

ISSN 0555-1099

Том 59, Номер 5

Сентябрь - Октябрь 2023



ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ



www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 59, номер 5, 2023

Перспективы повышения биологической активности биопрепаратов на основе бактерий рода *Bacillus* и нанокompозитов хитозана (Обзор)

Л. Г. Яруллина, Ж. Н. Калацкая, Е. А. Черепанова, Н. А. Еловская, В. О. Цветков,
И. А. Овчинников, Г. Ф. Бурханова, Е. И. Рыбинская, А. В. Сорокань, К. М. Герасимович,
Е. А. Заикина, В. В. Николайчук, К. С. Гилевская, И. С. Марданшин 427

Действие пероксинитрита и гидропероксида *трет*-бутила на тиоловые лиганды динитрозильных комплексов железа

И. С. Пугаченко, Э. И. Насыбуллина, О. В. Космачевская, К. Б. Шумаев, А. Ф. Топунов 440

Сравнительная характеристика природной HydSL гидрогеназы *Thiocapsa bogorovii* и ее генетической модификации с усеченным HydS белком

А. С. Стародубов, М. Х. Хасимов, А. Н. Хустнутдинова, Н. А. Зорин, А. А. Цыганков 450

Выделение, очистка и некоторые свойства стафилолитического фермента из *Staphylococcus hyicus*

Т. В. Федоров, М. Г. Теймуразов, А. К. Сурин, О. И. Тазина, С. Ф. Бикетов 457

Сравнение биохимических свойств рекомбинантных химозинов альпака (*Vicugna pacos*), полученных в про- и эукариотической системах экспрессии

С. В. Беленькая, В. В. Ельчанинов, В. Ю. Чиркова, Д. Н. Щербаков 465

Циклодекстринглюканотрансфераза алкалофильного штамма *Caldalkalibacillus mannanilyticus* IB-OR17-B1

П. Ю. Мильман, Е. А. Гильванова, Г. Э. Актуганов 472

Изменение профиля жирных кислот и образование летучих органических соединений при ферментации коровьего молока пробиотическими штаммами *Lacticaseibacillus paracasei*

К. В. Моисеенко, А. В. Шабаев, О. А. Глазунова, О. С. Савинова, Т. В. Федорова 483

Механизмы контроля *Pseudomonas fluorescens* корневой гнили ячменя, вызываемой *Fusarium culmorum*

В. Ю. Шахназарова, Д. С. Сырова, М. И. Лебединский, Н. А. Вишневецкая,
А. И. Шапошников, Е. В. Бородин, О. К. Струнникова 494

Кофейная кислота в различных формуляциях как регулятор ростовых процессов и устойчивости микроклонов картофеля в культуре *in vitro*

Н. А. Еловская, Ж. Н. Калацкая, Н. А. Ламан, В. В. Николайчук,
А. Н. Красковский, К. С. Гилевская 502

Фаговые антитела для определения канамицина

О. И. Гулий, С. С. Евстигнеева, С. А. Староверов, А. С. Фомин, О. А. Караваева 512

ХРОНИКА

Поздравляем юбиляра. Анатолию Георгиевичу Лобанку исполняется 85 лет 520

CONTENTS

Vol. 59, No. 5, 2023

Prospects to Improving Biological Activity of Agricultural Formulations Based on Bacteria of the Genus <i>Bacillus</i> and Chitosan Nanocomposites <i>L. G. Yarullina, J. N. Kalatskaja, E. A. Cherepanova, N. A. Yaloukaya, V. O. Tsvetkov, I. A. Ovchinnikov, G. F. Burkhanova, K. I. Rybinskaya, A. V. Sorokan, K. M. Herasimovich, E. A. Zaikina, V. V. Nikolaichuk, K. S. Hileuskaya, and I. S. Mardanshin</i>	427
Effect of Peroxynitrite and <i>tert</i> -Butyl Hydroperoxide on Thiol Ligands of Dinitrosyl Iron Complexes <i>I. S. Pugachenko, E. I. Nasybullina, O. V. Kosmachevskaya, K. B. Shumaev, and A. F. Topunov</i>	440
Comparison of HydSI Hydrogenase of <i>Thiocapsa bogorovii</i> and its Modification with Truncated C-terminus of HydS <i>A. S. Starodubov, M. K. Khasimov, A. N. Khusnutdinova, N. A. Zorin, and A. A. Tsygankov</i>	450
Isolation, Purification and some Properties of Staphylolytic Enzyme from <i>Staphylococcus hyicus</i> <i>T. V. Fedorov, M. G. Teymurazov, A. K. Surin, O. I. Tazina, and S. F. Biketov</i>	457
Comparison of Biochemical Properties of Recombinant Alpaca (<i>Vicugna pacos</i>) Chymosins Produced in Pro- and Eukaryotic Expression Systems <i>S. V. Belenkaya, V. V. Elchaninov, V. Y. Chirkova, and D. N. Shcherbakov</i>	465
Cyclodextrin Glucanotransferase of Alkalophilic Strain <i>Caldalkalibacillus mannanilyticus</i> IB-OR17-B1 <i>P. Yu. Milman, E. A. Gilvanova, and G. E. Aktuganov</i>	472
Fatty Acid Profiles Change and the Volatile Organic Compounds Formation During the Cow'S Milk Fermentation with Probiotic <i>Lactocaseibacillus paracasei</i> Strains <i>K. V. Moiseenko, A. V. Shabaev, O. A. Glazunova, O. S. Savinova, and T. V. Fedorova</i>	483
Mechanisms of Control by <i>Pseudomonas fluorescens</i> of Barley Root Rot Caused by <i>Fusarium culmorum</i> <i>V. Yu. Shakhnazarova, D. S. Syrova, M. I. Lebedinskii, N. A. Vishnevskaya, A. I. Shaposhnikov, E. V. Borodina, and O. K. Strunnikova</i>	494
Caffeic Acid in Various Formulations as a Growth and Resistance Regulator of Potato Microclones in <i>in vitro</i> Culture <i>N. A. Yaloukaya, J. N. Kalatskaja, N. A. Laman, V. V. Nikalaichuk, A. N. Kraskouski, and K. S. Hileuskaya</i>	502
Phage Antibodies for Kanamycin Detection <i>O. I. Guliy, S. S. Evstigneeva, S. A. Staroverov, A. S. Fomin, and O. A. Karavaeva</i>	512

Chronicle

Congratulations to Anatoliy Georgievich Lobanok on his 85th Birthday	520
--	-----

УДК 571.27:632.4:632.938:633.11

ПЕРСПЕКТИВЫ ПОВЫШЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БИОПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЙ РОДА *Bacillus* И НАНОКОМПОЗИТОВ ХИТОЗАНА (ОБЗОР)¹

© 2023 г. Л. Г. Яруллина^{1, 3, *}, Ж. Н. Калацкая², Е. А. Черепанова¹, Н. А. Еловская²,
В. О. Цветков³, И. А. Овчинников², Г. Ф. Бурханова¹, Е. И. Рыбинская², А. В. Сорокань¹,
К. М. Герасимович², Е. А. Заикина¹, В. В. Николайчук⁴, К. С. Гилевская⁴, И. С. Марданшин⁵

¹ Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение

Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

² Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси, Минск, 220072 Беларусь

³ Уфимский университет науки и технологий, Уфа, 450076 Россия

⁴ Институт химии новых материалов НАН Беларуси, Минск, 220072 Беларусь

⁵ Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства — обособленное
структурное подразделение УФИЦ РАН, Уфа, 450054 Россия

*e-mail: yarullina@bk.ru

Поступила в редакцию 10.04.2023 г.

После доработки 27.04.2023 г.

Принята к публикации 28.04.2023 г.

В обзоре рассмотрены свойства эндофитных бактерий рода *Bacillus* как объектов биоконтроля, перспективы расширения спектра их защитного действия на основе комплексов с производными хитозана. Описаны механизмы прямого и опосредованного воздействия бактерий на защитный потенциал растений, проанализирована роль про-/антиоксидантной системы в формировании системных защитных реакций. Проанализированы иммуностимулирующие свойства производных хитозана и его модификаций с органическими молекулами и наночастицами металлов. Показана перспективность использования комплексов бактерий *Bacillus* spp. с нано- и субмикронными частицами производных хитозана для расширения спектра защитного действия новых биофунгицидов и иммуностимуляторов на их основе.

Ключевые слова: бактерии рода *Bacillus*, хитозан, наноконпозиты, фитопатогены, про-/антиоксидантная система, экспрессия генов, PR-белки

DOI: 10.31857/S0555109923050185, **EDN:** PJKDD

В настоящее время первостепенной задачей растениеводства является использование эффективных и безопасных для окружающей среды и человека средств защиты растений, применение которых будет основано на поддержании устойчивости существующих в агроэкосистемах экологических связей [1]. В процессе коэволюции микроорганизмов и растений, насчитывающей, по данным работы [2], более 450 млн лет, сформировалась система, в которой растение представляет собой комплекс экологических ниш, которые могут быть заняты патогенными или мутуалистическими микроорганизмами [1, 3]. Баланс между этими составляющими микробиома, который во многом определяется природой микроорганизмов, видовыми особенностями растения и усло-

виями окружающей среды, является одним из важнейших факторов формирования фенотипа растений [3, 4]. Именно проблема комплексной длительной устойчивости сельскохозяйственных растений к стрессовым факторам биотической и абиотической природы стоит на повестке дня. Растущий спрос на производство органической продукции и законодательное ужесточение требований к пестицидам [<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02009R1107-20221121>] приводят к необходимости поиска экологически безопасных путей повышения устойчивости растений к неблагоприятным климатическим изменениям, защиты от патогенов и до-запланированной продуктивности. Актуальным становится поиск средств повышения продуктивности и устойчивости сельскохозяйственных растений, не связанных с их генетической трансформацией, с опорой на резервные возмож-

¹ Список сокращений: SAR — Systemic acquired resistance, ISR — Induced systemic resistance.

ности, заложенные в самом растительном организме, в том числе, на способность формировать мутуалистические отношения с “полезными” микроорганизмами [1, 4].

В связи с этим наиболее перспективными являются микробиологические подходы и приемы, которые основаны на использовании потенциала растений и микроорганизмов из группы стимулирующих рост растений бактерий (Plant Growth Promoting Bacteria, **PGPB**). Первоначально используемый термин Plant Growth Promoting Rhizobacteria (**PGPR**) не отражает всего многообразия связей растений и микроорганизмов. Особый интерес среди **PGPB** вызывают бактериальные эндофиты, представленные, например факультативными мутуалистами из рода *Bacillus*, не образующими специфических анатомических структур внутри растений [4, 5]. Широко используются биопестициды на основе бактерий рода *Bacillus*, подавляющие развитие патогенов, а также стимулирующие рост растений и их устойчивость к неблагоприятным факторам окружающей среды [6]. К недостаткам биопестицидов можно отнести сравнительно низкую скорость уничтожения патогенов и высокую чувствительность к неблагоприятным факторам окружающей среды. Так, продуцируемые *Bacillus thuringiensis* Cry-белки чувствительны к ряду факторов окружающей среды, таких как солнечный свет, осадки, роса, pH почвы и температура [7]. В этой связи весьма актуальным становится разработка способов повышения эффективности микробиологических препаратов для защиты продовольственных культур от комплекса биотических и абиотических факторов среды, что может быть достигнуто созданием микробных консорциумов штаммов с различными активностями [8, 9], а также препаратов, в которых штамм бактерий дополнен биологически активными веществами [10, 11]. Обзор посвящен рассмотрению современных данных о возможностях совместного использования **PGPB** и одного из наиболее известных класса индукторов фитоиммунитета — производных азотсодержащих полисахаридов из остатков N-ацетилглюкозамина, к которым относятся олигомеры хитина и хитозана [12, 13].

