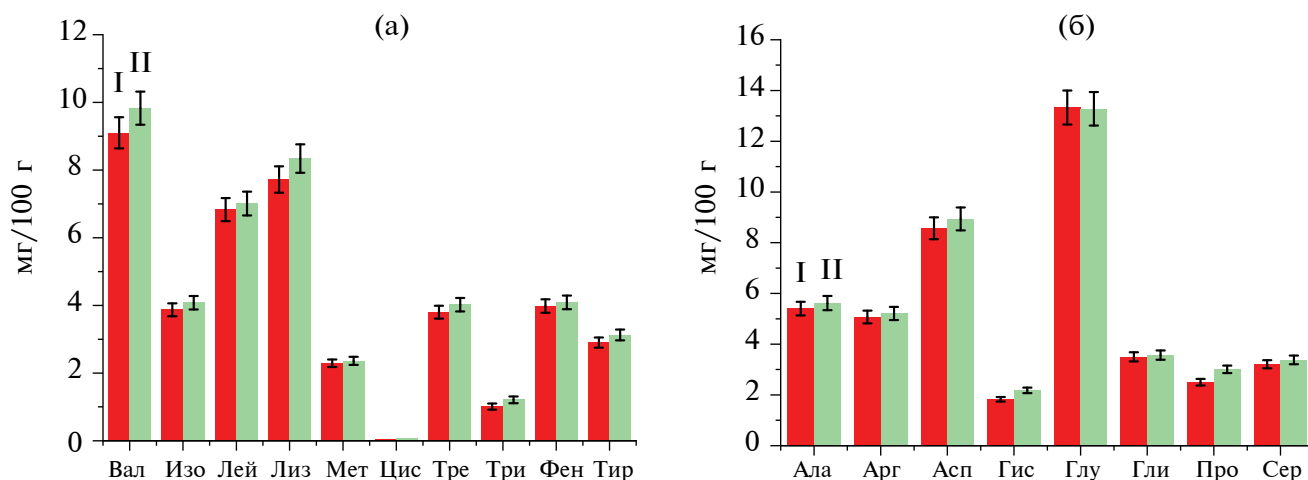


Рис. 1. Содержание незаменимых (а) и заменимых аминокислот (б) в белках образцов кеты № 5 (I) и № 10 (II) (среднее арифметическое $\pm$ среднее квадратичное отклонение).

где A_{ji} — массовая доля j -ой незаменимой аминокислоты, соответствующая физиологически необходимой норме (эталону), г/100 г белка.

В качестве идеального принят гипотетический белок, содержание незаменимых аминокислот в котором соответствует потребностям в аминокислотах человека в соответствии с рекомендуемым уровнем потребления пищевых и биологических активных веществ.

Статистическая обработка. Статистическую обработку полученных данных: расчет среднего арифметического и среднее квадратичное отклонения проводили с помощью программы Origin PRO 2021. Достоверно различающиеся средние значения при $p \leq 0.05$, согласно распределению

Стьюдента, отмечены звездочкой. Все результаты приведены как средние арифметические $\pm$ среднее квадратичное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки нутриентного профиля проведено определение химического состава мышечной ткани образцов рыб с нерестовыми изменениями и кеты “серебрянки”. Из полученных данных (табл. 1) видно, что кета с нерестовыми изменениями имела в составе мышечной ткани больше влаги и немного меньше белка, по сравнению с образцом кеты “серебрянки”. Содержание жира в образцах нерестовой кеты составляло $4.00 \pm 0.18\%$, а в кете “серебрянке” $6.80 \pm 0.27\%$.

Таблица 1. Химический состав мышечной ткани образцов кеты

№ образца	Пол рыбы	Массовая доля, %		
		вода	белок	липиды
Кета с нерестовыми изменениями				
1	Самец	79.79 ± 2.39	17.05 ± 0.34	4.36 ± 0.17
2	Самка	80.65 ± 2.42	17.91 ± 0.36	4.79 ± 0.19
3	Самка	79.50 ± 2.39	17.40 ± 0.35	3.54 ± 0.14
4	Самка	79.00 ± 2.37	18.64 ± 0.37	4.83 ± 0.19
5	Смешанная проба образцов 1—4 (в равных долях)	79.02 ± 2.37 (79.74 ± 4.78)*	17.55 ± 0.36 (17.75 ± 0.71)*	4.00 ± 0.18 (4.38 ± 0.35)*
Кета “серебрянка”				
6	Самец	72.98 ± 2.92	20.31 ± 0.47	6.71 ± 0.27
7	Самка	73.24 ± 2.93	20.98 ± 0.42	6.58 ± 0.26
8	Самка	71.84 ± 2.87	21.12 ± 0.43	7.10 ± 0.28
9	Самка	73.04 ± 2.92	20.34 ± 0.41	6.90 ± 0.28
10	Смешанная проба образцов 6—9 (в равных долях)	73.08 ± 2.91 (75.78 ± 5.82)*	20.74 ± 0.41 (20.69 ± 0.86)*	6.80 ± 0.27 (6.82 ± 0.55)*

*В скобках указаны значения, полученные путем статистической обработки результатов измерений в четырех образцах соответствующей группы.

Результаты определения аминокислотного состава белка (рис. 1) свидетельствовали о том, что оба образца кеты имели полный набор незаменимых аминокислот и были близки по составу.

Анализ сбалансированности аминокислотного состава белка по отношению к эталону для двух видов кеты показал, что кета с нерестовыми изменениями имела значения $\sigma = 10.65 \pm 0.53$, $R_c = 0.68 \pm 0.03$, а кета “серебрянка” — $\sigma = 12.54 \pm 0.63$, $R_c = 0.64 \pm 0.03$. Суть качественной оценки сравниваемых белков с помощью формализованных показателей заключалось в том, что чем выше значение R_c или меньше значение σ , (в идеале $R_c = 1$, $\sigma = 0$), тем лучше сбалансированы незаменимые аминокислоты и тем рациональнее они могут быть использованы организмом.

Следовательно, мышечная ткань кеты с нерестовыми изменениями, так же как и кеты “серебрянки” имела близкую сбалансированность незаменимых аминокислот и могла быть источником полноценного белка.

Значительный интерес при оценке нутриентного профиля мышечной ткани кеты различного биологического состояния представляли жирнокислотный и фракционный состав липидов, так как рыбное сырье с позиции здорового питания рассматривается в качестве источника полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК). Хорошо известно, что состав липидов рыбы меняется в зависимости от возраста, физиологического состояния, характера питания и района обитания. Установлено, что относительное содержание фосфолипидов в тканях рыбы на протяжении года остается постоянным, в то время как содержание нейтрального жира (триглицеридов) подвержено колебаниям, в частности, в период нагула рыбы — сильно увеличивается, а при истощении в период нереста — уменьшается. Как видно из данных фракционного состава липидов (табл. 2), при относительно небольшом изменении фосфолипидов в мышечной ткани кеты с нерестовыми изменениями

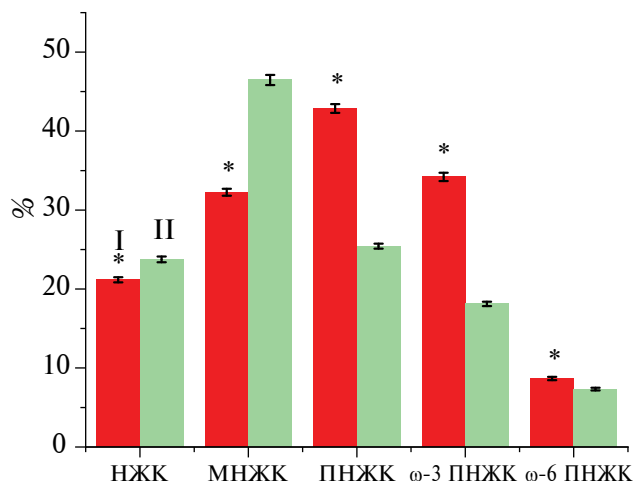


Рис. 2. Суммарное содержание насыщенных, мононенасыщенных, ПНЖК, ПНЖК омега-3, ПНЖК омега-6 в образцах кеты № 5 (I) и № 10 (II).

наблюдалось снижение содержания триглицеридов. Увеличение доли свободных жирных кислот в образцах нерестовой кеты свидетельствовало о более глубоких процессах, происходящих в нерестовой рыбе, что, по-видимому, объяснялось протекающим некротическим гидролизом в мышцах, по сравнению с кетой “серебрянкой” [19].

Анализ жирнокислотного состава липидов (рис. 2) показал, что происходило изменение степени насыщенности жиров, которое выражалось в увеличении относительного содержания ненасыщенных кислот при истощении рыбы в период интенсивного развития гонад и нереста, что согласовывалось с ранее проведенными исследованиями [20]. Из представленных данных видно, что мышечная ткань кеты с нерестовыми изменениями содержала значительное количество омега-3 ПНЖК, около 30% от суммы жирных кислот, что было выше, чем в кете “серебрянке”. Вследствие высокой ненасыщенности жира, который содержался в мясе кеты с нерестовыми изменениями,

Таблица 2. Фракционный состав липидов образцов кеты, %

Наименование фракции	Образец № 5	Образец № 10
Полярные липиды (фосфолипиды)	7.0 ± 0.1	8.3 ± 0.1
1,2-Диглицериды	3.4 ± 0.3	1.4 ± 0.7
1,3-Диглицериды + стерин (холестерин)	1.0 ± 0.6	2.4 ± 0.3
Свободные жирные кислоты	32.9 ± 3.1	17.3 ± 5.3
Триглицериды	53.2 ± 4.8	65.8 ± 3.4
Воска	—	2.5 ± 0.8
Эфиры стерина	0.3 ± 0.2	0.5 ± 0.6
Углеводороды	0.9 ± 0.4	—
Другое	1.2 ± 1.0	1.7 ± 1.7

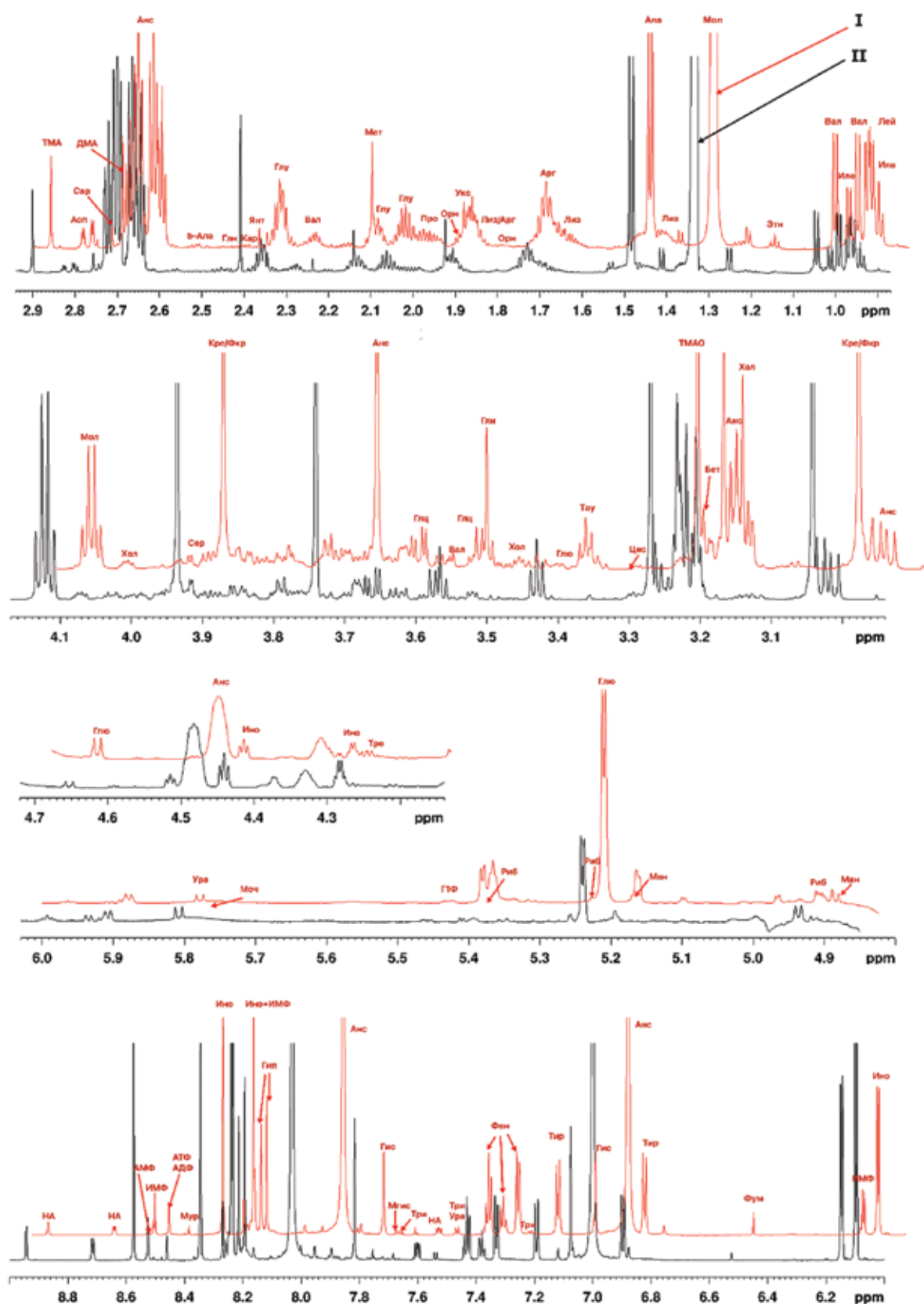


Рис. 3. Спектры ЯМР ^1H экстрактов мышечной ткани образцов кеты № 5 (I) и № 10 (II).

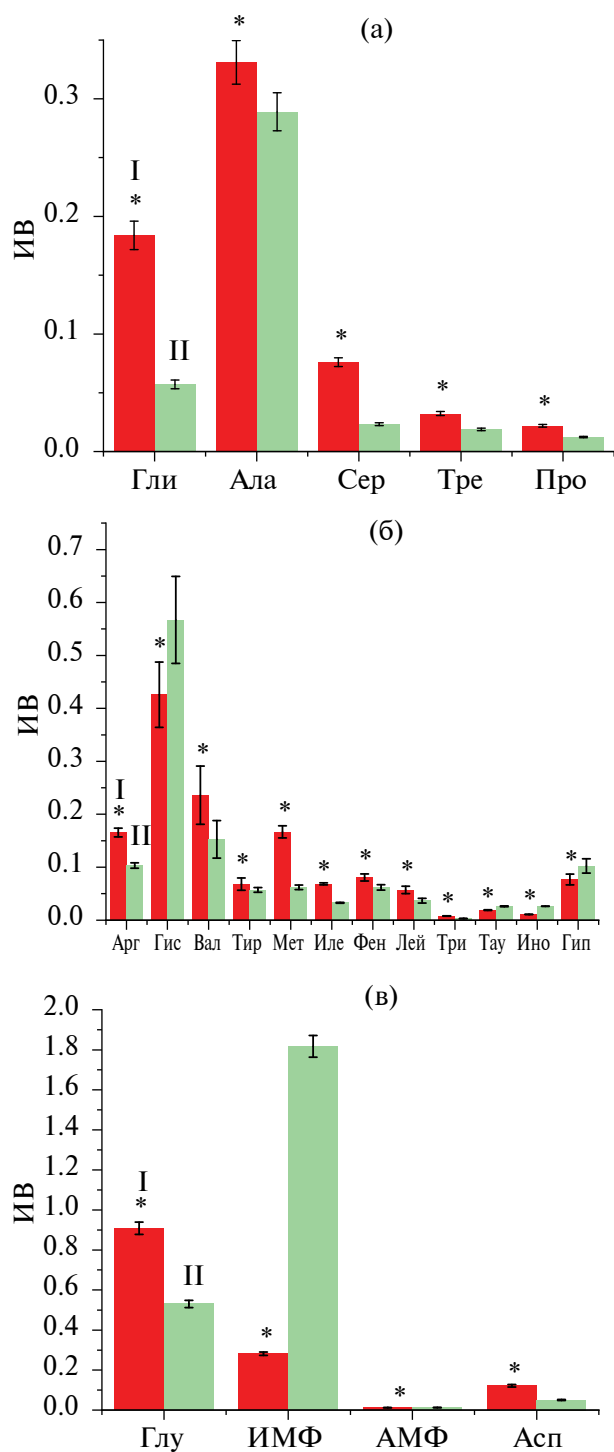


Рис. 4. Показатели индекса вкуса образцов кеты № 5 (I) и № 10 (II): сладкий (а), горький (б), умами (в).

он легко подвергался окислению и полимеризации, что должно учитываться при обеспечении условий хранения сыра.

Сравнение нутриентного профиля мышечной ткани кеты с нерестовыми изменениями и кеты “серебрянки” показало, что нерестовые изменения

практически не приводили к ухудшению пищевой и биологической ценности кеты. Однако по ряду технологических показателей, таких как бледный цвет мяса, ослабленная консистенция, кета с нерестовыми изменениями уступала кете “серебрянке” и требовала специальных технологических подходов при ее переработке.

Для получения дополнительной информации об изменениях мышечной ткани кеты различного биологического состояния был исследован метаболический профиль путем определения низкомолекулярных органических соединений — метаболитов, как промежуточных, так и конечных продуктов обмена, в мышечной ткани образцов методом спектроскопии ЯМР (рис. 3).

Идентифицировано и определено количественное содержание ряда аминокислот, нуклеотидов, нуклеозидов, азотистых соединений (табл. 3). Отмечено, что увеличение содержания таких метаболитов, как Асп, Глу, Иле, Лей, Тре, Сер, Лиз, характерно для кеты с нерестовыми изменениями. Кроме того, показателем нерестового состояния рыбы было повышенное количество глюкозы, которое составляло 42.39 ± 2.12 мг/100 г, по сравнению с содержанием в рыбе “серебрянке” — 13.45 ± 0.67 мг/100 г. Такое отличие в содержании Глю закономерно и объясняется ограниченным питанием рыбы во время нерестовой миграции.

При изучении степени деградации миофибрилярного белка во время нерестовой миграции кеты установлено, что уровень Мгис повышается во время нерестовой миграции. Согласно полученным данным (табл. 3) в кете “серебрянке” содержалось Мгис 0.21 ± 0.01 мг/100 г, в нерестовой рыбе — 1.23 ± 0.06 мг/100 г.

Результаты анализа метаболического профиля образцов мышечной ткани кеты были использованы для характеристики кеты с нерестовыми изменениями, по сравнению с кетой “серебрянкой” в качестве пищевого сырья. Как было показано выше, по таким органолептическим показателям, как цвет и консистенция, кета с нерестовыми изменениями уступала кете “серебрянке”. Однако представляло большой интерес объективно оценить динамику изменения вкуса в образцах нерестовой кеты и кеты “серебрянки” путем анализа выявленных метаболитов. Согласно литературным данным, накопление таких аминокислот, как Про, Тре, Сер, Ала и Гли придает сладкий вкус продукту, в то время как Тау, Три, Лей, Фен, Иле, Мет, Тир, Вал, Арг, Гис, а также соединения Ино и Гип увеличивали привкус горечи [21, 22]. Особое внимание заслуживал анализ метаболитов, которые обладали вкусом умами, который был предложен в начале XX века, как отличающийся от соленого, сладкого, кислого и горького под названием “вкусный вкус”. В результате было установлено, что вкус умами определяется в основном содержанием Глу или ее солей и ИМФ, но содержание АМФ

Таблица 3. Содержание идентифицированных метаболитов в образцах кеты

№ п/п	Метаболит	Структурный фрагмент	¹ H химические сдвиги (ppm)	Образец № 5, мг/100 г	Образец № 10, мг/100 г
Незаменимые аминокислоты					
1	Лей	δCH_3 ; $\delta'\text{CH}_3$	0.95 (t)	10.87±1.33*	7.00±0.85
2	Иле	δCH_3 ; $\beta'\text{CH}_3$	0.94 (t); 1.01 (d)	6.17±0.16*	2.95±0.08
3	Вал	γCH_3 ; $\gamma'\text{CH}_3$	0.99 (d); 1.04(d)	9.44±2.20*	6.10±1.42
4	Мет	SCH_3	2.14 (s)	5.00±0.35*	1.86±0.13
5	Лиз	γCH_2 ; δCH_2 ; βCH_2	1.47 (m); 1.73 (m) ; 1.91 (m)	18.67±1.69*	9.91±0.90
6	Тре	βCH	4.26 (m)	8.40±0.45*	4.90±0.26
7	Фен	2×CH, ring; CH; 2×CH, ring	7.33 (d) ; 7.37(t); 7.43 (t)	7.26±0.60*	5.58±0.46
8	Три	CH, ring; CH, ring; CH, ring;	7.28 (t); 7.54 (d); 7.73 (d)	0.70±0.03*	0.28±0.01
9	Цис	2×SCH ₂	3.34 (m)	2.48±0.12*	0.24±0.01
10	Тир	2×CH, ring; 2×CH, ring	6.89 (d); 7.19 (d)	6.59±0.50*	5.52±0.42
Заменимые аминокислоты					
11	Ала	βCH_3	1.48 (d)	19.86±1.11*	17.34±0.97
12	Гис	NCH; NCHN	7.06 (s); 7.79 (s)	8.52±1.24*	11.35±1.65
13	Гли	αCH_2	3.56 (s)	23.90±1.58*	7.42±0.49
14	Таурин	CH ₂ ; SCH ₂	3.25 (t); 3.42 (t)	35.46±1.06*	48.91±1.47
15	Глн	γCH_2	2.45 (m)	0.61±0.04*	3.05±0.19
16	Глу	βCH_2 ; γCH_2	2.08 (m); 2.35 (t)	27.26±0.93*	15.92±0.54
17	Асп	βCH_2	2.68 (m); 2.81 (dd)	12.17±0.61*	5.06±0.25
18	Арг	γCH_2 ; βCH_2	1.69 (m) ; 1.91 (m)	8.28±0.41*	5.16±0.26
19	Про	CH; NCH	2.01 (m) ; 3.38 (m)	6.58±0.33*	3.68±0.18
20	Сер	βCH_2	3.96 (m)	11.40±0.57*	3.49±0.17
21	Орн	γCH_2 ; βCH_2	1.79 (m) ; 1.93 (m)	2.93±0.15*	1.12±0.06
Дипептиды					
22	Ансерин	CH ₂ ; CH ₂ ; CH ₂ ; CH ₃ ; CH; CH, ring; NCHN	2.67 (m); 3.09 (dd); 3.21 (m); 3.71 (s) ; 4.47 (s уширенный); 6.95 (s); 7.92 (s)	287.10±4.31*	353.90±5.31
Органические кислоты					
23	Молочная кислота	βCH_3 ; αCH	1.33 (d); 4.12(q)	189.04±3.58*	348.16±6.60
24	Уксусная кислота	CH ₃	1.91 (s)	0.61±0.13*	1.31±0.28
25	Янтарная кислота	2×CH ₂	2.40 (s)	0.59±0.14*	5.59±1.32
26	Фумаровая кислота	2×CH	6.52 (s)	0.57±0.03*	0.16±0.01
Углеводы					
27	Г1Ф	C ₁ H	5.45 (q)	0.46±0.03*	0.26±0.02
28	Глюкоза (α + β)	C ₄ H; C ₅ H; C ₁ H; C ₁ H	3.42 (m) ; 3.65 (m); 4.65 (d); 5.23 (d)	42.39±2.12*	13.45±0.67
29	Рибоза	CH	4.93 (d) ; 5.25 (s); 5.38 (d)	3.50±0.18*	3.20±0.16
30	Манноза	CH; CH	4.90 (s) ; 5.19 (s)		0.96±0.18

Таблица 3. Окончание.

№ п/п	Метаболит	Структурный фрагмент	¹ H химические сдвиги (ppm)	Образец № 5, мг/100 г	Образец № 10, мг/100 г
Азотистые основания					
31	ТМА	3×CH ₃	2.90 (s)	0.83±0.03	0.86±0.03
32	ТМАО	3×CH ₃	3.26 (s)	33.70±0.36*	42.08±0.44
33	ДМА	2×CH ₃	2.73 (s)	1.02±0.05*	0.68±0.03
34	Бетаин	3×CH ₃	3.25 (s)	1.15±0.06	1.17±0.06
35	Холин	3×CH ₃ ; αCH ₂ ; βCH ₂	3.20 (s); 3.51 (t) ; 4.07 (m)	10.69±0.23	10.72±0.23
Нуклеотиды					
36	АТФ+АДФ	CH, ring CH, ring	8.27 (s) 8.52 (s)	2.45±0.12*	8.43±0.42
37	АМФ	CH, ring	8.60 (s)	0.15±0.01	0.16±0.01
38	ИМФ	C ₁ H, ribose; CH, ring; CH, ring	6.14 (d); 8.23 (s); 8.57 (s)	7.05±0.21*	45.43±1.36
39	Инозин	C ₄ H, ribose C ₃ H, ribose C ₁ H, ribose; CH, ring	4.28 (q); 4.44 (t); 6.09 (d); 8.34 (s)	27.98±0.45*	67.78±1.08
40	Гип	NCHN; NCHN	8.19 (s) ; 8.21 (s)	9.41±1.24*	12.53±0.65
Прочие					
41	Этанол	βCH ₃	1.18 (t)	0.63±0.03*	0.14±0.01
42	Саркозин	CH ₃ ; CH	2.75 (s) ; 3.61 (s)	0.20±0.01*	0.22±0.01
43	Кре/Фкр	NCH ₃ ; NCH ₂	3.04 (s); 3.93 (s)	159.83±2.70*	196.91±3.33
44	Карнитин	CH; CH	2.44 (m) ; 4.56 (m)	1.32±0.07*	1.09±0.05
45	Цитруллин	NH	6.39 (s) уширенный	1.45±0.07*	0.27±0.01
46	Глицерол	CH ₂ ; CH ₂	3.56 (m); 3.66 (dd)	33.69±1.68*	25.96±1.30
47	Урацил	CH, ring; CH, ring	5.80 (d) ; 7.53 (d)	0.42±0.02*	0.55±0.03
48	Мочевина	2×NH ₂	5.79 (s) уширенный	0.63±0.03*	1.14±0.06
49	β-Аланин	CH ₂	2.55 (t)	0.39±0.08*	0.71±0.15
50	Мгис	NCH; NCHN	7.01 (s); 7.67 (s) ;	1.23±0.08*	0.21±0.01
51	Никотин-амид	CH, ring; NCH, ring; NCH, ring	7.60 (m); 8.70 (d) ; 8.94 (s)	1.29±0.04*	3.02±0.09

Примечание. Жирным шрифтом отмечены значения химического сдвига соединения, принятого для количественного расчета.

Г1Ф — глюкоза-1-фосфат; **Гип** — гипоксантин; **ДМА** — диметиламин; **Кре** — креатин; **Мгис** — метилгистидин; **Мур** — муравьиная кислота; **ТМА** — триметиламин; **ТМАО** — триметиламинооксид; **Фкр** — креатинфосфат.

и Асп также учитываются в комплексной оценке вкуса умами [23].

Для оценки вклада основных метаболитов в насыщенность вкуса образцов мышечной ткани проведен расчет индекса вкуса (**ИВ**) каждого метаболита путем отношения содержания соединения к значению порога его вкуса [24]. Порог вкуса свободных аминокислот в соответствии с литературными данными широко используется для комплексной оценки различной пищевой продукции [25].

Изменения значений индекса вкуса (рис. 4) показали, что наибольший вклад в показатель вкуса

образцов мышечной ткани кеты вносят соединения, придающие вкус умами. При этом суммарный показатель индекса вкуса умами для мяса кеты “серебрянки” составлял 2.43 ± 0.06 , а для кеты с нерестовыми изменениями — 1.43 ± 0.03 , что свидетельствовало о сохранении достаточно высокого уровня вкусовых качеств образца, который обеспечивался содержанием глютаминовой кислоты, известной как основная вкусовая добавка.

Для комплексной оценки вкуса каждого образца был рассчитан индекс вкуса как сумма всех составляющих: для мышечной ткани кеты

“серебрянки” — 4.06 ± 0.11 , а для кеты с нерестовыми изменениями — 3.46 ± 0.09 . Из полученных данных следует, что по вкусовым ощущениям мышечная ткань кеты “серебрянки” имела несколько более насыщенный вкус по сравнению с кетой, имеющей нерестовые изменения, что объяснялось расходом основных соединений на построение гонад в нерестовый период. Однако суммарный индекс вкуса мяса кеты с нерестовыми изменениями остался достаточно высоким, превышающим аналогичный показатель, рассчитанный для семги, горбуши [24].

С позиции оценки пищевой ценности полученные результаты свидетельствовали о небольшом ухудшении потребительских качеств мышечной ткани кеты с нерестовыми изменениями, которые обусловлены уменьшением содержания липидов и накоплением свободных жирных кислот при относительно стабильной биологической ценности белка. Однако метаболический профиль образцов кеты показал значительное накопление ряда свободных аминокислот в мышечной ткани кеты с нерестовыми изменениями, по сравнению с кетой “серебрянкой”. Расчет индекса вкуса показал, что по вкусовым ощущениям мышечная ткань кеты “серебрянки” имела более насыщенный вкус, по сравнению с кетой, имеющей нерестовые изменения. Увеличение содержания Асп, Глу и Глю и накопление Мгис характерно для образцов кеты с нерестовыми изменениями.