Важно, что химическая модификация хитозана позволяет получать производные с повышенной растворимостью, антимикробными свойствами, ростостимулирующей и антиоксидантной активностью [14, 15]. Поиск путей повышения эффективности микробиологических препаратов для защиты продовольственных культур от фитопатогенов с комплексной (фунгистатической, вирусной, иммунизирующей, ростостимулирующей) активностью в агробиоценозах становится с каждым годом все актуальнее. Для решения данной задачи необходимы новые сведения о механизмах формирования защитных реакций в рас-

тениях комплексом **PGPB** с модифицированным хитозаном.

Биологическая активность эндофитных бактерий *Bacillus* spp. Бактерии рода *Bacillus*, в особенности, *B. subtilis* и *B. thuringiensis*, составляют более 75% всего рынка биопестицидов [1, 16]. В настоящее время в списке Министерства сельского хозяйства России зарегистрирован ряд биофунгицидных препаратов на основе *B. subtilis* для защиты растений — фитоспорин-М, алирин-Б, бактофит, гамаир, витаплан, бисолбисан, елена, бинорам, ризоплан, экстрасол и др.) и 3 инсектицида на основе *B. thuringiensis* (битоксибациллин, лепидобактерицид, лепидоцид) [17]. Из зарубежных биопрепаратов следует отметить штамм *Bacillus amyloliquefaciens* (*subtilis*) FZB-24 — действующее начало ряда биопрепаратов RhizoPlus (“AbiTer GmbH”, ФРГ) и Taegro (“Novozyme”, Дания) [18], *B. amyloliquefaciens* IN937a — биопрепарата BioYield® (“Gustafson”, США), *B. pumilus* INR7 — биопрепарата Yield Shield (“Gustafson”, США) [16]. Они характеризуются мощным биосинтетическим потенциалом в соединении с высокой экологической пластичностью, а также технологичностью в применении [17, 19–23] и сравнительной простотой культивирования на различных средах [19, 23].

В настоящее время накоплен огромный пласт данных о различных механизмах, благодаря которым **PGPB** оказывают благотворное действие на растение-хозяина.

1. Прямой антибиотический эффект против фитопатогенов и вредителей (в классическом понимании агентов биологической защиты) [18, 24–27].
2. Опосредованная биосинтезом фитогормонов и эффекторов способность стимулировать защитные механизмы растений [28–30].
3. Повышение устойчивости растений к абиотическим стресс-факторам [17, 31–35].
4. Способность напрямую стимулировать рост и развитие растений путем продукции фитогормонов и других метаболитов [31, 36, 37].

Таким образом, действие **PGPB** на растительный организм многомерно и требует рассмотрения отдельных механизмов, обеспечивающих пластичность в системе “**PGPB**–растение-хозяин”.

Механизмы прямого биоцидного действия **PGPB.** Представители рода *Bacillus* относятся к активным продуцентам антибиотиков. Основная фракция антибиотиков, подавляющая фитопатогены, — нерибосомально синтезируемые пептидные производные. В основном это липопептиды (сурфактин, итурин, фенгицин), цианистый водород, гидролазы, субтилин, субтилозин, субланцин, хлоротетаин, микобациклин, ризатацин, бациллин, диффицидин [38]. Сурфактин — один из наиболее активных биосурфактантов. Он характеризуется главным образом антибактериальны-

ми и противовирусными свойствами, а итурин и фенгицин – антигрибными [39].

Обнаружено, что бактерии рода *Bacillus* выделяют в культуральную среду хитиназы и глюканазы, гидролизующие хитин и глюканы, которые являются важными компонентами клеточной стенки микроорганизмов [40, 41]. По последним данным, *Bacillus aryabhatai* продуцирует хитиназу с двумя N-концевыми LysM-доменами, позволяющими эффективно разрушать кристаллический хитин и подавлять развитие вредоносного патогена *Fusarium oxysporum* [42].

Показано, что использование биопрепаратов на основе эндофитных микроорганизмов, продуцирующих РНКазы, является перспективным методом защиты растений от РНК-содержащих вирусов [43, 44]. Инсектицидный эффект бактерий рода *Bacillus* против насекомых-переносчиков вирусов так же имеет опосредованный защитный эффект против вирусов [45].

PGPB как индукторы защитных реакций растений против патогенов и вредителей. На сегодняшний день общепринятым является представление о ведущей роли салициловой (СК) и жасмоновой (ЖК) кислот в реализации механизмов системной устойчивости растений в ответ на стрессы [37, 46–49]. Системную устойчивость растений можно разделить на индуцированную системную устойчивость (Induced systemic resistance, **ISR**) и системную приобретенную устойчивость (Systemic acquired resistance, **SAR**), индуцируемую непатогенными и патогенными микроорганизмами соответственно [50]. Колонизация полезными микробами вызывает физиологическое состояние системы растение-хозяин, называемое праймингом. “Праймированный” статус растения позволяет реализовывать более сильные и быстрые защитные реакции против последующей инвазии патогенов, что проявляется как общий признак системной устойчивости, индуцируемой полезными микроорганизмами [51]. **SAR**, впервые обнаруженная в 1961 году при исследовании устойчивости табака к вирусу табачной мозаики (**ВТМ**), опосредуется СК [52], а обработка растений *PGPB* способствует развитию **ISR**, опосредованной действием ЖК, маркером развития которой является индукция экспрессии защитного белка PR-6 [26]. Считается, что развитие **SAR** происходит при узнавании растением биотрофного патогена или его элиситоров, приводящей к синтезу салицилат-зависимых PR-белков [53, 54], в том числе, экспрессии маркерного для **SAR** гена PR-1 белка [55]. **ISR**, по видимому, наиболее эффективна против некротрофных патогенов, среди которых возбудители альтернариоза [56, 57] и корневых гнилей [58].

Синтез ингибиторов гидролаз в тканях является частью процессов, более характерных для **ISR**,

развивающихся в ответ на стрессовые факторы биотического и абиотического характера [59–63]. Однако показано, что формирование устойчивости пшеницы к патогенам, например, грибу *Stagonospora nodorum*, под воздействием бактерий рода *Bacillus* может развиваться и через салицилатный сигналинг по типу **SAR** [64]. *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 индуцирует **ISR** с более высоким накоплением СК и активностью ферментов ее биосинтеза [65]. Предварительная обработка непатогенным штаммом *B. cereus* AR156 запускала экспрессию генов PR1 и PDF1.2 в *Arabidopsis thaliana*, что указывало на синергизм СК- и ЖК-зависимых реакций у растения [48].

Как известно, общим в развитии **ISR** и **SAR** является раннее и быстрое накопление активных форм кислорода (АФК) [66, 67]. Вероятно, способствуя генерации АФК, бактерии рода *Bacillus* индуцируют передачу сигналов, запускающих работу других защитных механизмов.

Механизм защитного действия биопрепаратов на основе *PGPB* связывают с транзистентным усилением продукции АФК при контакте с непатогенным микроорганизмом [68] и опосредованным участием такого слабого окислительного взрыва в праймировании экспрессии генов PR-белков [69]. Изменение концентрации АФК, о которой в экспериментальных условиях обычно судят по содержанию наиболее стабильного соединения – H_2O_2 , в растительных тканях при патогенезе может происходить в результате многих метаболических процессов, но в большей степени это происходит в результате изменения активности оксидоредуктаз [70]. Соответственно, развитие окислительного взрыва требует ингибирования активности антиоксидантных ферментов (СОД, каталаза и другие), и активации про-оксидантных ферментов (НАДФ-Н оксидазы, пероксидаз). Многие патогены продуцируют эффекторы, которые препятствуют аккумуляции АФК в растении-хозяине, например, продуцируя каталазу, как возбудитель мучнистой росы *Ralstonia solanacearum* [71] и возбудитель септориоза *Stagonospora nodorum* [72].

Одним из важных ферментов, вовлеченных в утилизацию АФК, является супероксиддисмутаза (СОД) [73]. Ферментом, вовлеченным как в систему генерации, так и утилизации H_2O_2 , является пероксидаза [74]. Обширное мультигенное семейство классических пероксидаз растений класса III, включенные в белки семейства PR-9, участвует в упрочении клеточных стенок за счет окислительных реакций между белками и фенолами, катализируют процессы отложения лигнина на клеточных стенках, что также повышает их устойчивость к действию гидролаз патогенов. О’Брайен с соавт. [75] было показано, что недостаточная экспрессия генов пероксидазы PRX33 и PRX34 арабидопсиса приводила к снижению транскрипционной

активности генов, кодирующих транскрипционные факторы MYB51, CYP79B2, и CYP81F2, относящиеся к ЖК-зависимому пути. Однако, как предполагается некоторыми учеными, именно чувствительность к СК является своеобразным “маркером” пероксидаз, участвующих в защитных реакциях растений против патогенов [76].

Важнейшим антиоксидантным ферментом являются каталазы [77, 78]. В проростках пшеницы перекись водорода, в зависимости от концентрации, ингибировала [79] или стимулировала [80] активность каталазы. Способностью к ингибированию каталазы обладает и салициловая кислота [81], что является одним из способов усиления реакции сверхчувствительности (СВЧ) [82, 83]. Ингибирование фермента под действием СК может приводить в дальнейшем к активации экспрессии гена каталазы и усилению синтеза фермента [84]. Таким образом, важную роль в модификации активности каталазы играют сигнальные и гормональные соединения. Показано, что АФК могут взаимодействовать с другими вторичными мессенджерами, такими как активные формы азота и Ca^{2+} , которые участвуют в развитии растений, метаболических процессах, стрессовых реакциях и закрытии устьиц [85].

Имеются сведения о липопептидах бактерий, преимущественно продуцируемых представителями рода *Bacillus*, имеющих фитоиммунотулирующую активность [45], например, на пшенице против возбудителя септориоза и злаковой тли [86].

Важно также, что бактерии рода *Bacillus* способны стимулировать иммунные реакции растений против вирусов. Так, бактерии *B. subtilis* BEB-DN, изолированные из ризосферы томатов, запускали СИУ против вирусов, переносимых белокрылкой *Bemisia tabaci*. При этом также индуцировался ЖК-зависимый сигнальный путь, включающий механизмы защиты растений от белокрылки, связанные с биосинтезом ингибиторов протеиназ, фенолпропаноидных и терпеноидных соединений [87].

Бактерии рода *Bacillus* индуцировали развитие системной устойчивости в растениях к ВТМ, ингибируя синтез капсидных белков и усиливая экспрессию генов *Coil* и *NPR1*, кодирующих белки ЖК- и СК-зависимых белков (PR-1a и PR-1b) и клеточно-стеночных экспансинов *NtEXP2* и *NtEXP6* [88]. Штамм бактерий *Rhodopseudomonas palustris* GJ-22 уменьшал степень поражения табака ВТМ и вирусом картофеля *Y*, увеличивая активность транскрипции генов защитных генов PR-1, PR-5, PR-3 и PR-6 [89]. В то же время, обработка томата штаммом *B. amyloliquefaciens* MBI600 индуцировала повышение устойчивости растений к ВБТ и УВК, что коррелировало с усилением

экспрессии генов, регулируемых через салицилатный сигнальный путь [90].