На основании результатов анализа пищевой ценности и метаболического профиля мышечной ткани кеты с нерестовыми изменениями разработаны рекомендации по ее рациональному использованию, предусматривающие производство пищевого рыбного фарша для последующего производства широкого ассортимента специализированной пищевой продукции с заданными свойствами путем введения добавок, стабилизирующих консистенцию, цвет, а также при изготовлении функциональных пищевых добавок [26].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Яновская Н. В., Павлова А. О., Кононова Л. А., Бондаренко Г. А., Григорьева Е. Г., Селиванова Т. А. Статистические сведения по рыбной промышленности России. / Ред. К. В. Колончина. М.: ВНИРО, 2022. 86 с.
2. Макоедов А. Н., Макоедов А. А. // Известия ТИНРО. 2022. Т. 202. № 2. С. 255–267. <https://doi.org/10.26428/1606-9919-2022-202-255-267>
3. Животовский Л. А., Рубцова Г. А., Каев А. М., Шитова М. В., Смирнов Б. П., Точилина Т. Г., Афанасьев К. И. // Вопросы ихтиологии. 2022. Т. 62. № 3. С. 335–344. <https://doi.org/10.31857/S0042875222030249>
4. Кловач Н. В., Леман В. Н., Ельников А. Н., Вараксин И. А. // Рыбное хозяйство. 2018. № 6. С. 42–47.
5. Животовский Л. А., Федорова Л. К., Шитова М. В., Воронова Л. А., Борзов С. И., Погодин В. П., Рубцова Г. А., Афанасьев К. И. // Вопросы рыболовства. 2010. Т. 11. № 2 (42). С. 313–326.
6. Reid R. A., Durance T. D., Walker D. C., Reid P. E. // Food Research International. 1993. V. 26. P. 1–9. [https://doi.org/10.1016/0963-9969\(93\)90099-5](https://doi.org/10.1016/0963-9969(93)90099-5).
7. Холоша О. А., Таргунакова Е. С. // Рыбное хозяйство. 2013. № 5. С. 126–128.
8. Горбатенко К. М., Мельников И. В., Овсянников Е. Е., Овсянникова С. Л. // Известия ТИНРО. 2019. Т. 197. С. 152–165. <https://doi.org/10.26428/1606-9919-2019-197-152-165>
9. Hatano M., Mizogami M., Sugawara A., Ando S. // Nippon Suisan Gakkaishi. 1989. V. 55. P. 1623–1627.
10. Choon-Kyu P., Sang-Bo S., Eung-Ho L. // Kor. J. Fish. Soc. 1996. V. 29. P. 51–63.
11. Shirai T., Fuke S., Yamaguchi K., Konosu, S. // Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry. 1983. V. 74. № 4. P. 685–689. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(83\)90128-1](https://doi.org/10.1016/0305-0491(83)90128-1)
12. Ando S., Hatano M. // Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 1986. V. 52. № 7. P. 1237–1241.
13. Гончаров Н. В., Уколов А. И., Орлова Т. И., Мигаловская Е. Д., Войтенко Н. Г. // Успехи современной биологии. 2015. Т. 135. № 1. С. 3–17.
14. Kaneko G., Ushio H., Ji H. // Fish Sci. 2019. V. 85. P. 1–17. <https://doi.org/10.1007/s12562-018-1266-6>
15. Lulijwa R., Alfaro A. C., Young T. // Rev. Aquac. 2022. V. 14. P. 547–577. <https://doi.org/10.1111/raq.12612>
16. Скурихин И. М., Тутельян В. А. Руководство по методам анализа качества и безопасности пищевых продуктов. М.: Медицина, 1998. 342 с.
17. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. М.: Мир, 1975. 300 с.
18. Липатов Н. Н., Сажинев Г. Ю., Башкиров О. И. // Хранение и переработка сельхозсырья. 2001. № 8. С. 11–14.
19. Ando S., Hatano M., Zama K. // Comp. Biochem. Physiol. B. 1985. V. 80. P. 303–307. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(85\)90137-3](https://doi.org/10.1016/0305-0491(85)90137-3)
20. Ando S. // Memoirs of the Faculty of Fisheries Hokkaido University. 1986. V. 33 (1–2). P. 1–95.
21. Camacho C., Correia T., Teixeira B., Mendes R., Valente Luísa M. P. et al. // Food Chemistry. 2023. V. 404. Part A. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134505>.
22. Xue Q., Xue C., Luan D., Wen Y., Bi S., Wei Z., Mou H. // LWT — Food Sci. Technol. 2021. V. 146. P. 111466. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111466>
23. Ninomiya K. // Food Reviews International. 2002. V. 18. № 1. P. 23–38. <https://doi.org/10.1081/FRI-120003415>
24. Heu M. S., Choi Byeong-Dae, Kim K. H., Kang S. In., Kim Y. J., Kim Jin-Soo // Kor. J. Fish. Aquat. Sci. 2015. V. 48. № 1. P. 16–25. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2015.0016>

25. Kato H., Rhue M. R., Nishimura T. Role of Free Amino Acids and Peptides in Food Taste. Eds R. Teranishi, R. G. Buttery, F. Shahidi Flavor Chemistry American Chemical Society, 1989. 158 p.
26. Abramova L. S., Kozin A. V. Nutritional and Biological Value of Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) with Spawning Changes. // Proceedings of the International Conference "Scientific Research of the SCO Countries: Synergy and Integration", 2020. P. 196–203.

Assessment of the Nutrient and Metabolic Profile of the Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*)

L. S. Abramova^{a, *} and A. V. Kozin^a

^aRussian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography,
Moscow, 105187 Russia

*e-mail kozin82a@gmail.com

An analysis of the biological value of chum salmon showed that, in terms of the balance of the amino acid composition of the protein, chum salmon with spawning changes is not inferior to chum salmon without spawning changes (chum salmon "silver"). A higher content of polyunsaturated fatty acids in total lipids, including omega-3, was noted in chum salmon with spawning changes compared to chum salmon "silver". The metabolic profile of chum salmon samples obtained by NMR spectroscopy showed that the levels of Asp, Glu and Glc markedly increase during spawning migration, which is explained by the limited feeding of fish. The total taste index was calculated of chum salmon «silver», which was 4.06 ± 0.11 , and that chum salmon with spawning changes was 3.46 ± 0.09 , therefore, according to taste sensations chum salmon «silver» has a richer taste compared to chum salmon with spawning changes. The results of the analysis of the nutritional value and metabolic profile of chum salmon with spawning changes can be used in the manufacture of minced fish for the subsequent production of specialized food products by introducing functional additives that balance the consistency, color, and also give a functional orientation.

Keywords: chum salmon, spawning changes, biological value, metabolic profile, NMR spectroscopy, taste index.

УДК 615.324 + 639.389

ПИЩЕВАЯ И ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ ОВАРИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ СИБИРСКОГО ОСЕТРА (*Acipenser baerii*) И СТЕРЛЯДИ (*Acipenser ruthenus*)

© 2024 г. М. В. Михайлова¹, К. В. Золотарёв¹, *, А. Н. Михайлов¹, В. И. Наход¹, В. Г. Згода¹, Е. Н. Харенко²

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича (ИБМХ), Москва, 119121 Россия

²Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (ФГБНУ «ВНИРО»), Москва, 105187 Россия

**e-mail: fireaxe@mail.ru

Поступила в редакцию 11.07.2023 г.

После доработки 30.08.2023 г.

Принята к публикации 03.09.2023 г.

Для оценки пищевой и потенциальной лечебно-профилактической ценности был произведен химический анализ образцов овариальной жидкости (ОЖ) — вторичного продукта выращивания двух распространенных в аквакультуре России видов семейства осетровые. Установлено, что доминирующий органический компонент ОЖ обоих видов — растворимый или диспергируемый в воде легко усваиваемый пищеварительным трактом белок. В ходе протеомного анализа образцов выявлено, что основным компонентом белковой фракции ОЖ является высокопитательный белок вителлогенин. В ходе аминокислотного анализа установлено, что образцы ОЖ обоих видов удовлетворяют потребности взрослого человека во всех незаменимых аминокислотах. Также выявлено, что 85 г высушенной ОЖ осетра или 55 г высушенной ОЖ стерляди покрывает суточную потребность взрослого человека в витаминах С, В1, В2, В3 (РР) и В6, ряде макро- (Na, K, Ca, Mg) и микроэлементов (Fe, Cu, Mn, Zn, Cr). При этом содержание Cu достоверно выше в ОЖ осетра, а содержание Fe достоверно выше в ОЖ стерляди, что отчасти подтверждается относительным содержанием белков-переносчиков Cu и Fe соответственно — церулоплазмينا и трансферрина. Потенциальная лечебно-профилактическая ценность ОЖ состоит в значительном содержании различных белков, способных оказывать антиоксидантное действие в ОЖ обоих видов. Использование ОЖ в качестве биологически активной добавки к пище позволит увеличить прибыльность выращивания осетровых за счет получения дополнительного ценного продукта, а также расширит ассортимент натуральных БАД для специального и спортивного питания на рынке.

Ключевые слова: овариальная жидкость, осетровые, вторичный продукт, пищевая ценность, витамины, аминокислоты, макроэлементы, микроэлементы, потенциальная лечебно-профилактическая ценность, антиоксиданты.

DOI: 10.31857/S0555109924010111, **EDN:** HBSIUS

Овариальная жидкость (ОЖ) — тканевая жидкость яичников самок яйцекладущих животных. У рыб ОЖ, называемая также икорным золом, выполняет функции транспорта веществ для формирования яйцеклеток (икринок), запасаящих питательные вещества для будущих эмбрионов [1], а также создания условий для успешного оплодотворения икринок при нересте [2]. Соответственно, чем более питательно ценна икра рыбы, тем более логично ожидать высокую пищевую ценность ОЖ, через которую постоянно происходит диффузия питательных веществ между кровью и икринками.

В настоящее время овариальная жидкость является вторичным продуктом аквакультуры ряда видов рыб, прежде всего осетровых, однако область применения его крайне ограничена

[3]. Некоторые производители косметики (например, MIRRA) включают ОЖ осетровых рыб в свои наружные средства на водной основе — лосьоны, сыворотки (<https://mirra-lux-shop.ru/mirra-lines/caviar/manufacturer/mirra?ysclid=lwso np9zc478663478>). Однако анализ состава данных средств показывает, что ОЖ является далеко не ключевой составляющей; в составе имеются такие распространенные косметические компоненты, как масла кунжута и амаранта, сок алоэ и др., а ОЖ, по-видимому, добавляется с формальной целью включения продуктов в линейку продукции, в которой уже есть средства на основе бесспорно эффективной липидной фракции икры осетровых [4].

По результатам собственной оценки авторов при отборе образцов, половозрелая самка сибирского осетра (*Acipenser baerii*) содержит не менее 0.7 л, а стерляди (*Acipenser ruthenus*) — ок. 0.5 л ОЖ. При получении икры у половозрелой самки почти весь этот объем выходит вместе с икрой и, как правило, выбрасывается [5]. Осетровые являются одним из ключевых сегментов аквакультуры России: в 2021 г. объем выращивания составил 6.2 тыс. т (по данным Росрыболовства: <https://fish.gov.ru/news/2022/02/09/obem-proizvodstva-akvakultury-v-rossii-vyros-na-85-do-357-tys-tonn/>). Таким образом, потенциальный общий объем ОЖ, который можно получать из аквакультуры осетровых России, составляет с учетом веса половозрелых рыб 0.24 млн л/год в пересчете на осетра или 2.1 млн л/год в пересчете на стерлядь (согласно маркетинговому исследованию Агентства предпринимательского роста: <https://investvolga.volgograd.ru/upload/docs/МИ%20Осетровая%20рыба%20.pdf>). Производство премиальной косметической продукции, где ОЖ не является ключевым компонентом, не способно переработать значимую долю таких объемов.

Мировой рынок биологически активных добавок к пище (БАД) в 2022 г. составил 220.3 млрд долларов. При этом, согласно маркетинговым исследованиям, 76% потребителей предпочитают употреблять БАД из полностью натуральных компонентов [6]. Логично ожидать высокую пищевую ценность ОЖ осетровых, что делает перспективным исследование пищевой и, возможно, лечебно-профилактической ценности ОЖ распространенных в аквакультуре России видов семейства осетровые — сибирского осетра и стерляди. Если имеет место существенная пищевая и/или потенциальная лечебно-профилактическая ценность ОЖ, можно будет существенно увеличить прибыльность выращивания осетровых за счет получения дополнительного ценного продукта, а также расширить ассортимент натуральных БАД на рынке.

МЕТОДИКА

Образцы овариальной жидкости. На производственной базе ООО «ИБМХ-ЭкоБиоТех» (Тверская обл., Россия), пластиковыми пипетками было отобрано по 5 образцов (объемом по 300 мл) ОЖ половозрелых самок сибирского осетра и стерляди. Образцы помещали в короб из пенопласта с сухим льдом и в нем транспортировали в лабораторию. В лаборатории образцы центрифугировали при ускорении 2500 g в течение 15 мин для отделения от твердых примесей, затем надосадочную жидкость отбирали и хранили при -80°C до дальнейшей обработки.

Для исследования химического состава образцы ОЖ подвергали лиофильной (сублимационной)

сушке в лабораторном сублиматоре СБ 3 (“СХ Техника”, Россия) в ранее подобранном режиме [7]: сушка при -35°C в течение 24 ч и досушка при 30°C в течение 5 ч.

Исследование базового химического состава. Содержание воды в образцах ОЖ определяли как долю потерянной массы образца при сушке плюс остаточную влажность высушенного образца; последнюю определяли методом волюмометрического титрования Карла Фишера на автоматическом титраторе DL31 (“Mettler Toledo”, Швейцария) и пересчитывали по исходному весу образца.

Содержание общего белка в высушенных образцах ОЖ определяли по содержанию общего азота (умножали на коэффициент 6.25); последний определяли методом Кьельдаля на полуавтоматическом анализаторе Kjeltac System 1002 (“Tecator”, Швеция).

Содержание общего жира в высушенных образцах ОЖ определяли на автоматическом экстракторе SER148 (“VELP Scientifica”, Италия). Из навески образца (1 г) жир экстрагировали в 150 мл смеси ацетона и хлороформа (в соотношении 1 : 1 об./об.) в течение 90 мин, затем выпаривали растворители под вакуумом и взвешивали экстракт.

Содержание минеральных веществ (зола) определяли путем сжигания высушенной навески в муфельной печи при 600°C до постоянной массы.

Исследование аминокислотного состава. Аминокислотный состав белка высушенных образцов ОЖ определяли методом ВЭЖХ по адаптированной ранее опубликованной методике [8]. Для этого проводили гидролиз образцов (50 мг в 500 мкл 6 М HCl) в ампулах под вакуумом в течение 24 ч при 110°C , затем ампулы вскрывали, содержимое высушивали под вакуумом и растворяли в 50 мкл 0.1 М HCl. Далее проводили дериватизацию аминокислот: к раствору добавляли 1 мл метанольного раствора *o*-фталевого альдегида (концентрация 50 г/л), добавляли 9 мл 100 мМ боратного буфера (pH 10.2) и оставляли на 5 мин при комнатной температуре. Хроматографическое разделение и анализ аминокислот выполняли на хроматографе серии 1200 (“Agilent”, США) с УФ-детектором на диодной матрице, используя колонку Zorbax Eclipse AAA (“Agilent”, США). Длина колонки — 150 мм, диаметр — 4.6 мм, размер частиц — 5 мкм. В качестве подвижной фазы использовали смешанные в различных соотношениях фосфатный буфер (40 мМ, pH 7.8) (раствор А) и 80%-ный водный раствор ацетонитрила (раствор Б). Анализируемые растворы элюировали со скоростью 1 мл/мин с градиентом раствора Б в 5 этапов: 16 мин от 2 до 12% раствора Б (объемная доля в смеси), затем 18 мин до 36% раствора Б, 2 мин до 63% раствора Б; далее промывание 3 мин 63% раствором Б и уравнивание 2 мин 2% раствором Б. Концентрации аминокислот измеряли ко калибровке площадей

соответствующих пиков, используя стандарты производства Agilent, и пересчитывали их на содержание белка в образцах ОЖ по сухому весу.

Определение содержания витаминов. Содержание витаминов С, В₁, В₂, В₃ (РР) и В₆ в высушенных образцах ОЖ определяли одновременно методом ВЭЖХ [9] на хроматографе серии 1200 ("Agilent", США) с УФ-детектором на диодной матрице. В качестве неподвижной фазы использовали гидрофильную колонку с электрофильно-нуклеофильным наконечником Pro C18 ("YMC-Pack", Япония). Длина колонки — 250 мм, диаметр — 4,6 мм, размер частиц — 5 мкм. Сначала 0.5 г образца смешивали с 10 мл очищенной (дистиллированной и дополнительно очищенной от органики адсорбционным методом) воды и 1 мл 2 М NaOH, интенсивно встряхивали, после чего добавляли 12.5 мл фосфатного буфера (1 М, pH 5.5), доводили до объема 25 мл и фильтровали через нитроцеллюлозный мембранный фильтр Millipore ("Merck", Германия) с размером пор 0.22 мкм.

Аналогичным образом готовили растворы стандартных образцов витаминов для калибровки. В качестве подвижной фазы использовали смешанные в различных соотношениях 0.025%-ный раствор трифторуксусной кислоты (раствор А) и ацетонитрил (раствор Б). Анализируемые растворы элюировали со скоростью 0.8 л/мин с градиентом раствора Б в 3 этапа: 5 мин без раствора Б (изократический режим), 6 мин до 25% раствора Б, затем 8 мин до 40% раствора Б. Последовательно определяли оптическую плотность при 275 нм для витаминов В₁ (время удержания 3.8 мин), С (6.4 мин), В₃ (РР) (7.5 мин), В₆ (11.0 мин), В₂ (16.0 мин). Концентрацию витаминов измеряли по калибровке площадей соответствующих пиков, используя стандарты производства Agilent, и пересчитывали их на содержание в образцах ОЖ по сухому весу.

Определение содержания макро- и микроэлементов. Содержание макроэлементов (Na, K, Ca, Mg) и микроэлементов (Fe, Cu, Mn, Zn, Cr) в высушенных образцах ОЖ определяли методом масс-спектрометрии на индуктивно-связанной плазме (ИСП-МС) по адаптированной ранее опубликованной методике [10]. Сначала 0.25 г образца заливали концентрированной HNO₃ и инкубировали при 78°C в течение 8 ч, после чего инкубировали при комнатной температуре в течение 8 ч. Аликваты отбирали по 0.5 мл, разбавляли в 12 раз и измеряли концентрации ионов металлов на масс-спектрометре 7500ce ("Agilent", США) по калибровкам, полученным по стандартным образцам соответствующих металлов. Значения пересчитывали на содержание в образцах ОЖ по сухому весу.

Протеомный анализ. Из образцов нативной ОЖ (20 мкл; до сушки) экстрагировали белки смесью хлороформа и метанола (2: 1 об./об.), затем проводили ферментативный гидролиз белков трипсином

с последующей центрифужной фильтрацией, как описано в работе [11].

Протеомный анализ образцов осуществляли с помощью оборудования центра коллективного пользования «Протеом человека» (ИБМХ, Москва, Россия), а именно хроматографической ВЭЖХ-системы Ultimate 3000 RSLCnano ("Thermo Scientific", США), соединенной с масс-спектрометром Q-exactive HFX ("Thermo Scientific", США). Пептидную смесь (1 мкг) загружали на обогащающую колонку Thermo Scientific Acclaim μ-Precolumn (длина 3 мм, диаметр 0,5 мм, размер частиц 5 мкм) при потоке 10 мкл/мин в течение 4 мин в изографическом режиме с использованием подвижной фазы состава 2% — ацетонитрил, 98% — 0.1%-ный (исходно) раствор муравьиной кислоты в деионизованной воде. Далее пептиды разделяли на ВЭЖХ-колонке Acclaim Pepmap C18 (длина 150 мм, диаметр 75 мкм, размер частиц 2 мкм; "Thermo Scientific", США). В качестве подвижной фазы использовали смешанные в различных соотношениях 0.1%-ный раствор муравьиной кислоты в деионизованной воде (раствор А) и смесь, состоящую из 80% ацетонитрила и 20% 0.1%-ного раствора муравьиной кислоты в деионизованной воде (раствор Б). Разделение производили при скорости потока 0.3 мкл/мин в 6 этапов: 1) 4 мин промывка смесью, содержащей 98% раствора А и 2% раствора Б; 2) 90 мин разделение в градиенте раствора Б до 35%; 3) 10 мин разделение в градиенте раствора Б до 99%; 4) 10 мин промывка смесью, содержащей 1% раствора А и 99% раствора Б; 5) 6 мин разделение в отрицательном градиенте раствора Б до 2%; 6) 10 мин уравнивание смесью, содержащей 98% раствора А и 2% раствора Б.

Масс-спектрометрический анализ проводили на масс-спектрометре Q-exactive HFX в режиме положительной ионизации с использованием источника NESI ("Thermo Scientific", США). Для масс-спектрометрического анализа были установлены следующие параметры настроек: напряжение на эмиттере 2.1 кВ, температура капилляра 240°C. Панорамное сканирование проводили в диапазоне соотношений масса/заряд (m/z) от 300 до 1500 при разрешении 120000. При tandemном сканировании разрешение устанавливали 15000 в диапазоне m/z от 100 до верхней границы, которая определяется автоматически исходя из массы прекурсора, но не более 2000. Изоляцию прекурсорных ионов проводили в окне ± 1 Да. Максимальное число разрешенных для изоляции ионов в режиме MS2 было установлено не более 40, при этом граница отсечения для выбора прекурсора для tandemного анализа была установлена как 50000 единиц, а нормализованная энергия соударения (NCE) равнялась 29. Для tandemного сканирования учитывали только ионы от $z = 2+$ до $z = 6+$ по зарядному состоянию. Максимальное время накопления для

прекурсорных ионов составило 50 мс, для фрагментных ионов 110 мс. Величину AGC для прекурсоров и фрагментных ионов устанавливали 1×10^6 и 2×10^5 соответственно. Все измеренные прекурсоры динамически исключали из tandemного MS/MS-анализа на 90 с.

Обработку масс-спектров и идентификацию пептидов проводили с помощью программы SearchGUI v.3.3.1 при достоверности соответствия структуры, соответствующей уровню значимости $p < 0.05$. Идентификацию белков по характеристическим пептидам проводили с использованием базы данных UniProt Release 2020_05 по рыбам семейства осетровые (*Sturgeon*, *Acipenser*). Для поиска были заданы следующие поисковые параметры: расщепляющий фермент — трипсин, точность определения масс моноизотопных пептидов ± 5 ppm, точность определения масс в спектрах MS/MS ± 25 ppm и возможность пропуска одного сайта расщепления.

Статистическая обработка результатов. Данные количественного анализа были представлены как среднее арифметическое $\pm$ среднееквадратичное отклонение в исследуемых группах образцов — сибирский осетр и стерлядь. При сравнении интервалов значений достоверность различий между группами выявлялась по U-критерию Манна–Уитни при уровне значимости $p < 0.05$. Статистическую обработку выполняли с помощью программы IBM SPSS Statistics 26.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Базовый химический состав. Результаты исследования базового химического состава представлены в табл. 1. Статистически значимых различий по содержанию показателей у осетра и стерляди не выявлено. Вода является доминирующим компонентом ОЖ, что объяснимо для любых физиологических, в частности, тканевых жидкостей.

В сухом веществе существенно содержание золы, прежде всего, неорганических солей. Их катионы и анионы попадают туда в результате диффузии из окружающей рыбу воды (как напрямую, так и через кровь), поэтому ОЖ морских видов рыб имеет более высокую осмолярность, чем у пресноводных. Кроме того, существует корреляция между осмолярностью ОЖ и вероятностью оплодотворения икры при нересте, по-видимому, обусловленная

создаваемым ионами осмотическим давлением, усиливающим привлечение сперматозоидов [2]. В свете возможного лечебно-профилактического применения ОЖ необходимо отметить, что противопоказанием будет являться гипертоническая болезнь или склонность к ней, а гипотоническое состояние — наоборот, показанием к применению. Высушенная ОЖ может также применяться в качестве приправы к пище вместо соли.

Основным органическим компонентом сухого вещества ОЖ является белок. Поскольку этот белок растворимый или диспергируемый в воде, он легко будет усваиваться пищеварительным трактом. Что касается жира, то его содержание также существенно. При необходимости высушенную ОЖ можно обезжиривать, например, путем экстракции сверхкритическим CO_2 . Этот технологический подход широко применяется в фармацевтике и производстве БАД, поскольку позволяет экстрагировать жир из биологических субстанций без использования токсичных органических растворителей и относительно недорого при малотоннажном производстве [12].

Аминокислотный состав. Для более полной оценки пищевой ценности ОЖ с точки зрения белковой составляющей было проведено исследование аминокислотного состава по незаменимым аминокислотам, результаты которого представлены в табл. 2. Статистически достоверные различия по содержанию аминокислот в белке ОЖ выявлены для треонина, валина и изолейцина (больше у осетра), а также для лейцина и тирозина (больше у стерляди), при этом суммарное содержание незаменимых аминокислот достоверно не отличалось.

Результаты аминокислотного анализа сопоставлены с минимальными значениями содержания незаменимых аминокислот в употребляемом в пищу белке, необходимыми для полноценной жизнедеятельности взрослого человека, согласно опубликованной научной оценке [13]. В результате выявлено, что белок ОЖ обоих исследуемых видов удовлетворяет потребности взрослого человека во всех незаменимых аминокислотах, а по некоторым из них (метионин + цистеин, треонин, гистидин) кратно превышает минимальное содержание. Таким образом, ОЖ осетра и стерляди может быть рекомендована в качестве белковой добавки при дефиците незаменимых аминокислот.

Таблица 1. Базовый химический состав образцов ОЖ сибирского осетра и стерляди

Вид рыбы	Содержание			
	вода, % в нативной ОЖ	белок, % *	жир, % *	зола, % *
Сибирский осетр ($n = 5$)	98.8 ± 0.4	28.6 ± 3.0	5.56 ± 0.60	50.0 ± 15.1
Стерлядь ($n = 5$)	99.1 ± 0.3	36.7 ± 7.6	8.64 ± 3.06	52.9 ± 16.9

* Содержание рассчитано в % от сухой массы.

Витаминно-минеральный состав. Результаты определения содержания витаминов, макро- и микроэлементов представлены в табл. 3. Статистически достоверные различия по содержанию биологически активных веществ и элементов выявлены для К, Mg, Cu (больше у осетра), а также Na, Fe, витаминов С, В₂, В₃ (РР) (больше у стерляди).

Результаты анализа витаминно-минерального состава сопоставлены с суточными физиологическими потребностями взрослого человека согласно утвержденным Роспотребнадзором методическим рекомендациям МР 2.3.1.2432–08. В результате установлено, что 85 г высушенной ОЖ осетра или 55 г высушенной ОЖ стерляди покрывает суточную потребность взрослого человека в исследуемых витаминах, макро- и микроэлементах. Таким образом, ОЖ осетра и стерляди может быть рекомендована в качестве витаминно-минеральной добавки при дефиците соответствующих витаминов, микро- и макроэлементов.

Протеомные профили. С целью уточнения полученных представлений о пищевой ценности белка исследуемых образцов ОЖ был проведен их протеомный анализ, то есть выявление всех известных белков и относительного содержания их в образцах. Протеомные профили ОЖ осетра и стерляди, составленные из всех выявленных белков, включают 87 белков, из которых 65 достоверно обнаруживались (интенсивность сигнала с учетом среднеквадратичного отклонения отлична от нуля при уровне значимости $p < 0.05$) у обоих видов (см. дополнительный материал к статье). Такое распределение белков достаточно типично для близкородственных видов рыб [14].

В результате протеомного анализа был выявлен ряд белков, имеющих физиологическое значение для рыб. Так, в ОЖ обоих видов обнаружены белки системы комплемента С1, С3, С4, С6, С7, С8, С9, а также С-реактивный белок и коллектин, запускающие данную систему, кластерин и пропердин, участвующие в ее работе, витронектин, участвующий в ее регуляции. Система комплемента является частью как врожденного, так и приобретенного иммунитета организма и присутствует не только в крови, но и в других биологических жидкостях [15]. Белки системы комплемента также обнаруживались ранее в ходе протеомного анализа ОЖ чавычи [16], радужной форели [17] и судака [18]. Кроме того, в ОЖ обоих видов обнаружены такие белки, значимые для иммунитета, как интеллектин, связывающий бактерии в различных тканях у рыб [19], белок 14–3–3, участвующий в дифференцировке антител [20], а также субъединицы различных антител. Среди физиологически значимых белков у обоих видов обнаружен также тетранектин, являющийся регулятором роста тканей на разных стадиях жизненного цикла [21], $\alpha 1$ -антитрипсин, являющийся ингибитором протеаз и ослабляющий последствия воспалительных процессов в тканях [22], а также так называемый “белок-антифриз” LS-12, ингибирующий рост кристаллов льда при температурах ниже 0°C [23].

В образцах ОЖ обоих видов обнаружен ряд белков, отражающих функцию ОЖ как транспортера питательных веществ, необходимых для развития будущих эмбрионов рыб. Так, фетугин В [24], апо-липопротеин В и аполипопротеин Е [25] транспортируют жирные кислоты и липиды. Ряд белков,

Таблица 2. Аминокислотный состав белка ОЖ сибирского осетра и стерляди (по незаменимым аминокислотам), сопоставленный с потребностями взрослого человека [16]

Аминокислота	Содержание, г/100 г белка		Потребность взрослого человека по [13], г/100 г белка
	сибирский осетр ($n = 5$)	стерлядь ($n = 5$)	
Метионин + цистеин	5.12 ± 0.34	4.81 ± 0.29	2.2
Лизин	8.38 ± 0.40	7.90 ± 0.38	4.5
Триптофан	0.79 ± 0.12	0.90 ± 0.09	0.6
Треонин	6.08 ± 0.37*	5.42 ± 0.26	2.3
Валин	6.06 ± 0.21*	5.49 ± 0.30	3.9
Изолейцин	5.09 ± 0.31*	4.08 ± 0.29	3.0
Лейцин	7.52 ± 0.46	9.12 ± 0.33*	5.9
Тирозин	3.89 ± 0.24	5.17 ± 0.18*	3.8 (суммарно)
Фенилаланин	1.76 ± 0.16	1.91 ± 0.13	
Гистидин	4.74 ± 0.36	4.10 ± 0.39	1.5
Σ незаменимых аминокислот	49.43 ± 0.88	48.90 ± 1.02	27.7

* Достоверно более высокое значение по сравнению с соответствующим для данной аминокислоты, согласно U-критерию Манна–Уитни при $p < 0.05$.