Повышение устойчивости растений к абиотическим факторам среды под действием PGPB. Абиотические факторы среды, воздействующие на растения, можно подразделить на вызывающие осмотический (засуха, засоление), тепловой и токсический стресс [91]. Чтобы справиться с осмотическими стрессами у растений-хозяев, необходимо создать различные механизмы регуляции для контроля их питательных веществ, а также эффективности использования воды, транспирации и активации антиоксидантов для устранения перепроизводства АФК из-за абиотического стресса.

Два основных механизма противодействия абиотическому стрессу, поддержание эффективности использования воды и баланса АФК [18], могут поддерживаться за счет микробиома корневой системы, вовлеченного в производство экзополисахаридов, глюканов, белков, жирных кислот [92].

Механизмом устойчивости ризосферных микробов к высокому содержанию соли является минимизация поглощения соли за счет регуляции экспрессии переносчиков ионов, изменения структуры корня и захвата катионов экзополисахаридами. Микробы поддерживают гомеостаз ионов с высоким соотношением K^+/Na^+ и пониженным содержанием Na^+ и Cl^- в побегах и листьях, соответственно, усиливая экспрессию переносчика K^+ , и исключая Na^+ [93]. Так, Ниу с соавт. [94] показали, что галофитная трава (*Pucciniella tenuiflora*), инокулированная *B. subtilis* GB30, проявляла снижение накопления Na^+ , что было подтверждено подавляющей регуляцией генов *pt NKT2* и повышающей регуляцией генов *pt NKT1* и *pt SOS1* в корнях при высоких концентрациях NaCl .

Воздействие на растение абиотического стресса (засоления и засухи) снижает уровень активности антиоксидантных ферментов, включая СОД, аскорбатпероксидазу, глутатионредуктазу, каталазу и нитратредуктазу увеличивая перекисное окисление липидов [95]. Недавно Кадмири и соавт. [96] продемонстрировали повышенную активность пероксидазы при засолении и засухе в инокулированных *A. brasilense* DSM1690 и *P. fluorescens* Ms-01 растениях пшеницы по сравнению с контрольной обработкой.

Механизмы роста-стимулирующего действия PGPB. Особенностью PGPB является их способность воздействовать на рост растений непосредственно за счет синтеза различных метаболитов гормональной и сигнальной природы, таких как ауксины, цитокинины [97], гиббереллины [98]. Так инокуляция салата штаммом *B. subtilis* IB-22, продуцирующим зеатин-рибозид [99], индуцировала в растениях более чем десятикратное накоп-

ление цитокининов. Обнаружено, что продуцирующий ауксин штамм *B. methylotrophicus* M4-96, изолированный из корней кукурузы, стимулировал рост обработанных бактериями растений *Arabidopsis thaliana* [100]. Оказалось, что производное индолил-уксусной кислоты (ИУК) обуславливает рост-стимулирующий эффект штаммов *B. amyloliquefaciens* FZB42 [17] и *B. amyloliquefaciens* SQR9 [101]. Способность штамма бактерии *B. aryabhattai* SRB02 стимулировать рост растений сои (*Glycine max*) в норме и в условиях развития окислительного стресса связывают с продукцией им ауксинов, зеатина, гиббереллинов и АБК [102].

Садеги с соавт. [103] показали, что солеустойчивые изоляты *Streptomyces*, способные продуцировать индолил-уксусную кислоту (ИУК), стимулировали рост корневой системы пшеницы при засолении. Недавно Канг и др. [104] сообщили, что ИУК, продуцируемая *Leclercia adecarboxylata* MO1, способствует увеличению синтеза сахаров, органических кислот и хлорофилла у томатов. У бактерий *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Halomonas*, *Azospirillum* и *Pseudomonas* была выявлена продукция цитокининов, необходимых для клеточной пролиферации и дифференцировки [105]. Продуценты АБК также выявлены среди PGPB, включая бактерии *Proteus mirabilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas fluorescens* и *Achromobacter xylosoxidans* [106]. Наличие штаммов, синтезирующих гиббереллины, показано у *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *Azospirillum* sp. [107]. Бактерии рода *Bacillus* способны снижать содержание этилена в растениях, улучшать фиксацию азота, усваиваемость макро- и микроэлементов [108].

Следует отметить, что рост-стимулирующий эффект PGPB также достигается за счет увеличения устойчивости растений к биотическим и абиотическим стрессам. Известно, что защитный спектр биопрепаратов на основе бактерий рода *Bacillus* можно значительно расширить, комбинируя их с медиаторами сигнальных систем [25, 109, 110]. Так, установлена активация защитных систем растений картофеля бактериями рода *Bacillus* и сигнальными молекулами – СК и ЖК, при заражении растений *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary или Y-вирусом в сочетании с почвенной засухой. Защитный эффект был опосредован накоплением пероксида водорода, модуляцией активности ферментов, регулирующих его уровень, и повышением экспрессии генов PR-белков: PR-1, PR-6 и PR-9 [111, 112]. Однако следует отметить, что обработка экзогенными СК или ЖК может грубо нарушить баланс фитогормонов в растении и существенно снизить устойчивость к некротрофным патогенам и насекомым в случае СК, и к биотрофным патогенам в случае ЖК, принимая во внимание явление СК/ЖК-интерференцию [37, 46–49]. В связи с этим перспективным представляется использование производных хитина, которые

также были описаны как одни из первых элиситоров, или индукторов защитных реакций растений [113].

Применение производных хитина и хитозана. Известно, что хитин, хитозан и их олигомеры считаются активными элиситорами иммунитета растений [114–117]. Преимуществами этих полисахаридов являются такие их уникальные свойства, как биосовместимость, нетоксичность и широкий спектр физиолого-биохимической активности, возобновляемая и доступная сырьевая база [118].

Биологическая активность и элиситорные свойства хитозана зависят от его химической природы, молекулярной массы (варьирует от 102 кДа у олигомеров и до нескольких сотен кДа у высокомолекулярных форм), степени полимеризации и дезацетилирования (сочетание остатков N-ацетилглюкозамина и глюкозамина), концентрации, вида растения, химического состава почвы и условий окружающей среды [116, 119, 120]. Наибольшая биологическая активность характерна для хитозана со степенью дезацетилирования в пределах 70–90% [116, 121].

Считается, что хитозан снижает заболеваемость растений за счет двух основных механизмов: 1) это прямая антимикробная активность через повреждение плазматической мембраны, взаимодействие с ДНК и РНК, хелатирование металлов и отложение образующихся комплексов на поверхности клетки патогена; 2) индукция защитных реакций растений через активацию факторов транскрипции в результате распознавания и связывания хитина/хитозана рецепторами клеточной поверхности [122].

Хитозан нашел практическое применение в качестве средств защиты растений от вирусов. Показана эффективность хитозана в защите картофеля от ХВК, УВК, ВТМ, вируса некроза табака (ВНТ), огуречной мозаики (ВОМ), мозаики люцерны (ВМЛ), желтой мозаики фасоли (ВЖМФ), вириоида веретеновидности клубней (ВВКК) и др. [120, 123]. Его защитный эффект зависел от концентрации, степени полимеризации, N-дезацетилирования, заряда молекулы и химической модификации [124]. Механизм защитного эффекта хитозана связывают с предотвращением распространения вирусов по сосудам флоэмы и плазмодесмам растений, в том числе благодаря отложению каллозы в порах клеток ситовидных трубок и активации растительных рибонуклеаз [45, 125, 126].

На основе хитозана и его производных в мире созданы коммерческие препараты для защиты растений в ЕС: Chito Plant, Biochit, Stemicol, в США Elexa, PDB – Plant Defense Booster, YEA – Yield Enhancing Agent, для обработки и защиты семян и вегетирующих растений зерновых, овощных, цитрусовых, плодовых, ягодных, декоративных и цветочных культур, а также картофеля,

хлопчатника и винограда от грибных, бактериальных и вирусных болезней [114, 127]. В Российской Федерации ведущим научным центром по разработке научной концепции создания препаратов на основе хитозана является Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений (Санкт-Петербург, Россия), при научном сопровождении которого разработаны препараты Хитозар, Нарцисс, Экогель и др. [114, 128, 129].

Потенциальные способы повышения эффективности биопрепаратов с использованием хитозанов. Существуют данные о повышении биологической активности микробиологических препаратов при использовании хитозанов [130, 131]. Установлено, что добавление хитозана к микробам-антагонистам повышало эффективность биоагентов в защите овощных культур от мучнистой росы, а добавление хитина к штаммам *Bacillus* значительно снижало увядание растений хлопка [132]. Биопрепарат торговой марки Витаплан (культуральная жидкость (КЖ) штаммов *Bacillus subtilis* с включенным коллоидным хитином) в 1.5–2.0 раза эффективнее повышал устойчивость пшеницы к темно-бурой пятнистости и бурой ржавчине, по сравнению с исходным биопрепаратом [132]. Добавление хитозана к *Pseudomonas* sp. способствовало повышению эффективности при защите от вируса скручивания листьев томатов [10, 12, 112, 133]. Синергетический эффект хитозанов и бактерий связывают с синтезом штаммами *Bacillus* эндохитиназы, обеспечивающей рост бактерий на среде, богатой хитином, генерирующей олигосахариды, полученные из хитина, которые, в свою очередь, влияют на рост растений [134, 135]. Продукция хитин-связывающего белка (Сру) определенным штаммом *Bacillus thuringiensis* усиливала инсектицидную и фунгистатическую активность этих белков [13]. Показано, что помимо индукции активности хитиназы и стимулирования роста бактерий добавление хитина оказывает и другие полезные эффекты на растения: ускорение прорастания семян и стимуляция роста и развития растений кукурузы, сорго, снижение заболеваемости томатов, вызванной *Fusarium* spp. и увеличение числа и массы плодов томатов в условиях теплицы [13].

Однако существуют и трудности, связанные с включением хитозана в среды для культивирования бактерий, так как он способен подавлять рост бактериальной культуры из-за проявляемой антимикробной активности [136], а также зависимости эффективности биопрепаратов от различных факторов окружающей среды, включая плодородие и физико-химические свойства почвы, погодные условия и др. [137, 138].

Модификация хитозана оксикоричными кислотами. Одним из путей преодоления негативных последствий добавления хитозана к бактериальным препаратам может быть его модификация.

Так показано, что включение в биопрепарат Витаплан, салицилата хитозана повышает индуцирующую активность антагониста, увеличивая его биологическую активность в 2.0–2.5 раза [130].

К ингибиторам вирусной инфекции относят, в том числе и фенольные соединения [139, 140]. Выявлено подавление развития вирусной инфекции у растений огурца (*Cucumis sativus* L.), вызванной штаммом ВТМ, содержащими флавоноиды концентратами, выделенными из герани луговой (*Geranium pratense* L.) [139]. Известно, что СК является ключевой молекулой для индукции SAR и обеспечения устойчивости инфицированных растений. Показано, что экзогенная СК в концентрации 2 мМ индуцировала устойчивость томатов к желтой курчавости листьев в ответ на вирусную постинкуляцию. Обработанные СК растения имели нормальный ростовой фенотип [141].