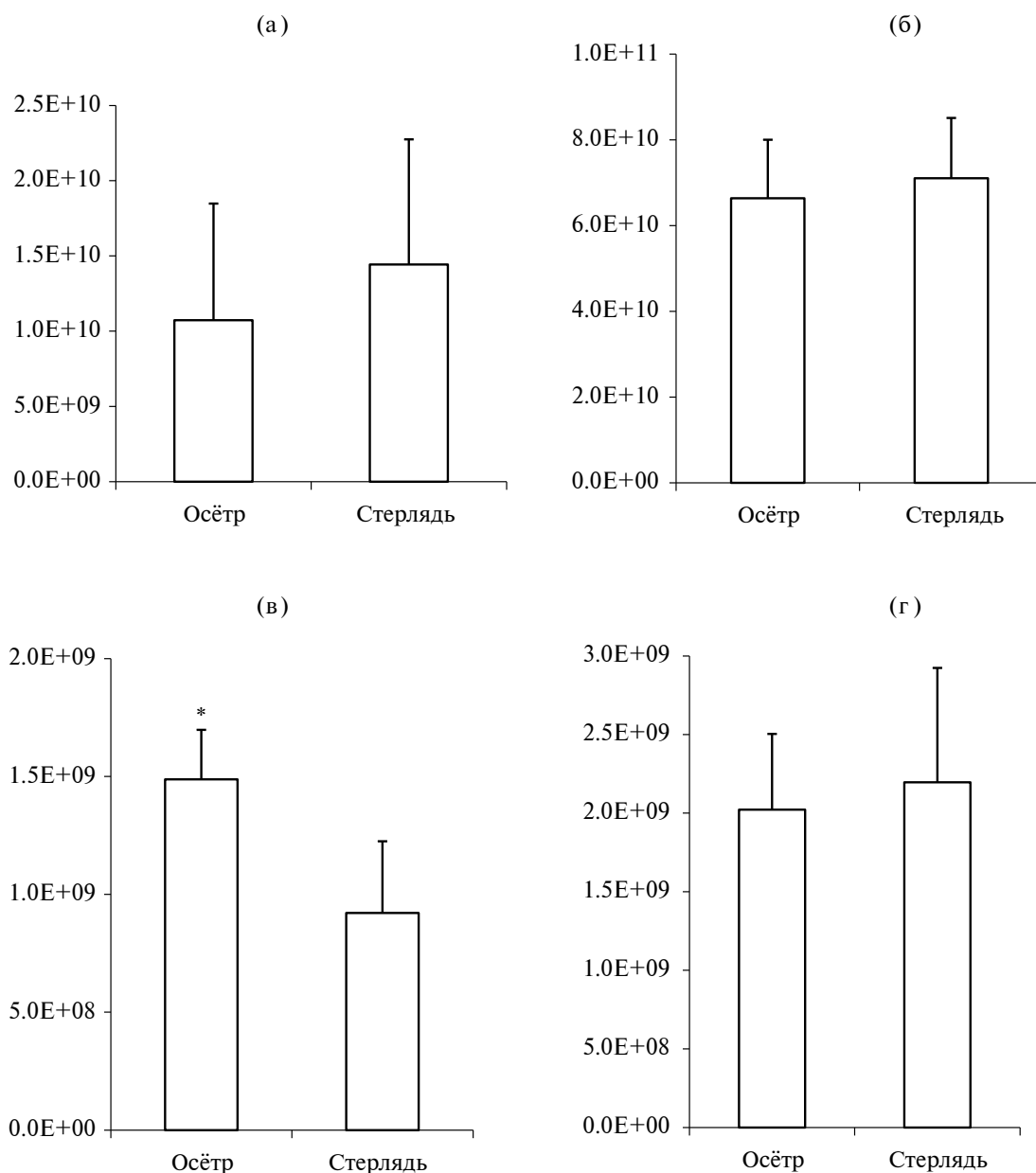


Рис. 1. Относительное содержание (выражено в виде интенсивности сигнала масс-спектрометрического детектора) белков или их групп, характеризующих ОЖ исследуемых видов с точки зрения их пищевой и потенциальной лечебно-профилактической ценности: а — вителлогенин (питательный белок); б — трансферрин (переносчик Fe) в — церулоплазмин (переносчик Cu); г — антиоксидантные белки (суммарно).

* Достоверно более высокое значение по сравнению с соответствующим для данного белка/группы, согласно U-критерию Манна–Уитни при $p < 0.05$ ($n = 5$).

выполняющих транспортные функции, характеризуют ОЖ исследуемых видов с точки зрения их пищевой и потенциальной лечебно-профилактической ценности (рис. 1). Так, вителлогенин (рис. 1а) является транспортным белком для переноса питательного белкового и липидного материала у яйцекладущих животных; из него затем формируется высокопитательный и легко усваиваемый желток яйцеклетки [26]. Согласно результатам проведенного протеомного анализа, вителлогенин является

доминирующим белком в ОЖ обоих видов. Доминирующая позиция вителлогенина в протеомном профиле ОЖ обнаруживалась также ранее у чавычи [16], радужной форели [17] и судака [18]. Таким образом, можно утверждать, что основным компонентом белковой фракции ОЖ является легко усваиваемый высокопитательный белок, что дает дополнительное основание считать ОЖ осетровых источником питательного белка.

Трансферрин (рис. 1б) и церулоплазмин (рис. 1в) являются белками-переносчиками Fe [27] и Cu [28] соответственно в плазме крови и других биологических жидкостях. Значительное содержание этих белков в ОЖ обоих исследуемых видов, обнаруженное в ходе протеомного анализа, говорит о выполнении ОЖ транспортной функции по обеспечению будущих эмбрионов потомства, в том числе этими необходимыми для развития элементами, а также свидетельствует о том, что значительное содержание Fe и Cu в ОЖ (табл. 3) является, прежде всего, результатом направленного транспорта этих элементов, а не только пассивной диффузии ионов из воды. Соответственно, пищевая ценность ОЖ с точки зрения содержания Fe и Cu не должна критически зависеть от концентрации их ионов в среде обитания рыбы, что свидетельствует об ОЖ осетровых как о стабильном источнике Fe и Cu, если рыбы получают в течение своего жизненного цикла полноценный корм. Трансферрин обнаруживался также ранее в ходе протеомного анализа ОЖ чавычи [16], радужной форели [17] и судака [18]. Выявленные в ходе протеомного анализа статистически достоверные различия по относительному содержанию церулоплазмينا в ОЖ сибирского осетра и стерляди (рис. 1в) сходны с различиями по содержанию непосредственно Cu в образцах ОЖ (табл. 3), что подтверждает неслучайный характер данных различий.

В ходе протеомного анализа ОЖ обоих исследуемых видов выявлен ряд белков с антиоксидантными свойствами: глутатионпероксидаза [29], пероксиредоксин [30], селенопротеин Р [31], глутаредоксин и тиоредоксин [32]. Значительное суммарное содержание этих ферментов в ОЖ обоих исследуемых видов (рис. 1г) свидетельствует о выполнении ОЖ защитной противовоспалительной и детоксицирующей функции, а также позволяет утверждать, что ОЖ исследуемых видов имеет потенциальную лечебно-профилактическую ценность в отношении воспалительных процессов, происходящих, например, в слизистой оболочке пищеварительного тракта на всем пути до гидролиза белковых компонентов ОЖ при ее употреблении. Быстрая растворимость высушенной ОЖ в слюне, оценка чего была проведена авторами органолептически, позволяет антиоксидантным соединениям действовать уже в ротовой полости. Существенная антиоксидантная активность высушенной ОЖ сибирского осетра и стерляди была выявлена ранее химико-аналитическим (кулонометрическим) способом и составила 65.0 ± 4.1 Кл/г и 63.2 ± 3.8 Кл/г соответственно, что составляет около 18% от антиоксидантной активности плодов томата — признанного источника антиоксидантов [33].

В ходе данного исследования была выявлена пищевая ценность ОЖ сибирского осетра и стерляди, заключающаяся в высоком содержании

Таблица 3. Витаминно-минеральный состав высушенной ОЖ сибирского осетра и стерляди, сопоставленный с суточными потребностями взрослого человека согласно методическим рекомендациям МР 2.3.1.2432-08.

Вещество / элемент	Содержание, мг/100 г		Потребность взрослого человека, мг/сут
	сибирский осетр (n = 5)	стерлядь (n = 5)	
Витамин С	222.5 ± 91.7	519.8 ± 82.3*	90
Витамин В ₁	22.80 ± 10.02	25.22 ± 8.34	1.5
Витамин В ₂	90.97 ± 15.8	210.8 ± 35.7*	1.8
Витамин В ₃ (РР)	23.61 ± 12.45	79.28 ± 21.43*	20
Витамин В ₆	51.39 ± 18.36	52.25 ± 11.87	2
Na	5430 ± 824	7399 ± 756*	1300
K	12544 ± 2173*	4868 ± 1947	2500
Ca	2932 ± 768	3579 ± 671	1000; 1200 после 60 лет
Mg	4140 ± 638*	2290 ± 497	400
Fe	115.2 ± 26.4	188.3 ± 35.2*	10 для мужчин; 18 для женщин
Cu	68.96 ± 7.41*	56.47 ± 4.80	1
Mn	4.14 ± 1.03	3.60 ± 0.77	2
Zn	84.13 ± 18.72	111.44 ± 21.62	12
Cr	0.082 ± 0.019	0.118 ± 0.027	0.05

*Достоверно более высокое значение по сравнению с соответствующим для данного витамина/элемента, согласно U-критерию Манна–Уитни при $p < 0.05$.

(по сухому весу) легко усваиваемого высокопитательного белка, а также ряда водорастворимых витаминов, макро- и микроэлементов. В ходе данного исследования была выявлена потенциальная лечебно-профилактическая ценность ОЖ сибирского осетра и стерляди, заключающаяся в значительном содержании антиоксидантных белков, а также в возможности ее применения для профилактики заболеваний, связанных с авитаминозом и недостаточным потреблением ряда макро- и микроэлементов. Ранее при моделировании окислительного стресса на культуре фибробластов было показано, что добавление в культуральную среду высушенной ОЖ сибирского осетра после окислительного воздействия приводило к ослаблению стрессового состояния в клетках [34]. Таким образом, ОЖ сибирского осетра и стерляди может быть основой для востребованной на рынке натуральной белково-витаминной БАД с дополнительным лечебно-профилактическим эффектом, что позволит увеличить прибыльность выращивания осетровых за счет получения дополнительного ценного продукта.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122030100170-5).

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. Lahnsteiner F., Weismann T., Patzner R. A. // *Tissue Cell*. 1997. V. 29. № 3. P. 305–314. [https://doi.org/10.1016/s0040-8166\(97\)80006-7](https://doi.org/10.1016/s0040-8166(97)80006-7)
2. Zadmajid V., Myers J. N., Sørensen S. R., Ernest Butts I. A. // *Theriogenology*. 2019. V. 132. P. 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.03.021>
3. Сытова М. В., Харенко Е. Н. // *Рыбпром*. 2007. № 3. С. 41–43.
4. Ahmmed M. K., Ahmmed F., Carne A., Tian H. S., Bekhit A. E.-D. A. // *Fish Roe Biochemistry, Products, and Safety*. / Ed. A. E.-D. A. Bekhit. Amsterdam: Elsevier, 2022. P. 93–142. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819893-3.00005-9>
5. Харенко Е. Н., Дмитриева Е. А., Сытова М. В. // *Рыбное хозяйство*. 2011. № 3. С. 79–85.
6. Lam M., Khoshkhat P., Chamani M., Shahsavari S., Dorkoosh F. A., Rajabi A., Maniruzzaman M., Nokhodchi A. // *J. Drug Deliv. Sci. Tech.* 2022. V. 67. P. 102985. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102985>
7. Дмитриева Е. А., Харенко Е. Н., Сытова М. В. // *Хранение и переработка сельхозсырья*. 2012. № 3. С. 12–15.
8. Mikhailova M. V., Zolotarev K. V., Mikhailov A. N., Sanzhakov M. A., Farafonova T. E. // *International Journal of Management and Humanities*. 2019. V. 4. № 4. P. 1–5. <https://doi.org/10.35940/ijmh.C0442.124419>
9. Heudi O., Kiliç T., Fontannaz P. // *J. Chromatogr. A*. 2005. V. 1070. № 1–2. P. 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.02.033>
10. Mikhailova M., Zolotarev K., Nakhod V., Farafonova T., Mikhailov A. // *E3S Web of Conferences*. 2022. V. 363. P. 03017. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202236303017>
11. Каница И. Г., Казиева Л. Ш., Вавилов Н. Э., Згода В. Г., Копылов А. Т., Медведев А. Е., Бунеева О. А. // *Биомедицинская химия*. 2023. Т. 69. № 1. С. 46–54. <https://doi.org/10.18097/PBMC20236901046>
12. Yousefi M., Rahimi-Nasrabadi M., Pourmortazavi S. M., Wysokowski M., Jesionowski T., Ehrlich H., Mirsadeghi S. // *TrAC Trends Anal. Chem.* 2019. V. 118. P. 182–193. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.038>
13. Pillai R. R., Kurpad A. V. // *Br. J. Nutr.* 2012. V. 108. Suppl 2. P. S44–S49. <https://doi.org/10.1017/S0007114512002401>
14. Das P., Sahoo L., Das S. P., Bit A., Joshi C. G., Kushwaha B. et al. // *Front. Genet.* 2020. V. 11. P. 386. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00386>
15. Janeway C. A. Jr., Travers P. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th ed. N.Y.: Garland Science, 2001. 450 p.
16. Johnson S. L., Villarroel M., Rosengrave P., Carne A., Kleffmann T., Lokman P. M., Gemmell N. J. // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 8. P. e104155. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104155>
17. Nynca J., Arnold G. J., Fröhlich T., Ciereszko A. // *Reprod. Fertil. Dev.* 2015. V. 27. № 3. P. 504–512. <https://doi.org/10.1071/RD13224>
18. Nynca J., Zarski D., Fröhlich T., Köster M., Bobe J., Ciereszko A. // *Aquac.* 2022. V. 548. Part 2. P. 737656. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737656>
19. Russell S., Hayes M. A., Lumsden J. S. // *Fish Shellfish Immunol.* 2009. V. 26. № 1. P. 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.03.001>
20. Xu Z., Zan H., Pone E. J., Mai T., Casali P. // *Nat. Rev. Immunol.* 2012. V. 12. № 7. P. 517–531. <https://doi.org/10.1038/nri3216>
21. McDonald T. A., Glezeva N., Collier P., O'Reilly J., O'Connell E., Tea I. et al. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. P. 7507. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64558-4>
22. Gettins P. G. W. // *Chem. Rev.* 2002. V. 102. № 12. P. 4751–4804. <https://doi.org/10.1021/cr010170+>
23. Fletcher G. L., Hew C. L., Davies P. L. // *Annu. Rev. Physiol.* 2001. V. 63. P. 359–390. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.63.1.359>
24. Fang L., Hu X., Cui L., Lv P., Ma X., Ye Y. // *J. Assist. Reprod. Genet.* V. 36. № 6. P. 1101–1107. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01454-5>
25. Grummer R. R., Carroll D. J. // *J. Anim. Sci.* 1988. V. 66. № 12. P. 3160–3173. <https://doi.org/10.2527/jas1988.66123160x>
26. Robinson R. // *PLoS Biol.* 2008. V. 6. № 3. P. e77. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060077>