В последнее время отмечается активное применение экзогенных оксикоричных кислот в качестве индукторов устойчивости к абиотическим стрессам и регуляторов роста растений [142–144]. Имеются сведения о влиянии оксикоричных кислот на устойчивость растений ржи к бурой листовой ржавчине [145]. Использование оксикоричных кислот при хемотерапии вирусов на плодовых и ягодных культурах *in vitro* приводит к 100% оздоровлению эксплантов ежевики при культивировании на средах с кофейной и феруловой кислотами [146]. Существует коммерческий препарат Циркон на основе оксикоричных кислот, обладающий ростстимулирующими и иммуномодулирующими свойствами [147]. Одним из способов изменения биодоступности оксикоричных кислот является связывание их с полимерной матрицей-носителем. В этом плане одним из перспективных биополимеров является хитозан. Введение новых функциональных групп и заместителей, например, низкомолекулярных фенольных соединений [14, 148, 149] позволяет получать производные с повышенной растворимостью и антиоксидантной активностью.

Конъюгация хитозана и кофейной кислоты позволяет создавать материалы с улучшенными свойствами: антиоксидантными, антимикробными и др. [150]. Значительный ростстимулирующий эффект обработки семян конъюгатами на основе хитозана и оксикоричных кислот получен при выращивании растений огурца [15, 151].

Механизмы влияния на растения получаемых в настоящее время конъюгатов на основе хитозана и оксикоричных кислот, а также нано- и субмикронных частиц на их основе только начинаются изучаться. Следует отметить, что экспериментальные данные об элиситорном потенциале нано- и субмикронных частиц оксикоричных кислот в виде конъюгата с хитозаном или антивирус-

ном потенциале данных соединений в литературе отсутствуют.

Модификация хитозана наночастицами металлов. Кроме биополимеров и наноматериалов на их основе (например, нано- и субмикронных частиц) интерес представляют свойства неорганических наночастиц металлов и их оксидов. В последние годы в литературе все чаще упоминаются перспективы использования наночастицы оксида титана, серебра, цинка и меди для борьбы с возбудителями болезней растений [152–155]. В работах исследователей отмечается прямая, а также опосредованная активация иммунной системы растений и противовирусный защитный эффект наночастиц оксида никеля против вируса огуречной мозаики [156] и диоксида титана против вируса пятнистости кормовых бобов [157].

Наиболее эффективный биоцидный эффект характерен для наночастиц серебра, которые эффективны в отношении таких патогенов как *Phytophthora parasitica*, *Fusarium* spp. и нематод рода *Meloidogyne* spp. Однако, при рассмотрении действия наночастиц на растения в литературе встречаются противоречивые результаты [158]. Так, добавление наночастиц серебра Ag NPs в среду культивирования в концентрациях выше 300 мг/л⁻¹ ингибировало удлинение корней *Arabidopsis thaliana* и рост листьев, что приводило к снижению эффективности фотосинтеза и чрезмерному накоплению Ag в тканях [159]. Под влиянием наночастиц серебра увеличивалась максимальная эффективность фотосистемы II у растений горчицы. Наночастицы золота, серебра, оксидов титана и цинка увеличивали содержание хлорофиллов в листьях [160]. Влияние наночастиц металлов на фотосинтетический аппарат растений существенно зависит как от типа наночастиц и их дозы в растворе, так и от самого объекта исследования [158, 160].

Перспективным способом синтеза наночастиц серебра является химическое восстановление катионов Ag⁺ полисахаридами. Использование восстановительного и стабилизирующего потенциала полисахаридов при синтезе наночастиц Ag позволяет получать коллоиды в водных средах без использования токсичных восстановителей и растворителей, а также без дополнительного введения стабилизатора в реакционную смесь [161]. Следует отметить, что синтезируемые таким способом наноконпозиты полисахарид-Ag являются биосовместимыми и могут обладать свойствами, присущими каждому из компонентов.

Наночастицы серебра, стабилизированные различными биополимерами, активно исследуются и используются для создания фунгибицидов и регуляторов роста растений. Например, препараты Зеребро “Агро” и “Зерокс”, содержащие в качестве действующего вещества частицы

наноразмерного серебра, активно используются для обработки клубней картофеля, замачивания семян, обработки вегетирующих органов различных сельскохозяйственных культур. Однако результаты многочисленных исследований влияния стабилизированных наночастиц серебра на растения противоречивы [162] и механизм их взаимодействия с растениями до конца не выяснен.

Перспективы использования комплексов нано- и субмикронных частиц производных хитозана с бактериями *Bacillus* spp. Среди различных климатических факторов, влияющих на продуктивность растений, наличие воды является наиболее важным [163]. Однако согласно метеорологическим наблюдениям за последние 20 лет среднегодовая температура на территории Европы повысилась на 1.1°C, тогда как количество осадков изменилось незначительно. Уменьшение и неравномерность выпадения осадков (большая часть которых, по прогнозам, будет приходиться на зимние месяцы) в сочетании с повышенным температурным режимом приводит к возникновению засушливых явлений, частота которых в обозримом будущем будет только нарастать.

Картофель, в настоящее время занимающий четвертое место в мире по значимости среди основных продовольственных культур после кукурузы, пшеницы и риса, и играющий все более важную роль в содействии обеспечению продовольственной безопасности в развивающихся странах, очень чувствителен при выращивании к недостатку влаги [164] из-за неглубокой корневой системы [165]. Снижение количества воды нарушает многие физиологические и биохимические процессы, вызывает осмотический и окислительный стресс, ионный дисбаланс. Продолжительный водный дефицит, особенно на критических этапах развития, не только ослабляет растения, но и делает их более уязвимыми для различных болезней. Кроме того, посевы картофеля страдают от многих вирусных заболеваний [166].

Известно, что ризобактерии могут значительно улучшить засухоустойчивость таких продовольственных культур, как кукуруза и картофель [167, 168]. Инокуляция бактериями *B. megaterium* BOFC15 растений арабидопсиса способствовала усилению роста при засухе и увеличению массы листовой пластинки [169]. Обработка растений клевера белого бактериями *B. subtilis* GB03 повышала засухоустойчивость в результате накопления в тканях осмопротекторов [170].

На растениях трахинии показано, что *B. subtilis* В26 вызывает увеличение активности метилтрансфераз, участвующих в поддержании и регуляции метилирования ДНК растения. Это предполагает участие бактерий рода *Bacillus* в регуляции устойчивости растений к засухе на эпигенетическом уровне [171].

Механизмы, посредством которых PGPB влияют на растения, многообразны и специфичны [172, 173]. Имеются данные о том, что ключевой мишенью, на который воздействуют PGPB, являются сами сигнальные пути растений, регулирующие развитие защитного ответа на воздействие стрессов [174]. В целом, устойчивость растения к тому или иному стрессовому фактору определяется комплексом развития защитных реакций, экспрессией множества генов, кодирующих защитные белки, и синтезом пула защитных соединений. Предполагается, что транскрипционные факторы, контролирующие транскрипцию генов в ответ на биотические стрессы и засуху, входят в одну группу [175].

Таким образом, анализ литературных данных о механизмах, лежащих в основе защитных функций бактерий *Bacillus* spp., позволяет говорить о возможности расширения способов и форм их применения в комбинации с различными соединениями, способствующими усилению защитного эффекта для растения [109, 176]. Перспективным может стать использование *B. subtilis* в композициях с модифицированным хитозаном, иммуностимулирующее действие которого на растения хорошо изучены [14, 130, 139, 148, 149].

Выявление физиологических и молекулярных механизмов индуцированной комплексом нано- и субмикронных частиц производных хитозана с бактериями *Bacillus* spp. устойчивости растений может служить научным обоснованием для создания новых экологически безопасных биопестицидов с иммуностимулирующим действием, что позволит внести существенный вклад в формирование стратегии защиты продовольственных культур в быстро изменяющихся климатических условиях, способствовать формированию конкурентоспособного на мировом рынке и экологически безопасного производства сельхозпродуктов, необходимых для поддержания высокого уровня продовольственной безопасности, обеспечения полноценного питания и здорового образа жизни населения при сохранении плодородия почв.

Работа выполнена в рамках научного проекта при поддержке гранта РНФ № 23-16-00139.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kumawat K.C., Razdan N., Saharan K. // Microbiology Research. 2022. V. 254. A. 126901. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126901>
2. Hassani M.A., Durán P., Hacquard S. // Microbiome. 2018. V. 6. P. 58. <https://doi.org/10.1016/s40168-018-0445-0>
3. Pinski A., Betekhtin A., Hupert-Kocurek K., Mur L.A.J., Hasterok R. // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. № 8. P. 1947–1961. <https://doi.org/10.3390/ijms20081947>
4. Delaux P.M., Schornack S. // Science. 2021. V. 19. № 371. 6531:eaba6605. <https://doi.org/10.1126/science.aba6605>
5. Maksimov I.V., Sorokan A.V., Burkhanova G.F., Veselova S.V., Alekseev V.Yu., Shein M.Yu. et al. // Plants. 2019. V. 8. № 12. P. 575. <https://doi.org/10.3390/plants8120575>
6. Чеботарь В.К., Щербаков А.В., Щербакова Е.Н., Масленникова С.Н., Заплаткин А.Н., Мальфанова Н.В. // Сельскохозяйственная биология. 2015. Т. 50. № 5. С. 648–654.
7. Ibuki T., Iwasawa S., Lian A.A., Lye P.Y., Maruta R., Asano S.-I., Kotani E., Mori H. // Biol. Open. 2022. V. 11. № 9. bio059363. <https://doi.org/10.1242/bio.059363>
8. Srinivasan K., Mathivanan N. // Biological Control. 2009. V. 51. P. 395–402.
9. Le Cocq K., Gurr S.J., Hirsch P.R., Mauchline T.H. // Mol. Plant Pathol. 2017. V. 18. P. 469–473. <https://doi.org/10.1111/mpp.12483>
10. Mishra S., Shivanandappa K., Krishnaraj J., Prem S. // AJCS. 2014. V. 8. № 3. P. 347–355. <https://doi.org/10.1177/2329488414525399>
11. Firmansyah D., Widodo Hidayat S.H. // Asian J. Plant Pathol. 2017. V. 11. P. 148–155.
12. Павлюшин В.А., Тютерев С.Л., Попова Э.В., Новикова И.И., Быкова Г.А., Домнина Н.С. // Биотехнология. 2010. № 4. С. 69–80.
13. Amine R., Tarek C., Hassane E., Noureddine E.H., Khadija O. // Molecules. 2021. V. 26. P. 1117. <https://doi.org/10.3390/molecules26041117>
14. Варламов В.П., Ильина А.В., Шагдарова Б.Ц., Луньков А.П., Мысякина И.С. // Успехи биологической химии. 2020. Т. 60. С. 317–368.
15. Nedved E.L., Kalatskaja J.N., Ovchinnikov I.A., Rybinskaya E.I., Kraskouski A.N., Nikalaichuk V.V. et al. // Appl. Biochem. Microbiol. 2022. V. 58. № 1. P. 69–76. <https://doi.org/10.1134/S0003683822010069>
16. Marrone P.G. // Pest Manag Sci. 2023. <https://doi.org/10.1002/ps.7403>
17. Максимов И.В., Веселова С.В., Нужная Т.В., Сарварова Е.Р., Хайруллин Р.М. // Физиология растений. 2015. Т. 62. № 6. С. 763–775.
18. Egamberdieva D., Wirth S.J., Shurigin V.V., Hashem A., Abd Allah E.F. // Front. Microbiol. 2017. V. 8. P. 1887. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01887>
19. Мелентьев А.И. Аэробные спорообразующие бактерии *Bacillus* Cohn в агроэкосистемах. М.: Наука, 2007. 148 с.
20. Монастырский О.А. // Защита и карантин растений. 2008. № 12. С. 41–44.
21. Драгвозов И.В. // Микробиол. журн. 2013. Т. 75. № 3. С. 41–46.
22. Курамшина З.М., Смирнова Ю.В., Хайруллин Р.М. // Физиология растений. 2016. Т. 63. № 5. С. 1–9. <https://doi.org/10.7868/S0015330316050080>
23. Verma P., Yadav A.N., Kumar V., Singh D.P., Saxena A.K. In: Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives. /Eds. D.P. Singh, H.B. Singh, R. Pra-

- bha. Singapore: Springer, 2017. P. 543.
https://doi.org/10.1007/978-981-10-6593-4_22
24. *Shafi O., Tian H., Ji M.* // *Biotechnol.* 2017. № 31. P. 446–459.
<https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1286950>
 25. *Lastochkina O., Seifikalhor M., Aliniaiefard S., Baymiev A., Pusenkova L., Garipova S., Kulabuhova D., Maksimov I.* // *Plants.* 2019. V. 8. A. 97.
<https://doi.org/10.3390/plants8040097>
 26. *Veselova S.V., Nuzhnaya T.V., Maksimov I.V.* *Jasmonic Acid: Biosynthesis, Functions and Role in Plant Development.* Series Plant Science Research and Practices USA: Nova Sci. Publishers, 2015. P. 33–66.
 27. *Sorokan A., Cherepanova E., Burkhanova G., Veselova S., Rumyantsev S., Alekseev V. et al.* // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. 569457.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.569457>
 28. *Lee Y.P., Kim S.H., Bang J.W., Lee H.S., Kwak S.S., Kwon S.Y.* // *Plant Cell Reports.* 2017. V. 26. № 5 P. 591–598.
<https://doi.org/10.1007/s00299-006-0253-z>
 29. *Zehnder G.W., Yao C., Murphy J.F., Sikora E.J., Klopper J.W.* // *Biol Control.* 2000. V. 45. P. 127–137.
<https://doi.org/10.1023/A:1009923702103>
 30. *Yang Y.S., Zhou J.T., Lu H., Yuan Y.L., Zhao L.H.* // *Environ. Technol.* 2012. V. 33. P. 2603–2609.
<https://doi.org/10.1080/09593330.2012.672473>
 31. *Lastochkina O., Pusenkova L., Yuldashev R., Babaev M., Garipova S., Blagova D., Khairullin R., Aliniaiefard S.* // *Plant Physiology. Biochemistry.* 2017. № 121. P. 80–88.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.10.020>
 32. *Хайруллин Р.М.* // *Вестник ОГУ.* 2007. № 2. С. 129–134.
 33. *Shternshis M.V., Belyaev A.A., Shpatova T.V., Lelyak A.A.* // *Contemporary Problems of Ecology.* 2015. V. 8. № 3. P. 390–396.
<https://doi.org/10.1134/S1995425515030130>
 34. *Kasim W.A., Gaafar R.M., Abou-Ali R.M.* // *Annals of Agricultural Science.* 2016. V. 61. № 2. P. 217–227.
<https://doi.org/10.1016/j.aos.2016.07.003>
 35. *Seifikalhor M.S., Seif M., Aliniaiefard S., Asayesh E.* // *Acta Hort.* 2018. V. 1227. 59.
 36. *Turan M., Ekinci M., Yldrm E., Gunes A., Karagoz K., Kotan R., Dursun A.* // *Turkish Journal of Agriculture and Forestry.* 2014. № 38. P. 327–333.
<https://doi.org/10.3906/tar-1308-62>
 37. *Blake C., Nordgaard Christensen M., Kovacs A.T.* // *MPMI.* 2021. V. 34. № 1. P. 15–25.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-08-20-0225-CR>
 38. *Сидорова Т.М., Асатурова А.М., Хомяк А.И.* // *Сельскохозяйственная биология.* 2018. Т. 53. № 1. С. 29–37.
 39. *Максимов И.В., Черепанова Е.А.* // *Биомика.* 2018. Т. 10. № 1. С. 57–61.
<https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmcs.2018-13>
 40. *Surette M.A., Sturz A.V., Lada R.R., Nowak J.* // *Plant Soil.* 2003. V. 253. P. 381.
<https://doi.org/10.1023/A:1024835208421>
 41. *Chen F., Wang M., Zheng Y., Luo J., Yang X., Wang X.* // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2010. V. 26. P. 675–684.
<https://doi.org/10.1007/s11274-009-0222-0>
 42. *Subramani A.K., Raval R., Sundareshan S., Sivasengh R., Raval K.* // *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2022. V. 52. № 10. P. 1160–1172.
<https://doi.org/10.1080/10826068.2022.2033994>
 43. *Хайруллин Р.М., Бурханова Г.Ф., Сорокань А.В., Сарварова Е.Р., Веселова С.В., Черепанова Е.А. и др.* // *Теоретическая и прикладная экология.* 2019. № 4. С. 130–135.
<https://doi.org/10.25750/1995-4301-2019-4-130-135>
 44. *Бурханова Г.Ф., Сорокань А.В., Черепанова Е.А., Сарварова Е.Р., Хайруллин Р.М., Максимов И.В.* // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2019. Т. 23. № 7. С. 873–878.
<https://doi.org/10.18699/VJ19.561>
 45. *Максимов И.В., Сингх Б.П., Черепанова Е.А., Бурханова Г.Ф., Хайруллин Р.М.* // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2020. Т. 56. № 1. С. 19–34.
<https://doi.org/10.31857/S0555109920010134>
 46. *Choudhary D.K., Johri B.N.* // *Microbiol. Res.* 2009. V. 164. P. 493–513.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2008.08.007>
 47. *Kumar S., Chauhan P.S., Agrawal L., Raj R., Srivastava A., Gupta S.* // *PLoS ONE.* 2016. V. 11. № 3. e0149980.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149980>
 48. *Niu D.D., Liu H.X., Jiang C.H., Wang Y.P., Wang Q.Y., Jin H.L., Guo J.H.* // *Mol. Plant Microbe. In.* 2011. V. 24. № 5. P. 533–542.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-09-10-0213>
 49. *Gonzalez-Gallegos E., Laredo-Alcala E., Ascacio-Valdes J., de Rodriguez D., Hernandez-Castillo F.* // *American Journal of Plant Sciences.* 2015. V. 6. № 11. P. 1785–1791.
<https://doi.org/10.4236/ajps.2015.611179>
 50. *Yu Y., Gui Y., Li Z., Jiang C., Guo J., Niu D.* // *Plants (Basel).* 2022. V. 11. № 3. P. 386.
<https://doi.org/10.3390/plants11030386>
 51. *Conrath U., Beckers G.J.M., Flors V., García-Agustín P., Jakab G., Mauch F. et al.* // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2006. V. 19. P. 1062–1071.
 52. *Ross A.F.* // *Virology.* 1961. V. 14. P. 340–358.
 53. *Glazebrook J.* // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2005. V. 43. P. 205.
<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923>
 54. *Тарчевский И.А., Яковлева В.Г., Егорова А.М.* // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2010. Т. 46. № 3. С. 263–275.
 55. *Gimenez-Ibanez S., Solano R.* // *Frontiers in Plant Science.* 2013. V. 4. P. 72.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00072>
 56. *Durrant W.E., Dong X.* // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2004. V. 42. P. 185–209
<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421>
 57. *Wang M., Xue J., Ma J., Feng X., Ying H., Xu H.* // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. P. 942.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00942>

58. González-López M.D.C., Jijón-Moreno S., Dautt-Castro M., Ovando-Vázquez C., Ziv T., Horwitz B.A., Casas-Flores S. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 6804.
59. Bode V., Huber R. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2000. V. 1477. № 1–2. P. 241–252.
[https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00276-9](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00276-9)
60. Домаш В.И., Шарнио Т.П., Забрейко С.А., Сосновская Т.Ф. // *Биоорг. химия.* 2008. Т. 34. № 3. С. 353–357.
61. Мосолов В.В., Валуева Т.А. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2011. Т. 47. № 5. С. 501–507.
62. Яруллина Л.Г., Касимова Р.И., Максимов И.В. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2016. Т. 52. № 5. С. 531–537.
<https://doi.org/10.7868/S0555109916050184>
63. Канделинская О.Л., Грищенко Е.Р., Домаш В.И., Топунов А.Ф. // *Агрохимия.* 2008. № 9. С. 45–49.
64. Бурханова Г.Ф., Веселова С.В., Сорокань А.В., Благова Д.К., Нужная Т.В., Максимов И.В. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2017. Т. 53. № 3. С. 308–331.
<https://doi.org/10.7868/S0555109917030047>
65. De Meyer G., Capieau K., Audenaert K., Buchala A., Métraux J.P., Höfte M. // *Mol. Plant Microbe Interact.* 1999. V. 12. P. 450–458.
66. Brosche M., Blomster T., Salojärvi J., Cui F., Sipari N., Leppala J., et al. // *PLoS Genet.* 2014. V. 10. № 2. e1004112.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004112>
67. Suzuki N., Miller G., Sejima H., Harper J., Mittler R. // *J. Exp. Bot.* 2012. V. 64. P. 253–263.
<https://doi.org/10.1093/jxb/ers335>
68. Bordiec S., Paquis S., Lacroix H., Dhondt S., Barka E., Kauffmann A. et al. // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. P. 595–603.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erq291>
69. Pfannschmidt T., Brautigam K., Wagner R., Dietzel L., Schroter Y., Steiner S., Nykytenko A. // *Ann. Bot.* 2009. V. 103. P. 599–607.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcn081>
70. Qi J., Song C.P., Wang B., Zhou J., Kangasjärvi J., Zhu J.K., Gong Z. // *Journal of Integrative Plant Biology.* 2018. V. 60. № 9. P. 805–826.
<https://doi.org/10.1111/jipb.12654>
71. Tondo M.L., de Pedro-Jové R., Vandecaveye A., Piskulic L., Orellano E.G., Valls M. // *Front. Plant Sci.* 2020. V. 11. A. 1156.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01156>
72. Трошина Н.Б., Сурина О.Б., Черепанова Е.А., Яруллина Л.Г. // *Микология и фитопатология.* 2010. V. 44. № 3. P. 273–279.
73. Alquéres S., Meneses C., Rouws L., Rothballer M., Baldani I., Schmid M., Hartmann A. // *Molecular Plant-Microbe Interaction.* 2013. V. 8. P. 937–945.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-12-12-0286-R>
74. Газарян И.Г., Хушпульян Д.М., Тишков В.И. // *Успехи биологической химии.* 2006. Т. 46. С. 303–322.
75. O'Brien J.A., Daudi A., Finch P., Butt V.S., Whitelegge J.P., Souda P., Ausubel F.M., Bolwell G.P. // *Plant Physiol.* 2012. V. 158. № 4. P. 2013–2027.
76. Almagro L., Gomez Ros V., Belchi-Navarro S., Bru R., Ros Barcelo A., Pedreno M.A. // *J. Exp. Botany.* 2009. V. 60. P. 377–390.
77. Mittler R. // *Trends in Plant Science.* 2002. V. 7. P. 406–410.
[https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)
78. Прадедова Е.В., Ишеева О.Д., Сяляев Р.К. // *Физиология растений.* 2011. Т. 58. № 1. С. 40–48.
<https://doi.org/10.17076/eb787>
79. Bakalova S., Nikolova A., Nedeva D. // *Bulg. J. Plant Physiol.* 2004. V. 30. № 1–2. P. 64–77.
80. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В., Ястреб Т.О., Мусатенко Л.И. // *Физиология и биохимия культ. растений.* 2010. Т. 42. № 3. С. 210–217.
81. Рахманкулова З.Ф., Федяев В.В., Рахматуллина С.Р. // *Физиология растений.* 2010. Т. 57. № 6. С. 835–840.
82. Тарчевский И.А. *Сигнальные системы клеток растений.* М.: Наука, 2002. 294 с.
83. Shao H.B., Chu L.Y., Jaleel C.A., Zhao C.X. // *C R Biol.* 2008. V. 331. № 3. P. 215–225.
<https://doi.org/10.1016/j.crvi.2008.01.002>
84. Guan L.M., Scandalios J.G. // *Free Radic. Biol. Med.* 2000. V. 28. № 8. P. 1182–1190.
[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00212-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00212-4)
85. Zandi P., Schnug E. // *Biology.* 2022. V. 11. P. 155.
<https://doi.org/10.3390/biology11020155>
86. Maksimov I.V., Blagova D.K., Veselova S.V., Sorokan A.V., Burkhanova G.F., Cherepanova E.A. et al. // *Biological Control.* 2020. V. 144.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104242>
87. Valenzuela-Soto J., Estrada-Hernández M., Ibarra-Laclette E., Délano-Frier J. // *Planta.* 2010. V. 231. № 2. P. 397–410.
<https://doi.org/10.1007/s00425-009-1061-9>
88. Wang S., Wu H., Qiao J., Ma L., Liu J., Xia Y., Gao X. // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2009. V. 19. № 10. P. 1250–1258.
89. Su P., Tan X., Li C., Zhang D., Cheng J., Zhang S et al. // *Microb. Biotechnol.* 2017. V. 10. № 3. P. 612–624.
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.12704>
90. Beris D., Theologidis I., Skandalis N., Vassilakos N. // *Scientific Reports.* 2018. V. 8. Article number: 10320.
91. Waadt R., Sella C.A., Hsu P.K., Takahashi Y., Munemasa S., Schroeder J.I. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2022. V. 23. № 10. P. 680–694.
<https://doi.org/10.1038/s41580-022-00479-6>
92. Goswami M., Deka S. // *Pedosphere.* 2020. V. 30. № 1. P. 40–61.
[https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(19\)60839-8](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(19)60839-8)
93. Pinedo T., Ledger M., Greve M.J. // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 6. P. 1–17.
94. Niu S.Q., Li H.R., Pare P.W., Aziz M., Wang S.M., Shi-Induced H.Z. // *Plant Soil.* 2016. V. 407. P. 217–230.
95. Ansari F.A., Ahmad I., Pichtel J. // *Agric. Ecosyst. Environ. Appl. Soil Ecol.* 2019. V. 3. P. 45–54.