27. Crichton R. R., Charlotiaux-Wauters M. // Eur. J. Biochem. 1987. V. 164. № 3. P. 485–506.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1987.tb11155.x>
28. Hellman N. E., Gitlin J. D. // Annu. Rev. Nutr. 2002. V. 22. P. 439–458.
<https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.012502.114457>
29. Mills G. C. // J. Biol. Chem. 1957. V. 229. № 1. P. 189–197.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)70608-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)70608-X)
30. Rhee S. G., Kil I. S. // Annu. Rev. Biochem. 2017. V. 86. P. 749–775.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014431>
31. Mostert V. // Arch. Biochem. Biophys. 2000. V. 376. № 2. P. 433–438. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.1735>
32. Holmgren A. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. № 24. P. 13963–13966.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)71625-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)71625-6)
33. Mikhailova M., Zolotarev K., Mikhailov A., Lapin A., Nakhod V. // E3S Web of Conferences. 2023. V. 381. P. 01075.
<https://doi.org/10.1051/e3sconf/202338101075>
34. Михайлова М. В., Беляева Н. Ф., Козлова Н. И., Золотарев К. В., Михайлов А. Н., Подушка С. Б. // Biomedical Chemistry: Research and Methods. 2018. Т. 1. № 2. С. e00011.
<https://doi.org/10.18097/BMCRM00011>

Nutritional and Possible Medicinal Value of Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii*) and Sterlet (*Acipenser ruthenus*) Ovarian Fluid

M. V. Mikhailova^a, K. V. Zolotarev^{a, *}, A. N. Mikhailov^a, V. I. Nakhod^a, V. G. Zgoda^a, and E. N. Kharenko^b

^a*Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, 119121 Russia*

^b*Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography, Moscow, 105187 Russia*

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

Chemical analysis of samples of ovarian fluid (OF), a secondary product of breeding of the two common in Russian aquaculture species of Acipenseridae family, was carried out in order to assess its nutritional and possible medicinal value. It has been figured out that the dominant organic component of OF of both species is a water-soluble or water-dispersible protein easily absorbed by the digestive tract. Proteomic analysis of the samples has shown that the main component of the protein fraction of OF is a highly nutritious protein vitellogenin. Amino acid analysis has shown that OF samples of both species satisfy the needs of an adult human in all essential amino acids. Eighty-five grams of dried sturgeon OF or 55 g of dried sterlet OF covers the daily requirement of an adult for vitamins C, B₁, B₂, B₃ (PP) and B₆, a number of macronutrients (Na, K, Ca, Mg) and micronutrients (Fe, Cu, Mn, Zn, Cr). Furthermore, Cu content is significantly higher in sturgeon OF, and Fe content is significantly higher in sterlet OF, which is partly confirmed by the relative content of Cu and Fe carrier proteins, ceruloplasmin and transferrin respectively. In addition, a number of proteins of physiological significance for fish were identified. The possible medicinal value of OF consists, among other things, in significant content of various antioxidant proteins in OF of both species. The use of OF as a food supplement could improve the profitability of sturgeon breeding by producing an additional valuable product, and would also expand the range of natural dietary supplements on the market.

Keywords: ovarian fluid, *Acipenseridae*, secondary product, nutritional value, vitamins, amino acids, macronutrients, micronutrients, possible medicinal value, antioxidants

УДК 577.182.22:57.083.3

ЗАВИСИМОСТЬ ГРУППОВОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕНИЦИЛЛИНОВ В МОЛОКЕ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ПЕРЕКРЕСТНЫХ РЕАКЦИЙ АНТИБИОТИКОВ С ПОЛИКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ

© 2024 г. О. С. Куприенко¹, *, И. И. Вашкевич¹, А. И. Зильберман¹, О. В. Свиридов¹

¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, 220084 Беларусь

*e-mail: kuprienko@iboch.by

Поступила в редакцию 17.05.2023 г.

После доработки 17.06.2023 г.

Принята к публикации 06.07.2023 г.

Исследовано влияние термодинамических и кинетических условий на взаимодействия специфических поликлональных антител с антибиотиками группы пенициллинов в системе прямого иммуноферментного анализа (ИФА). В перекрестных реакциях поликлональных антител с разными пенициллинами наблюдались минимальные различия при проведении иммунохимической реакции при 4 °С в течение 1 ч. Увеличение температуры и продолжительности анализа повышало реактивность антител только к амоксициллину и существенно увеличивало различия в чувствительности определения индивидуальных пенициллинов. В подобранных температурных и временных условиях проведения ИФА установлены следующие значения перекрестной реактивности антител: к пенициллину G — 90%, к ампициллину — 100%, к амоксициллину — 110%. Аналитическая чувствительность определения ампициллина составила 0.03 нг/мл, предел количественного определения ампициллина в молоке — 0.4 мкг/л. Предложенная система группоспецифического прямого ИФА использована для выявления в молоке семи антибиотиков группы пенициллинов — пенициллина G, ампициллина, амоксициллина, клаксациллина, оксациллина, диклоксациллина и нафциллина, нормативно контролируемых в продуктах питания и сырье животного происхождения.

Ключевые слова: перекрестная реактивность антител, иммуноферментный анализ, антибиотики, пенициллины

DOI: 10.31857/S0555109924010121, **EDN:** HBQNGZ

Пенициллины представляют собой группу противомикробных соединений, в основе химической структуры которых лежит 6-аминопенициллановая кислота. Эта базовая молекула состоит из двух конденсированных гетероциклических колец — пятичленного тиазолидинового и четырехчленного бета-лактамного. Благодаря бета-лактамному циклу реализуется бактерицидное действие пенициллинов. Механизм такого действия заключается в нековалентном связывании и последующей химической реакции с ферментами (пенициллинсвязывающими белками), участвующими в синтезе клеточной стенки бактерии. В результате химической модификации активного центра эти белки больше не могут выполнять свои функции, что ослабляет клеточную стенку и приводит в конечном итоге к гибели микроорганизма [1, 2].

Пенициллины широко используются не только для лечения заболеваний человека, но и в ветеринарной медицине и сельском хозяйстве [3, 4].

Остаточные количества этих противомикробных субстанций могут присутствовать в пищевом сырье и продуктах питания животного происхождения, что приводит к их неконтролируемому потреблению и вызывает серьезные расстройства здоровья человека. Однако основная проблема заключается в том, что, поступая в организм в дозах существенно ниже терапевтических, пенициллины стимулируют возникновение у бактерий антибиотикорезистентности, которая горизонтально может передаваться между разными микроорганизмами [4–6]. Основными способами защиты бактерий от пенициллинов является экспрессия фермента бета-лактамазы, расщепляющего бета-лактамное кольцо, и возникновение мутаций пенициллинсвязывающих белков, что исключает их взаимодействие с антибиотиками [7, 8].

В странах Таможенного союза, ЕАЭС, Европейского союза установлены максимально допустимые уровни (МДУ) остатков антимикробных

препаратов, которые могут содержаться в переработанной пищевой продукции животного происхождения [9, 10]. Для представителей группы пенициллинов — пеницилина G (бензилпенициллина), ампициллина и амоксициллина — МДУ в молоке составляет 4 мкг/кг, для остальных пенициллинов — 30 мкг/кг (табл. 1).

Предложены различные способы определения антимикробных препаратов в пищевой продукции. Часто используемым для этих целей физико-химическим методом является жидкостная хроматография с масс-спектрометрической детекцией [11–13]. Этот высокочувствительный метод позволяет определять индивидуальные бета-лактамы антибиотики [14–16]. Он предполагает проведение длительной и трудоемкой подготовки проб, требует дорогого оборудования и наличия высококвалифицированного персонала. Образцы анализируются методом жидкостной хроматографии по одному. Альтернативой этому методу являются чувствительные, относительно простые и недорогие биоаналитические методы (иммунохимические, биорецепторные), позволяющие одновременно проводить анализ большого числа проб. К таким методам относится, в частности, ИФА [17–21], который в зависимости от характеристик связывающего белка (антитела или белка-рецептора) может быть как моноспецифическим [22, 23], так и проявлять групповую специфичность [24–27]. Группоспецифический ИФА позволяет делать выводы о присутствии в исследуемом образце суммарного количества ряда соединений с родственными структурами [28].

Ранее нами были получены высокоаффинные поликлональные антитела (ПАт) к пенициллинам, перекрестные реактивности (ПР) которых к пенициллину G, ампициллину и амоксициллину значительно различаются [29]. Это не позволяло использовать данные ПАт в предложенных условиях проведения реакций связывания антиген-антитело (37°С в течение 1 ч) в ИФА для определения с близкими чувствительностями трех основных пенициллинов. Из литературы [30–33] известно, что групповая специфичность анализа зависит от условий его проведения, таких как состав реакционной среды, соотношение иммунореагентов и их концентрации. Также замечено, что к существенным изменениям ПР антител приводит варьирование термодинамических и кинетических (температурных и временных) условий протекания иммунохимической реакции. Так, в результате увеличения продолжительности конкурентного твердофазного ИФА наблюдали существенное возрастание различий в специфичности анализа по отношению к представителям антибиотиков группы фторхинолонов [30]. В свою очередь авторами [33] отмечено, что уменьшение времени инкубации сближает величины ПР специфических антител к структурно

Таблица 1. Нормативно контролируемые антибиотики группы пенициллинов

Наименование	Структурная формула	МДУ в молоке, мкг/кг
Пенициллин G (бензилпенициллин)		4
Ампициллин		4
Амоксициллин		4
Клоксациллин		30
Оксацилин		30
Диклоксациллин		30
Нафциллин		30

похожим соединениям группы стероидных гормонов, а увеличение температуры проведения реакции, приводящее к ускорению наступления в системе равновесного состояния, наоборот усиливает различия в специфичности анализа.

Цель исследования — усиление ПР антител и выравнивание их чувствительности к разным пенициллинам, что позволит повысить аналитическую ценность полученных ПАт и разработать группоспецифичную систему ИФА для определения семи пенициллинов в продовольственном сырье и пищевой продукции.

МЕТОДИКА

В работе использовали реактивы фирмы “Sigma-Aldrich” (США) ампициллина и амоксициллина тригидраты, пенициллина G натриевую соль, оксациллина, клоксациллина, диклоксациллина и нафциллина натриевые соли моногидраты, бычий сывороточный альбумин (БСА), тетраметилбензидин (ТМБ). Tween-20 произведен “AppliChem GmbH” (Германия). Все вспомогательные реагенты (соли, кислоты, щелочи) были аналитической или химической чистоты.

Антисыворотка кролика, содержащая высокоаффинные ПАт к антибиотикам группы пенициллинов, получена в результате продолжительной иммунизации животных конъюгатом ампициллина с тиреоглобулином [29]. Продукты присоединения ампициллина и амоксициллина к пероксидазе из корней хрена Амп-ПХ, Амокс-ПХ, Ам-Ад-ПХ, Амокс-пФт-ПХ (Амп и Амокс обозначают остатки ампициллина и амоксициллина, Ад и пФт — остатки адипиновой и п-фталевой кислот) синтезированы ранее [29]. Антитела овцы против иммуноглобулинов кролика получены на опытном производстве Института биоорганической химии НАН Беларуси (Республика Беларусь).

Хромоген-субстратную смесь готовили непосредственно перед использованием, добавляя 1 часть 0.4 мМ раствора ТМБ в диметилсульфоксиде к 20 частям 3.0 мМ H_2O_2 в 0.04 М натрий-цитратном буфере (рН 4.0).

Конкурентный иммуноферментный анализ. В лунках полистирольного 96-луночного микропланшета (“ХЕМА”, Россия) сорбировали из 100 мкл раствора антивидовые антитела овцы к иммуноглобулинам кролика (5 мкг/мл) в 0.1 М $NaHCO_3$ в течение 18 ч при 4°C. Затем планшеты промывали 0.05 М Na-фосфатным буфером (НФБ), рН 7.4, содержащим 0.15 М NaCl и 0.05% Tween-20, и блокировали не занятые антителами участки поверхности лунок раствором 5 г/л БСА. Далее в лунки вносили по 100 мкл сыворотки кролика, содержащей специфические к антибиотикам группы пенициллинов ПАт, в разведении 1 : 50000 в 0.05 М НФБ, рН 7.4, содержащем 0.15 М NaCl, 1 г/л БСА и 0.05%

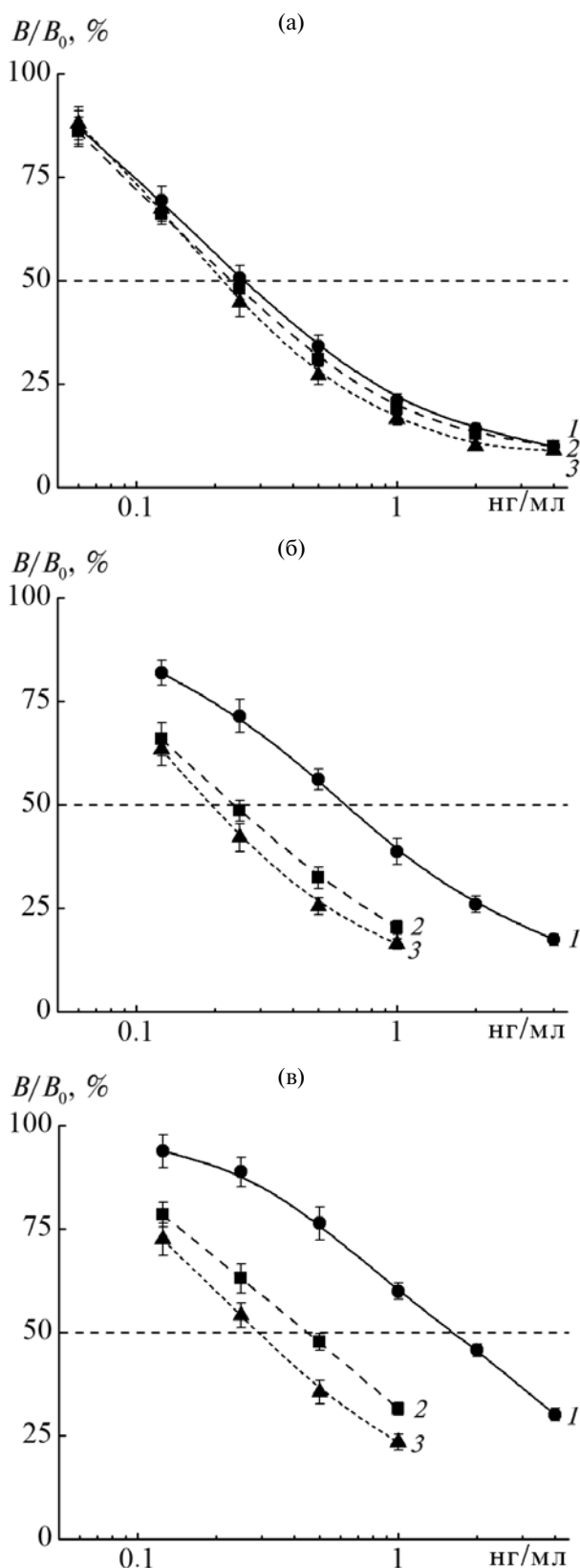


Рис. 1. Кривые ингибирования связывания конъюгата АмП-ПХ с ПАт в присутствии пенициллина G (1), ампициллина (2) или амоксициллина (3) при инкубации в течение 1 ч при температурах 4 (а), 25 (б) или 37°C (в).