96. *Kadmiri I.-M., Chaouqui L., Azaroual S.E., Sijilmassi B., Yaakoubi K., Wahb I.* // Arab. J. Sci. Eng. 2018. V. 43. P. 3403–3415.
97. *Мерзаева О.В., Широких И.Г.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 1. С. 51–57.
98. *Berg G.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 84. P. 11–18.
<https://doi.org/10.1007/s00253-009-2092-7>
99. *Arkhipova T.N., Veselov S.U., Melentiev A.I., Kudoyarova G.R.* // Plant Soil. 2005. V. 272. № 5. P. 201–209.
100. *Pérez-Flores P., Valencia-Cantero E., Altamirano-Hernández J., Pelagio-Flores R., López-Bucio J., García-Juárez P., Macías-Rodríguez L.* // Protoplasma. 2017. V. 254. № 6. P. 2201–2213.
101. *Shao J., Li S., Zhang N., Cui X., Zhou X., Zhang G., Shen Q., Zhang R.* // Microb. Cell Factories. 2015. V. 14. P. 130–141.
102. *Park Y.G., Mun B.G., Kang S.M., Hussain A., Shahzad R., Seo C.W. et al.* // PLoS One. 2017. V. 12. № 3. e0173203.
103. *Sadeghi A., Karimi E., Dahaji P.A., Javid M.G., Dalvand Y., Askari H.* // World J. Microbiol. Biotechnol. 2012. V. 28. P. 1503–1509.
<https://doi.org/10.1007/s11274-011-0952-7>
104. *Kang S.M., Shahzad R., Bilal S., Khan A.L., Park Y.G., Lee K.E.* // BMC Microbiol. 2019. V. 19. № 80.
<https://doi.org/10.1186/s12866-019-1450-6>
105. *Karadeniz A., Topcuoğlu Ş.F., Inan S.* // World J. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 22. P. 1061–1064.
<https://doi.org/10.1007/s11274-005-4561-1>
106. *Salomon M.V., Bottini R., de Souza Filho G.A., Cohen A.C., Moreno D., Gil M.* // Physiol. Plant. 2014. V. 151. P. 359–374.
<https://doi.org/10.1111/ppl.12117>
107. *Bottini R., Cassán F., Piccoli P.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2004. V. 65. P. 497–503.
108. *Grichko V.P., Glick B.R.* // Plant Physiol. Biochem. 2001. V. 39. № 1. P. 11–17.
[https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)01212-2](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)01212-2)
109. *Barkai-Golan R.* Postharvest Diseases of Fruit and Vegetables. Development and Control. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2001.
110. *Shakirova F.M., Avalbaev A.M., Bezrukova M.V., Fatkhutdinova R.A., Maslennikova D.R., Yuldashev R.A., Allagulova C.R., Lastochkina O.V.* In: Phytohormones and Abiotic Stress Tolerance in Plants. /Eds. N.A. Khan, R. Nazar, N. Iqbal, N.A. Anjum. Berlin, Heidelberg: Springer, 2012. P. 185–228.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-25829-9_9
111. *Kalatskaja J.N., Baliuk N.V., Rybinskaya K.I., Herasimovich K.M., Yalousskaya N.A., Yarullina L.G., Tsvetkov V.O.* // Int. J. Plant Biol. 2023. V. 14. P. 312–328.
<https://doi.org/10.3390/ijpb14010026>
112. *Яруллина Л.Г., Цветков В.О., Хабибуллина В.О., Черепанова Е.А., Бурханова Г.Ф., Заикина Е.А., Калацкая Ж.Н.* // Физиология растений. 2022. Т. 69. № 4. С. 438–448.
<https://doi.org/10.31857/S0015330322040212>
113. *Li K., Xing R., Liu S., Li P.* // J. Agric. Food Chem. 2020. V. 68. № 44. P. 12203–12211.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c05316>
114. *Тютерева С.Л.* // Вестник защиты растений. 2015. Т. 1. № 83. С. 3–13.
115. *Jia X., Rajib M., Yin H.* // Curr. Pharm. Des. 2020. V. 26. № 29. P. 3508–3521.
<https://doi.org/10.2174/1381612826666200617165915>
116. *Chakraborty M., Hasanuzzaman M., Rahman M., Khan Md., Bhowmik P., Mahmud N.U., Tanveer M., Islam T.* // Agriculture. 2020. V. 10. № 12. P. 624.
<https://doi.org/10.3390/agriculture10120624>
117. *Zhao X., Wang M., Wang W., Liu Q., Li J., Yin H.* In: /Ed. L. Zhao, Oligosaccharides of Chitin and Chitosan. Singapore: Springer, 2019. 858 p.
https://doi.org/10.1007/978-981-13-9402-7_10
118. *Guan Z., Feng Q.* // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. 6761.
<https://doi.org/10.3390/ijms23126761>
119. *Куликов С.Н., Тюрин Ю.А., Хайруллин Р.З.* // Казанский мед. ж. 2010. Т. 91. № 5. С. 656–660.
120. *Chirkov S.N.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2002. V. 38. № 1. P. 1–8.
121. *Попова Э.В., Домнина Н.С., Коваленко Н.М., Борисова Е.А., Колесников Л.Е., Тютерева С.Л.* // Вестник защиты растений. 2017. Т. 3. № 93. С. 28–33.
122. *Riseh R.S., Hassanisaadi M., Vatankhah M., Badaki S.A., Barka E.A.* // Int. J. Biol. Macromol. 2022. V. 220. P. 998–1009.
123. *Pospieszny H., Struszczyk H., Cajza M.* Chitin Enzymology. /Ed. R.A.A. Muzzarelli. Ancona, Italy: Atec Edizioni, 1996. V. 2. P. 385–389.
124. *Куликов С.Н., Чирков С.Н., Ильина А.В., Лопатин С.А., Варламов В.П.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 2. С. 224–228.
125. *Jia X., Meng Q., Zeng H., Wang W., Yin H.* // Scientific Reports. 2016. V. 6. Article 26144.
<https://doi.org/10.1038/srep26144>
126. *Гриц А.Н., Карасева Е.Н., Макарова Т.Б., Рыбинская Е.И., Ольшаникова А.Л., Янчевская Т.Г. и др.* // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биол. наук. 2021. Т. 66. № 2. С. 159–168.
127. *Pirniyazov K.K., Tikhonov V.E., Rashidova S.S.* // International Journal of Modern Agriculture. 2021 V. 10. № 2. P. 1244–1262
128. *Баданова Е.Г., Давлетбаев И.М., Сироткин А.С.* // Вестник технологического университета. 2016. Т. 19. № 16. С. 89–95.
129. *Варламов В.П., Албулов А.И., Фролова М.А., Гринь А.В., Мысякина И.С.* // Экобиотех. 2019. Т. 2. № 4. С. 529–532.
130. *Новикова И.И., Попова Э.В., Краснобаева И.Л., Коваленко Н.М.* // Сельскохозяйственная биология. 2021. Т. 56. № 3. С. 511–522.
<https://doi.org/10.15389/agrobiology.2021.3.511>
131. *Kolesnikov L.E., Popova E.V., Novikova I.I., Priyatkin N.S., Arkhipov M.V., Kolesnikova Yu.R. et al.* // Agricultural Biology. 2019. V. 54. № 5. P. 1024–1040.
<https://doi.org/10.15389/agrobiology.2019.5.1024>

132. Краснобаева И.Л., Коваленко Н.М., Попова Э.В. // Вестник защиты растений. 2020. Т. 103. № 4. С. 233–240.
<https://doi.org/10.31993/2308-6459-2020-103-4-13272>
133. Rajendran L., Schneider A., Schlechtingen G., Weidlich S., Ries J., Braxmeier T. et al. // Science. 2008. V. 320. № 5875. P. 520–523.
<https://doi.org/10.1126/science.1156609>
134. Ortiz-Rodríguez T., De La Fuente-Salcido N., Bideshi D.K., Salcedo-Hernández R., Barboza-Corona J.E. // Lett. Appl. Microbiol. 2010. V. 51. P. 184–190.
135. Saharan V., Pal A. Chitosan Based Nanomaterials in Plant Growth and Protection. New Delhi, India: Springer, 2016. P. 33–41.
136. Актуганов Г.Э., Мелентьев А.И., Варламов В.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2019. Т. 55. № 4. С. 315–337.
137. Miljakovic D., Marinkovic J., Balešević-Tubić S. // Microorganisms. 2020. V. 8. 1037.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8071037>
138. Аферов А.А. // Агрехимический вестник. 2017. № 6. С. 38–42.
139. Orhan I., Omar I., Demirci B., Siddiqui H. // Pharmaceutical Biology. 2010. V. 48. № 1. P. 10–16.
<https://doi.org/10.3109/13880200903029332>
140. Kim Y., Narayanan S., Chang K.O. // Antiviral Res. 2010. V. 88. № 2. P. 227–235.
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2010.08.016>
141. Li T., Huang Y., Xu Z.S., Wang F., Xiong A.S. // BMC Plant Biol. 2019. V. 2. № 19 (1). P. 173.
<https://doi.org/10.1186/s12870-019-1784-0>
142. Klein A., Keyster M., Ludidi N. // Acta Physiologia Plantarum. 2013. V. 35. № 10. P. 3059–3066.
<https://doi.org/10.1007/s11738-013-1339-1>
143. Пузина Т.И., Макеева И.Ю. // Агрехимия. 2015. № 6. С. 63–69.
<https://doi.org/10.15217/48484>
144. Wan Y.Y., Zhang Y., Zhang L., Zhou Z.Q., Li X., Shi Q., Wang X., Bai J. // Acta Physiologiae Plantarum. 2015. V. 37. № 61. P. 1706.
<https://doi.org/10.1007/s11738-014-1706-6>
145. Plotnikova L.Y., Pozherukova V.Y., Mitrofanova O.P., Degtyarev A.I. // Appl Biochem Microbiol. 2016. V. 52. P. 61–70.
<https://doi.org/10.1134/S0003683816010099>
146. Упадышев М.Т., Метлицкая К.В., Петрова А.Д., Донецких В.И. // Аграрная наука. 2019. № 3. С. 143–146.
<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2019-326-3-143-146>
147. Вакулин К.Н. // Защита и карантин растений. 2006. № 11. С. 28.
148. Woranuch S., Yoksan R. // Carbohydrate Polymers. 2013. V. 96. P. 495–502.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.006>
149. Liu J., Lu J.F., Kan J., Tang Y.Q., Jin C.H. // Int. J. Biol. Macromol. 2013. V. 62. P. 85–93.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.08.040>
150. Ilyasoglu H., Guo Z. // Food Bioscience. 2019. V. 29. P. 118–125.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.04.007>
151. Nikalaichuk V., Hileuskaya K., Kraskouski A., Kulikouskaya V., Nedved H., Kalatskaja J. et al. // J. Appl. Polym. Sci. 2021. V. 139. № 14. 51884.
<https://doi.org/10.1002/app.51884>
152. Elmer W., White J. // Annu. Rev. Phytopathol. 2018. V. 56. P. 111–133.
<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-050108>
153. Worrall E.A., Hamid A., Mody K.T., Mitter N., Pappu H.R. // Agronomy. 2018. V. 8. № 285.
<https://doi.org/10.3390/agronomy8120285>
154. Dutta P., Kumari A., Mahanta M., Biswas K.K., Dudkiewicz A., Thakuria D. et al // Front. Microbiol. 2022. V. 13. 935193.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.935193>
155. Kumar A., Choudhary A., Kaur H., Guha S., Mehta S., Husen A. // Chemosphere. 2022. V. 295. 133798.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133798>
156. Derbalah A., Elsharkawy M.M., Hamza A., El-Shaer A. // Pestic. Biochem. Physiol. 2019. V. 157. P. 230–236.
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.03.018>
157. Elsharkaway M., Derbalah A. // Pest Management Science. 2018. V. 75. № 3.
<https://doi.org/10.1002/ps.5185>
158. Aslani F., Bagheri S., Julkapli N.M., Juraimi A.S., Hashemi Golestan F.S., Baghdadi A. // Sci. World J. 2014. V. 2014. P. 28.
<https://doi.org/10.1155/2014/641759>
159. Sosan A., Svistunenko D., Straltsova D., Tsiurkina K., Anderson D., Sokolik A., Colbeck I., Demidchik V. // Plant Journal. 2016. V. 85. P. 245–257.
<https://doi.org/10.1111/tpj.13105>
160. Венжик Ю.В., Мошков И.Е., Дыкман Л.А. // Известия РАН. Серия биологическая. 2021. № 2. С. 137–152.
161. Sharma S.S., Dietz K.-J. // Trends Plant Sci. 2009. V. 14. P. 43–50.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.10.007>
162. Siripattanakul-Ratpukdi S., Furrhacker M. // Water Air Soil Pollut. 2014. V. 225. P. 1939.
<https://doi.org/10.1007/s11270-014-1939-4>
163. Vurukonda S.S.K.P., Vardharajula S., Shrivastava M., Skz A. // Microbiological Research. 2016. V. 184. P. 13–24.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.003>
164. Пузанский П.К., Емельянов В.В., Шишова М.Ф. // Сельскохозяйственная биология. 2018. Т. 53. № 1. С. 15–28.
<https://doi.org/10.15389/agrobiol.2018.1.15rus>
165. Hamooh B.T., Sattar F.A., Wellman G., Mousa M.A.A. // Plants. 2021. V. 10. № 1. P. 98.
<https://doi.org/10.3390/plants10010098>
166. Jones R.A.C. // Plants. 2021. V. 10. P. 233.
<https://doi.org/10.3390/plants10020233>
167. Moreno-Galvan A., Romero-Perdomo F.A., Estrada-Bonilla G., Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses,

- Bonilla R.R.* // *Microorganisms*. 2020. V. 8. P. 823.
https://doi.org/10.3390/microorganisms8060823
168. *Batool T., Ali S., Seleiman M., Naveed N., Ali A., Ahmed K. et al.* // *Scientific Reports*. 2020. V. 10. P. 16975.
https://doi.org/10.1038/s41598-020-73489-z
169. *Zhou C., Guo J.S., Zhu L., Xiao X., Xie Y., Zhu J., Ma Z.Y., Wang J.F.* // *Plant Physiol. Biochem.* 2016. V. 105. P. 162–173.
170. *Zhang J.L., Shi H.Z.* // *Photosynth.* 2013. V. 115. № 1. P. 1–22.
171. *Gagné-Bourque F., Mayer B.F., Charron J.-B., Vali H., Bertrand A., Jabaji S.* // *PLoS ONE*. 2015. V. 10. № 6. e0130456.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130456
172. *Rolli E., Marasco R., Vigani G., Ettoumi B., Mapelli F., Deangelis M.L. et al.* // *Environ. Microbiol.* 2015 V. 17. № 2. P. 316–331.
https://doi.org/10.1111/1462-2920.12439
173. *Pandey P., Irulappan V., Bagavathiannan M.V., Senthil-Kumar M.* // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8. № 537.
https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00537
174. *Веселова С.В., Бурханова Г.Ф., Нужная Т.В., Максимов И.В.* // *Вестник Башкирск. ун-та*. 2015. № 1. С. 308–315.
175. *Заикина Е.А., Румянцев С.Д., Сарварова Е.Р., Кулуев Б.Р.* // *Экологическая генетика*. 2019. Т. 17. № 3. С. 47–58.
https://doi.org/10.17816/ecogen17347-58
176. *Dokhanieh A., Aghdam M., Fard J., Hassanpour H.* // *Scientia Horticulturae*. 2013. V. 154. P. 31–36.
https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.01.025

Prospects to Improving Biological Activity of Agricultural Formulations Based on Bacteria of the Genus *Bacillus* and Chitosan Nanocomposites

L. G. Yarullina^{a, c, *}, J. N. Kalatskaja^b, E. A. Cherepanova^a, N. A. Yalousskaya^b, V. O. Tsvetkov^c,
I. A. Ovchinnikov^b, G. F. Burkhanova^a, K. I. Rybinskaya^b, A. V. Sorokan^a, K. M. Herasimovich^b,
E. A. Zaikina^a, V. V. Nikolaichuk^d, K. S. Hileuskaya^d, and I. S. Mardanshin^e

^a *Institute of Biochemistry and Genetics – a separate structural subdivision of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*

^b *Institute of Experimental Botany named after V.F. Kuprevich, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220072 Belarus*

^c *Ufa University of Science and Technology, Ufa, 450076 Russia*

^d *Institute of Chemistry of New Materials, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220072 Belarus*

^e *Bashkir Research Institute of Agriculture – a separate structural subdivision of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*

*e-mail: yarullina@bk.ru

The review examines the properties of endophytic bacteria of the genus *Bacillus* as objects of biocontrol, prospects to expand the spectrum of their protective action based on complexes with chitosan derivatives. The mechanisms of direct and indirect effects of bacteria on the protective potential of plants are described, the role of the pro-/antioxidant system in the formation of systemic protective reactions is analyzed. The immunostimulating properties of chitosan derivatives and its modifications with organic molecules and metal nanoparticles are analyzed. The prospects of using *Bacillus* spp. bacterial complexes with nano- and submicron particles of chitosan derivatives to expand the spectrum of protective action of new biofungicides and immunostimulants based on them are shown.

Keywords: bacteria of the genus *Bacillus*, chitosan, nanocomposites, phytopathogens, pro/antioxidant system, gene expression, PR proteins

УДК 546.172.6:661.982

ДЕЙСТВИЕ ПЕРОКСИНИТРИТА И ГИДРОПЕРОКСИДА *трет*-БУТИЛА НА ТИОЛОВЫЕ ЛИГАНДЫ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА

© 2023 г. И. С. Пугаченко¹, Э. И. Насыбуллина¹, О. В. Космачевская¹,
К. Б. Шумаев¹, А. Ф. Топунов¹, *

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

*e-mail: aftopunov@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.04.2023 г.

После доработки 21.04.2023 г.

Принята к публикации 28.04.2023 г.

Низкомолекулярные динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) с тиолсодержащими лигандами являются физиологической формой депонирования и транспорта оксида азота (NO) в организме, при этом ДНКЖ могут проявлять антиоксидантные и антирадикальные свойства. Показано, что ДНКЖ, содержащие в качестве лигандов цистеин, глутатион и липоевую кислоту, снижали скорость окисления дигидрорадамина пероксинитритом, образующимся при декомпозиции 3-морфолиносиднонимина. Тиоловые (сульфгидрильные) лиганды входят в состав ДНКЖ в форме тиолатанионов (R-S⁻), что защищает эти группы от окисления пероксинитритом. При использовании в качестве окислителя гидропероксида *трет*-бутила в низкой концентрации, защитное действие ДНКЖ на SH-группы в их составе наблюдалось для комплексов с липоевой кислотой (LA-ДНКЖ) и с глутатионом (GS-ДНКЖ). LA-ДНКЖ были более устойчивы к действию окислителей и более эффективными “ловушками” пероксинитрита, чем другие ДНКЖ. ДНКЖ, связанные с бычьим сывороточным альбумином, оказывали незначительное защитное действие на остаток цистеина при окислении пероксинитритом и гидропероксидом *трет*-бутила. Полученные результаты позволяют считать низкомолекулярные ДНКЖ с тиоловыми лигандами ловушками пероксинитрита и протекторами цистеиновых остатков в белках.