Tween-20. Инкубировали в течение 18 ч при 4°C. После трехкратной промывки 0.05 М НФБ, pH 7.4, с 0.05% Tween-20 использовали функционализированные планшеты для проведения ИФА. Для этого в лунки планшета вносили 50 мкл раствора антибиотика группы пенициллинов или другого анализируемого раствора и 50 мкл конъюгата Амп-ПХ, Амокс-ПХ, Амп-Ад-ПХ или Амокс-пФт-ПХ каждый в концентрации 0.1 мкг/мл. Для приготовления растворов антибиотиков и конъюгата требуемой концентрации использовали 0.05 М НФБ, pH 7.4, содержащий 0.15 М NaCl, 1 г/л БСА и 0.05% Tween-20. Инкубировали систему при температуре 4, 25 или 37°C в течение 1–18 ч. Затем содержимое лунок удаляли и промывали планшет как описано выше. В лунки вносили по 100 мкл хромоген-субстратной смеси и инкубировали при 25°C в течение 15 мин. Останавливали ферментативную реакцию добавлением 100 мкл 1 М H₂SO₄. Оптическую плотность растворов в лунках измеряли при 450 нм с использованием планшетного спектрофотометра SPECTROstar Nano (“BMG Labtech”, Германия).

Подготовка проб молока с добавками пенициллинов. Использовали молоко пастеризованное жирностью 3.2%, приобретенное в торговой сети. Отсутствие в молоке антибиотиков группы пенициллинов предварительно устанавливали с использованием тест-системы Penicillin Elisa (“EuroProxima”, Нидерланды). К 5 мл молока добавляли 50 мкл растворов пенициллина G, ампициллина или амоксициллина до конечной концентрации 4 мкг/л или вносили 50 мкл растворов других пенициллинов до конечной концентрации 30 мкг/л. Затем разводили аликвоты молока в 5 раз 0.05 М НФБ, pH 7.4, содержащим 0.15 М NaCl, 1 г/л БСА и 0.05% Tween-20, и использовали в ИФА пенициллинов.

Аналитические характеристики ИФА и обработка полученных результатов. Для построения градуировочного графика и получения характеристик ИФА использовали соотношение B/B_0 , в процентах, где B — измеренная оптическая плотность в лунке с раствором антибиотика группы пенициллинов, B_0 — оптическая плотность в лунке, в которую вместо раствора антибиотика вносили буферный раствор, не содержащий специфически связывающихся с ПАТ соединений. Градуировочный график ИФА представляет собой зависимость величины B/B_0 от десятичного логарифма концентрации антибиотика группы пенициллинов. Расчеты по градуировочному графику проводили по методу кусочно-линейной аппроксимации, используя уравнение вида $y = \text{alg}(x) + b$.

Перекрестную реактивность ПАТ к соединению X вычисляли по уравнению

$$\text{ПР}(X) = \frac{IC_{50}(\text{Амп})}{IC_{50}(X)},$$

где $IC_{50}(\text{Амп})$ и $IC_{50}(X)$ — концентрации ампициллина и соединения X в нг/мл, вызывающие 50%-ное ингибирование связывания конъюгата с ПАТ, что проявляется как двукратное снижение детектируемого сигнала, при котором соотношение $B/B_0 = 50\%$.

Концентрации пенициллинов в образцах молока с добавками определяли по градуировочному графику в расчете на ампициллин. Предел количественного определения (ПКО) ампициллина в молоке рассчитывали как концентрацию ампициллина в мкг/л, эквивалентную среднему из 10 измеренных значений концентрации антибиотика в чистом молоке ($C_{0\text{cp}}$) плюс шестикратная величина стандартного отклонения измерения содержания ампициллина в данном эксперименте ($C_{0\text{cp}} + 6 \text{ SD}$).

Аналитическую чувствительность ИФА определяли как концентрацию ампициллина в нг/мл, при которой связывание конъюгата Амп-ПХ с ПАТ отличается от B_0 на двукратную величину стандартного отклонения B_0 ($B_0 - 2 \text{ SD}$) [34] при количестве измерений, равном 10. Аналитическую чувствительность рассчитывали по уравнению прямой $y = ax + b$, проведенной по точкам градуировочного графика, соответствующим концентрациям ампициллина 0, 0.06 и 0.13 нг/мл.

В таблицах и на рисунках приводятся значения средних арифметических из трех определений. Планки погрешностей обозначают среднеквадратичное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние условий проведения иммунохимической реакции на ПР ПАТ к пенициллинам исследовали в системе прямого конкурентного ИФА. ПАТ были биоспецифически иммобилизованы на внутренней поверхности лунок полистирольного микропланшета. Антибиотики группы пенициллинов и ферментый конъюгат Амп-ПХ присутствовали в лунках в виде растворов. Иммунохимическую реакцию с участием ПАТ, свободных пенициллинов и конъюгата проводили при трех температурах 4, 25 или 37°C в течение периода от 1 до 18 ч. Сравнивали параметры кривых ингибирования связывания пероксидазного конъюгата с иммобилизованными ПАТ в присутствии антибиотиков группы пенициллинов, определяли величину IC_{50} в выбранных условиях инкубации.

Исследование влияния термодинамических условий. Изменение температуры протекания иммунохимической реакции по-разному влияло на взаимодействие трех пенициллинов со специфическими ПАТ (рис. 1). Наибольший эффект повышение температуры оказывало на связывание с ПАТ пенициллина G. Величина IC_{50} этого антибиотика при 4°C составила 0.26 ± 0.01 нг/мл, при 25°C — 0.64 ± 0.02 нг/мл, при 37°C — 1.63 ± 0.05 нг/мл. Для

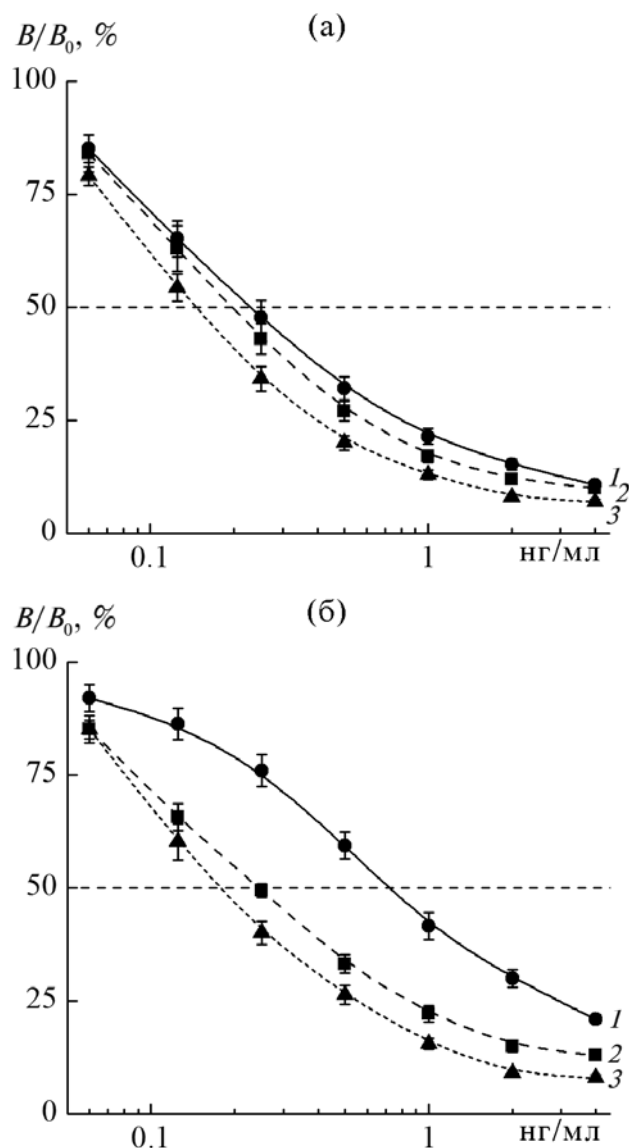


Рис. 2. Кривые ингибирования связывания конъюгата АмП-ПХ с ПАт в присутствии пенициллина G (1), ампициллина (2) или амоксициллина (3) при инкубации в течение 2 ч (а) или 18 ч (б) при температуре 4°С.

ампициллина и амоксициллина влияние температуры проявлялось в меньшей степени. Значения IC_{50} ампициллина и амоксициллина при 4°С были 0.23 ± 0.03 и 0.21 ± 0.02 нг/мл, при 25°С — 0.24 ± 0.02 и 0.19 ± 0.01 нг/мл, при 37°С — 0.45 ± 0.02 и 0.29 ± 0.02 нг/мл соответственно.

Наиболее близкие друг к другу значения величины IC_{50} для пенициллина G, ампициллина и амоксициллина наблюдались при 4°С. Очевидно, что эти условия, определяемых сродством антибиотиков к ПАт при данной температуре, являются предпочтительными для группоспецифичной системы ИФА.

Исследование влияние кинетических условий.

Исследование влияния кинетических условий протекания иммунохимической реакции на аналитические характеристики ИФА пенициллина G, ампициллина и амоксициллина проводили в ходе инкубации при выбранной температуре 4°С в течение 1, 2 и 18 ч (рис. 2). Увеличение времени инкубации с 1 до 2 ч приводило к уменьшению величин IC_{50} . Для пенициллина G, ампициллина и амоксициллина этот параметр составил соответственно 0.23 ± 0.01 нг/мл, 0.20 ± 0.02 и 0.15 ± 0.01 нг/мл. Дальнейшее увеличение продолжительности инкубации до 18 ч привело к увеличению IC_{50} . Наиболее сильно влияние времени инкубации отражалось на ИФА пенициллина G: параметр IC_{50} увеличился до 0.72 ± 0.04 нг/мл, что почти в три раза больше соответствующей величины в случае инкубации 1 ч при 4°С.

Уменьшение времени инкубации при 4°С до 30 мин приводило к существенному увеличению разброса (коэффициента вариации) получаемых результатов, поэтому далее эти результаты не обсуждаются.

Расчет ПР специфических ПАт.

На основании средних значений величин IC_{50} была рассчитана ПР специфических ПАт для различных условий выполнения ИФА (табл. 2). При проведении ИФА при 4°С в течение 1 ч различия в ПР к пенициллину G, ампициллину и амоксициллину минимальны и составляют от 90 до 110%. Увеличение температуры протекания иммунохимической реакции в ИФА приводило к уменьшению ПР ПАт и к другим антибиотикам группы пенициллинов оксациллину, флоксациллину, нафциллину, диклоксациллину. В отдельном эксперименте было показано, что ПР используемых специфических ПАт менее 0.01% по отношению к ампициллину с гидролизованным бета-лактамым циклом (гидролиз проводили как описано в [35], выдерживая раствор ампициллина в 0.2 М NaOH при 37°С в течение 2 ч) и к цефалексину, представителю бета-лактажных антибиотиков из группы цефалоспоринов.

Исследование стабильности антибиотиков группы пенициллинов в условиях ИФА.

Ухудшение связывания антибиотиков с ПАт при увеличении времени или возрастании температуры, при которых проводилась иммунохимическая реакция, могло обуславливаться частичным расщеплением бета-лактажного цикла пенициллинов. В контрольном эксперименте растворы пенициллина G, ампициллина и амоксициллина выдерживали при 4°С в течение 18 ч или при 37°С в течение 1 ч, а затем использовали в ИФА. При этом не наблюдали различий в связывании хранившихся и свежеприготовленных растворов пенициллинов с ПАт (табл. 3). Поскольку ПАт не взаимодействовали с пенициллинами, имеющими гидролизованное бета-лактажное кольцо, то полученные результаты

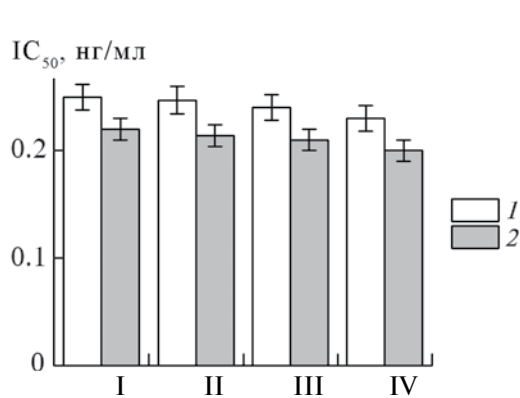


Рис. 3. Значения параметра IC₅₀ для пенициллина G (1) и амоксициллина (2) при использовании различных конъюгатов пенициллинов с ПХ (инкубация в течение 1 ч при 4°С). I — Амп-ПХ; II — Амокс-ПХ; III — Амп-Ад-ПХ; IV — Амокс-пФт-ПХ.

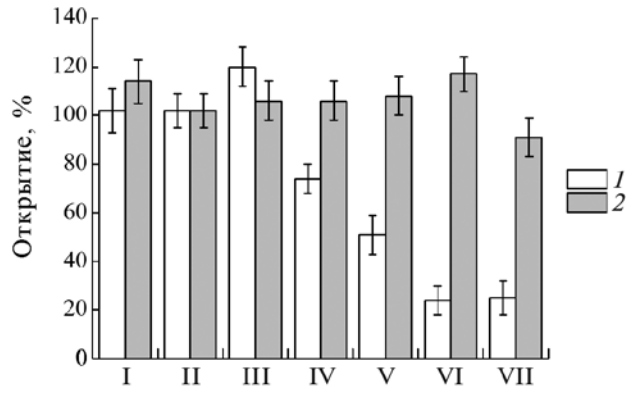


Рис. 4. Полнота выявления антибиотиков группы пенициллинов (%), добавленных в образцы молока. Приведены значения, полученные методом ИФА (1) и пересчитанные с учетом ПР специфичных ПАт (2). I — пенициллин G; II — ампициллин; III — амоксициллин; IV — оксациллин; V — флоксациллин; VI — диклоксациллин; VII — нафциллин.

свидетельствовали о том, что хранение пенициллинов, а значит и проведение ИФА в выбранных условиях не приводило к гидролизу антибиотиков. Следовательно, наблюдаемые изменения параметров ИФА при варьировании временных и температурных условий проведения иммунохимической реакции обусловлены кинетическими и термодинамическими особенностями взаимодействия индивидуальных пенициллинов с ПАт.

Наблюдаемые эффекты времени и температуры на ПР специфических ПАт связаны с существенно большим сродством данных антител к ампициллину и амоксициллину, чем к другим антибиотикам группы пенициллинов. Как указывалось ранее [30, 33], проведение иммуноанализа в равновесных условиях сводит к минимуму взаимодействие антител с низкоаффинными перекрестно реагирующими соединениями. В настоящем эксперименте

наиболее ярко это проявилось для пенициллина G при увеличении времени инкубации до 18 ч и при проведении иммунохимической реакции при повышенной температуре, ускоряющей наступление равновесного состояния в системе. Уменьшение времени инкубации и снижение температуры уравнивало ПР антител к нескольким антибиотикам группы пенициллинов.

Использование в ИФА различных конъюгатов. Ранее было установлено, что аналитические параметры прямого ИФА зависят от вида использованного пероксидазного конъюгата [29]. В настоящей работе были применены ранее синтезированные ферментные конъюгаты ампициллина и амоксициллина, в которых антибиотики напрямую присоединены к ПХ (Амп-ПХ и Амокс-ПХ) или через остатки адипиновой или п-фталевой кислот (Амп-Ад-ПХ или Амокс-пФт-ПХ). Инкубацию

Таблица 2. Перекрестные реакции ПАт к антибиотикам группы пенициллинов при различных условиях проведения иммунохимической реакции

Соединение	ПР, %				
	1 ч			2 ч	18 ч
	+4°С	+25°С	+37°С	+4°С	
Амоксициллин	110	126	155	133	133
Ампициллин	100	100	100	100	100
Пенициллин G	90	38	28	86	33
Оксациллин	70	—	53	—	—
Клоксациллин	47	25	24	—	—
Нафциллин	29	—	15	—	—
Диклоксациллин	18	17	7	—	—
Цефалексин	< 0.01	< 0.01	< 0.01	—	—
Гидролизированный ампициллин	< 0.01	< 0.01	< 0.01	—	—

Примечание: “—” — определение не проводилось.

Таблица 3. Ингибирование связывания конъюгата Амп-ПХ с ПАт в присутствии антибиотиков, хранившихся в различных условиях

Раствор антибиотика, 0.4 нг/мл	<i>B/B₀</i> , %		
	свежеприготовленный раствор антибиотика	раствор антибиотика, хранившийся	
		18 ч при 4°С	1 ч при 37°С
Пенициллин G	37 ± 3	37 ± 2	37 ± 3
Ампициллин	40 ± 2	—	41 ± 3
Амоксициллин	31 ± 3	—	30 ± 2

Примечание: “—” — определение не проводилось.

на стадии иммунохимического взаимодействия в системе прямого ИФА проводили при 4°С в течение 1 ч. Выявлены некоторые различия в величинах IC₅₀ при использовании разных конъюгатов (рис. 3), однако соотношения IC₅₀(пенициллин G)/IC₅₀(амоксициллин) оказались одинаковыми. Структура использованных конъюгатов не оказала влияния на ПР ПАт к пенициллинам.

Определение пенициллинов в молоке. ИФА в подобранных условиях инкубации использовали для определения пенициллинов в пробах молока. Для построения градуировочного графика применяли растворы ампициллина с концентрациями от 0.06 до 4 нг/мл. Аналитическая чувствительность ИФА составила 0.03 нг/мл, ПКО ампициллина в молоке оказался равным 0.4 мкг/л. По градуировочному графику рассчитали количество пенициллинов в образцах молока, содержащих антибиотики в концентрациях, равных МДУ. Полученные результаты приведены в табл. 4. В пробах с добавками нафциллина, диклоксациллина, флоксациллина и оксациллина полнота выявления пенициллинов составила от 23 до 74% (рис. 4), что связано со специфичностью ИФА к этим антибиотикам. Найденные концентрации пенициллинов в молоке пересчитывали с использованием соответствующих значений ПР специфических ПАт (табл. 2). Результаты приведены в табл. 4 и на рис. 4. Полнота выявления антибиотиков в пробах молока с учетом специфичности ИФА составила от 91 до 117%.

В предложенном нами группоспецифичном ИФА расчет количества конкретного пенициллина в исследуемой пробе может быть осуществлен только в том случае, когда известно, какое соединение содержится в образце, например в том случае, если ветеринарной службой предоставлены сведения о фармсубстанции, использованной для лечения продуктивных животных. При отсутствии такой информации необходимо выбрать критерий для интерпретации результатов скринингового ИФА. Данные, представленные в табл. 4 и на рис. 4, позволили сделать такой выбор. Если было получено значение суммарной концентрации пенициллинов в молоке менее 4 мкг/л (в расчете на ампициллин), то в анализируемом образце содержание семи нормируемых пенициллинов не превышает установленный МДУ. Если ИФА показал значение более 4 мкг/л, то следует провести подтверждающий анализ инструментальным методом с определением концентраций индивидуальных пенициллинов.

Таким образом, найдены условия повышения ПР высокоаффинных ПАт для ИФА, позволяющие определять, в частности, пенициллин G, ампициллин и амоксициллин со специфичностью от 90 до 110% в диапазоне концентраций от 0.06 до 4 нг/мл с аналитической чувствительностью по ампициллину 0.03 нг/мл. Найденное значение ПКО ампициллина в молоке составило 0.4 мкг/л, что в 10 раз меньше МДУ. Скрининг образцов молока с использованием описанной системы ИФА дает возможность с высокой точностью сделать доказательный вывод о непревышении МДУ для семи нормируемых антибиотиков группы пенициллинов.

Таблица 4. Результаты ИФА образцов молока, контаминированных одним из пенициллинов на уровне МДУ

Антибиотик	Внесено, мкг/л	Определенная концентрация, мкг/л	
		по графику, в расчете на ампициллин	с учетом ПР
Пенициллин G	4	4.1 ± 0.4	4.6 ± 0.4
Ампициллин	4	4.1 ± 0.3	4.1 ± 0.3
Амоксициллин	4	4.8 ± 0.4	4.3 ± 0.3
Флоксациллин	30	15.2 ± 1.2	32.3 ± 2.6
Оксациллин	30	22.3 ± 1.3	31.9 ± 2.6
Диклоксациллин	30	7.3 ± 0.4	36.7 ± 2.5
Нафциллин	30	7.4 ± 0.5	27.4 ± 2.2

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Miller E. L. // J. Midwifery Women's Health. 2002. V. 47. № 6. P. 426–434.
[https://doi.org/10.1016/s1526-9523\(02\)00330-6](https://doi.org/10.1016/s1526-9523(02)00330-6)
2. Nathwani D., Wood M. J. // Drugs. 1993. V. 45. № 6. P. 866–894.
<https://doi.org/10.2165/00003495-199345060-00002>
3. Шульга Н. Н., Шульга И. С., Плавшак Л. П. // Тенденции развития науки и образования. 2019. Т. 46. № 5. С. 32–35.
<https://doi.org/10.18411/lj-01-2019-98>
4. Sazykin I. S., Khmelevtsova L. E., Seliverstova E. Y., Sazykina M. A. // Appl. Biochem. Microbiol. 2021. V. 57. № 1. P. 20–30.
<https://doi.org/10.1134/S0003683821010166>
5. Berendonk T. U., Manaia C. M., Merlin C., Fatta-Kassinos D., Cytryn E., Walsh F., et al. // Nat. Rev. Microbiol. 2015. V. 13. P. 310–317.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro3439>
6. Шевелева С. А., Хотимченко С. А., Минаева Л. П., Смотрина Ю. В. // Вопросы питания. 2021. Т. 90. № 3. С. 50–57.
<https://doi.org/10.33029/0042-8833-2021-90-3-50-57>
7. Van Hoek A. H.A.M., Mevius D., Guerra B., Mullany P., Roberts A. P., Aarts H. J.M. // Front. Microbiol. 2011. V. 2. Article 203.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00203>
8. Mikhaleva T. V., Ilyasov P. V., Zakharova O. I. // Appl. Biochem. Microbiol. 2019. V. 55. № 2. P. 99–106.
<https://doi.org/10.1134/S000368381902011X>
9. Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 13 февраля 2018 г. № 28.
docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01217013/clc-d_15022018_28
10. European Commission. Council Regulation (EU) No. 37/2010 of 22 December 2009 on Pharmacologically Active Substances and their Classification Regarding Maximum Residue Limits in Foodstuffs of Animal Origin. // Official Journal of the European Union. 2010. L 15/10.
11. Barros S. C., Silva A. S., Torres D. // Antibiotics 2023. V. 12. № 2. P. 202.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics12020202>
12. Moga A., Vergara-Barberán M., Lerma-García M.J., Carrasco-Correa E.J., Herrero-Martínez J.M., Simó-Alfonso E.F. // Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 2021. V. 20. № 2. P. 1681–1716.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12702>
13. Marazuela M. D., Bogiatti S. // Anal. Chim. Acta. 2009. Vol. 645. № 1–2. P. 5–17.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.04.031>
14. Holstege D. M., Puschner B., Whitehead G., Galey F. D. // J. Agric. Food. Chem. 2002. V. 50. № 2. P. 406–411.
<https://doi.org/10.1021/jf010994s>
15. Pugajeva I., Ikkere L. E., Judjallo E., Bartkevics V. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2019. V. 166. P. 252–263.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.01.024>
16. Bessaire T., Mujahid C., Beck A., Tarres A., Savoy M. C., Woo P. M. et al. // Food Addit. Contam. Part A. 2018. V. 35. № 4. P. 661–673.
<https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1426891>
17. Dzantiev B. B., Byzova N. A., Urusov A. E., Zherdev A. V. // Trends Anal. Chem. 2014. V. 55. P. 81–93.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.11.007>
18. Reig M., Toldrá F. // Meat Sci. 2008. V. 78. № 1–2. P. 60–67.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.07.029>
19. Duffy G. F., Moore E. J. // Anal. Lett. 2017. V. 50. № 1. P. 1–32.
<https://doi.org/10.1080/00032719.2016.1167900>
20. Xu F., Ren K., Yang Y. Z., Guo J. P., Ma G. P., Liu Y. M. et al. // J. Integ. Agric. 2015. V. 14. № 11. P. 2282–2295.
[https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61121-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61121-2)
21. Serchenya T. S., Semizhon P. A., Schaslionak A. P., Harbachova I. V., Vashkevich I. I., Sviridov O. V. // Appl. Biochem. Microbiol. 2023. V. 59. № 1. P. 79–92.
<https://doi.org/10.1134/S0003683823010106>
22. Samsonova Z. V., Shchelokova O. S., Ivanova N. L., Rubtsova M. Y., Egorov A. M. // Appl. Biochem. Microbiol. 2005. V. 41. № 6. P. 589–595.
<https://doi.org/10.1007/s10438-005-0107-4>
23. Bacigalupo M. A., Meroni G., Secundo F., Lelli R. // Talanta. 2008. V. 77. № 1. P. 126–130.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.057>
24. Jiao S. N., Wang P., Zhao G. X., Zhang H. C., Liu J., Wang J. P. // J. Environ. Sci. Health B. 2013. V. 48. № 6. P. 486–494.
<https://doi.org/10.1080/03601234.2013.761908>
25. Zeng K., Zhang J., Wang Y., Wang Z. H., Zhang S. X., Wu C. M. et al. // Biomed. Environ. Sci. 2013. V. 26. № 2. P. 100–109.
<https://doi.org/10.3967/0895-3988.2013.02.004>
26. Peng, J., Cheng, G., Huang, L., Wang Y., Hao H., Peng D. et al. // Anal. Bioanal. Chem. 2013. V. 405. P. 8925–8933.
<https://doi.org/10.1007/s00216-013-7311-5>
27. Serchenya T. S., Harbachova I. V., Sviridov O. V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2022. V. 48. № 1. P. 85–95.
<https://doi.org/10.1134/S1068162022010125>
28. Shanin I. A., Eremin S. A., Zvereva E. A., Zherdev A. V., Dzantiev B. B., Sviridov O. V. // Appl. Biochem. Microbiol. 2019. V. 55. № 5. P. 563–569.
<https://doi.org/10.1134/S0003683819050132>
29. Kuprienko O. S., Serchenya T. S., Vashkevich I. I., Harbachova I. V., Zilberman A. I., Sviridov O. V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2022. V. 48. № 1. P. 105–114.
<https://doi.org/10.1134/S106816202201006X>
30. Sotnikov D. V., Zherdev A. V., Zvereva E. A., Eremin S. A., Dzantiev B. B. // Appl. Sci. 2021. V. 11. № 14. Article 6581.
<https://doi.org/10.3390/app11146581>
31. Boutten B., Ezan E., Mamas S., Dray F. // Clin. Chem. 1991. V. 37. № 3. P. 394–397.
<https://doi.org/10.1093/clinchem/37.3.394>
32. Sulea T., Rohani N., Baardsnes J., Corbeil C. R., Deprez C., Cepero-Donates Y. et al. // MABs. 2020. Vol. 12. № 1. Article 1682866.
<https://doi.org/10.1080/19420862.2019.1682866>
33. Miller J. J., Valdes R. // Clin. Chem. 1991. V. 37. № 2. P. 144–153.
<https://doi.org/10.1093/clinchem/37.2.144>

34. Sheehan C., He J., Smith M. The Immunoassay Handbook. 4 Ed. /Ed. D. Wild. Amsterdam: Elsevier, 2013. P. 395–402. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-097037-0.00026-9>
35. Komova N. S., Berlina A. N., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. // Orient. J. Chem. 2020. V. 36. № 1. P. 21–25. <https://doi.org/10.13005/ojc/360103>

Dependence of the Group Specificity of Immunoenzyme Determination of Penicillins in Milk on the Temperature and Duration of Antibiotic Cross Reactions with Polyclonal Antibodies

O. S. Kuprienko^{a, *}, I. I. Vashkevich^a, A. I. Zilberman^a, and O. V. Sviridov^a

^a*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220084, Belarus*

^{*}*e-mail: kuprienko@iboch.by*

The influence of thermodynamic and kinetic conditions on the interaction of polyclonal antibodies to penicillins with the antibiotics of a penicillin group was studied in the system of a direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Minimum differences in the cross reactions of the polyclonal antibodies with different penicillins were observed when the ELISA was carried out at 4°C for 1 hour. An increase in temperature and duration of the assay led to an increase in antibodies reactivity only to amoxicillin, and significantly enhanced differences among the sensitivities of individual penicillins determination. Under the chosen assay conditions, the following antibodies cross-reactivity values were obtained: to penicillin G — 90%, to ampicillin — 100%, to amoxicillin — 110%. The analytical sensitivity was 0.03 ng/mL for ampicillin, and the limit of ampicillin quantification in milk was 0.4 µg/L. The developed group-specific ELISA was used for the determination in milk of seven penicillins that are regulatory controlled in foods and raw materials of animal origin — penicillin G, ampicillin, amoxicillin, cloxacillin, oxacillin, dicloxacillin and nafcillin.

Keywords: antibody cross-reactivity, enzyme-linked immunosorbent assay, antibiotics, penicillins