Ключевые слова: динитрозильные комплексы железа, тиолы, пероксид *трет*-бутила, пероксинитрит
DOI: 10.31857/S0555109923050148, **EDN:** NSHBED

Динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) являются физиологической формой депонирования и транспорта оксида азота (NO) в живых организмах [1, 2]. ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами (RS-ДНКЖ) характеризуются формулой $\{(RS^-)_2-Fe^+-(NO^+)_2\}$, и могут быть связаны как с низкомолекулярными соединениями, так и с белками. В качестве лигандов этих комплексов могут выступать такие тиолсодержащие соединения, как глутатион и цистеин [2].

В живых системах RS-ДНКЖ представляют собой “рабочую” форму эндогенного NO. Они оказывают мощное вазодилататорное и гипотензивное действие [3], протекторное действие при экспериментальном инфаркте миокарда [4], при геморрагическом шоке [5], вызывают повышение эластичности эритроцитов [6, 7], а также ускорение заживления кожных ран [8]. Многообразие положительных эффектов RS-ДНКЖ позволяет рассматривать их как основу для создания меди-

цинских препаратов с широкой терапевтической активностью. Уже разработан и прошел клинические испытания гипотензивный препарат “Оксаком”, основой которого является биядерный ДНКЖ с глутатионом [9, 10].

В нашей лаборатории проводятся исследования биохимических свойств глутатионовых ДНКЖ (GS-ДНКЖ). Показано, что они оказывают антиоксидантное действие на белковые и липидные системы при окислительном стрессе [11–15]. Благодаря этому свойству они оказывают также и цитопротекторное действие [4, 16–20]. В частности, GS-ДНКЖ в микромолярных концентрациях эффективно ингибируют лизис эритроцитов, индуцированный HOCl, и удаляют алкоксильные (RO[•]) и алкилпероксильные (ROO[•]) радикалы, образующиеся в реакции HOCl с гидропероксидом *трет*-бутила [20]. GS-ДНКЖ оказались более эффективными цитопротекторами и “перехватчиками” некоторых органических свободных

радикалов, чем восстановленный глутатион. В последнее время было показано, что ДНКЖ с глутатионовыми и цистеиновыми лигандами обладают противовирусным действием, в том числе и по отношению к COVID-19 [21]. Протекторное (регуляторное) действие ДНКЖ может быть обусловлено в том числе нейтральными молекулами NO, а цитотоксическое — ионами нитрозония (NO⁺), высвобождающимися из комплексов [22, 23].

Разнообразная биологическая активность RS-ДНКЖ обусловлена их способностью выступать в биосистемах в качестве доноров NO и NO⁺, которые являются универсальными регуляторами различных метаболических процессов. Включению этих малых сигнальных молекул в ДНКЖ обеспечивает их стабилизацию и транспорт внутри и вне клеток и тканей без самопроизвольного высвобождения. Также ДНКЖ позволяют избирательно передавать NO и NO⁺ на гем- и тиолсодержащие белки, тем самым влияя на метаболические процессы. RS-ДНКЖ также обеспечивают образование S-нитрозотиолов, являющихся важными медиаторами биологического действия эндогенного NO на тиолсодержащие белки и ферменты [24].

Низкомолекулярные тиолы (цистеин, глутатион и др.) в составе ДНКЖ также могут подвергаться действию окислителей, в результате чего комплексы разрушаются, высвобождая Fe²⁺. Это затрудняет использование лекарственных форм, содержащих ДНКЖ (препараты для инъекций, ингаляций и т.д.). Такие препараты в организме могут быстро разрушаться, не успев оказать нужного терапевтического действия.

Цель работы — изучение действия органической гидроперекиси — гидропероксида *трет*-бутила (*t*-BOOH) и пероксинитрита на окисление тиоловых лигандов, входящих в состав низкомолекулярных ДНКЖ (ДНКЖ с глутатионом, цистеином и липоевой кислотой) и белковых — ДНКЖ с бычьим сывороточным альбумином (БСА).

МЕТОДИКА

В работе были использованы следующие реактивы: N-ацетилцистеин (AcCys), липоевая кислота (LA), *t*-BOOH, 3-морфолиносиднонимин (SIN-1), дигидрородамин 123 (DHR123), HEPES, диметилсульфоксид (ДМСО), 2-амино-2-(гидроксиметил)-1,3-пропандиол (Трис), полиакриламид (ПАА), додецилсульфат Na (ДДС), дитиотреитол (ДТТ), бромфеноловый синий, глицин, глицерин, K₂HPO₄, K₂HPO₄, Na₂HPO₄, NaNO₂ — “Sigma-Aldrich” (США); 4-гидрокси-(2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-ил)оксил (4-гидрокси-ТЕМРО) — “Oxis” (США); 3Н-нафтол[2,1-*b*]пиран-5-карбоновая кислота (ThioGlo1) — “Calbiochem” (США); L-глутатион, БСА — “AppliChem” (Гер-

мания); изопропанол, H₂SO₄, H₂O₂, FeSO₄, MnO₂ — “Химмед” (Россия).

Синтез пероксинитрита и динитрозильных комплексов железа, содержащих различные лиганды. Пероксинитрит (ONOO⁻) синтезировали по методике, описанной в работе [25], быстро смешивая охлажденные на льду растворы 1.0 М NaNO₂ и 1.0 М H₂O₂ в 0.3 М серной кислоте, после чего добавляли равный объем 1.4 М NaOH. Избыток H₂O₂ удаляли, добавляя порошкообразный MnO₂ (~1 мг/мл), который затем отделяли фильтрованием. Концентрацию пероксинитрита определяли по характерной полосе поглощения при 302 нм ($\epsilon_{302} = 1.67 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$).

ДНКЖ, содержащие в качестве лигандов фосфатный анион (ДНКЖ-PO₄⁻), синтезировали как описано в работах [12, 26], пропуская в сосуде Тунберга газообразный NO через раствор FeSO₄ в 100 мМ K,Na-фосфатном буфере, pH 6.8.

ДНКЖ с N-ацетилцистеином (AcCys-ДНКЖ) и глутатионом (GS-ДНКЖ) синтезировали по следующей схеме. Сначала получали S-нитрозотиол, добавляя к раствору N-ацетилцистеина или глутатиона в 0.2 М HEPES (pH ~ 8.0) небольшой избыток NaNO₂ (1 : 1.5). Через 10 мин к раствору S-нитрозотиола добавляли FeSO₄ до конечной концентрации ~10.8 мМ и далее доводили pH смеси до 7.0 с помощью HEPES. Концентрация ДНКЖ по данным электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) была ~4.0 мМ. Молярное соотношение Fe : тиол в AcCys-ДНКЖ составляло 1 : 25, в GS-ДНКЖ — 1 : 10.

ДНКЖ с липоевой кислотой (LA-ДНКЖ) получали, смешивая 5 мМ раствор ДНКЖ-PO₄⁻ в 100 мМ K-фосфатном буфере (КФБ), pH 7.2, с 6.5 мМ раствором липоевой кислоты в изопропанол. Соотношение КФБ и изопропанола составляло 30 : 70 (%). Конечная концентрация LA-ДНКЖ — 1.5 мМ. Молярное соотношение Fe : тиол в LA-ДНКЖ = 1 : 3.

Альбуминовые ДНКЖ получали добавлением ДНКЖ-PO₄⁻, содержащих в качестве лигандов фосфатный анион, к 0.15 мМ раствору БСА в 50 мМ КФБ (pH 7.2) в молярном соотношении 1 : 1.5.

Концентрацию ДНКЖ рассчитывали по интегральной интенсивности сигнала ЭПР этих комплексов, используя в качестве стандарта спиновую метку 4-гидрокси-ТЕМРО. Препараты ДНКЖ хранили при -70°C.

Оптическая спектроскопия препаратов ДНКЖ. Спектры поглощения синтезированных препаратов ДНКЖ регистрировали на спектрофотометре Cary 300 (“VarianBio”, США) при комнатной температуре в кювете с длиной оптического пути 1 см при скорости сканирования 600 нм/мин. Перед

регистрацией ДНКЖ разбавляли 20 мМ КФБ (рН 7.2) до концентрации 20 мкМ.

Окисление дигидрородамина пероксинитритом. При распаде SIN-1 образуется пероксинитрит [27], который окисляет дигидрородамин в родамин. Накопление последнего регистрировали по оптическому поглощению при 500 нм. Перед экспериментом готовили 20 мМ растворы SIN-1 и DHR123 в ДМСО. Реакционная среда содержала 2.7 мМ DHR123 и 2.7 мМ SIN-1 в 20 мМ КФБ (рН 7.4). ДНКЖ вносили в реакционную смесь через 5 мин после начала реакции. Кинетику окисления DHR123 записывали в 1 мм кювете в течение 10 мин при комнатной температуре на спектрофотометре Cary 300 (“VarianBio”, США). Скорость окисления DHR123 оценивали по углу наклона линейного участка кинетической кривой.

Определение восстановленных тиоловых групп. Количественную оценку сульфгидрильных групп проводили с помощью тиол-специфичной флуоресцентной метки ThioGlo1. При добавлении к раствору белка ThioGlo1 образуется тиоловый аддукт с максимумом испускания флуоресценции при 500 нм при длине волны возбуждения 379 нм [28].

При измерении содержания SH-групп в образцах низкомолекулярных тиолов и ДНКЖ, образцованных с их участием, реакционная смесь содержала 0.08 мМ ДНКЖ (по Fe^{2+}) или эквивалентное количество тиола в 100 мМ КФБ (рН 7.4) и 0.8 мМ ONOO^- (1 : 10) или 2 мМ *t*-BOOH (1 : 25)/0.2 мМ (1 : 2.5).

Для анализа SH-групп образцы готовили следующим образом: к 5 мкл реакционной смеси добавляли 5 мкл 0.5 мМ раствора ThioGlo1 в ДМСО и инкубировали 3 мин. Затем полученный раствор (10 мкл) вносили в спектрофлуориметрическую кювету, содержащую 490 мкл 20 мМ КФБ (рН 7.4). Спектры флуоресценции записывали на спектрофлуориметре RF-5301 PC (“Shimadzu”, Япония) со средней скоростью сканирования и высокой чувствительностью (в соответствии с обозначениями на приборе). Флуоресценцию регистрировали при 379 нм. Ширина щели возбуждающего и испускаемого света составляла 3 нм.

Окислительная модификация альбумина. Окислительную модификацию БСА осуществляли добавлением к 0.15 мМ раствору белка пероксинитрита (ONOO^-) в молярном соотношении 1 : 10 или *t*-BOOH в молярном соотношении 1 : 25. По истечении 10 мин для ONOO^- и 20 мин для *t*-BOOH образцы БСА анализировали на количество SH-групп и высокомолекулярных агрегатов с помощью ДДС-электрофореза в ПААГ.

ДДС-электрофорез в ПААГ. Электрофорез проводили в блоках 7%-ного ПААГ размером $150 \times 150 \times 1$ мм по методу [29]. К растворам белка добавляли буфер для образцов в соотношении 1 : 1,

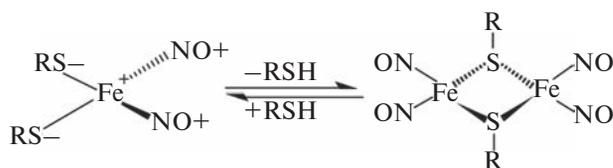


Рис. 1. Равновесие между моноядерными и биядерными ДНКЖ с тиоловыми лигандами: R – тиоловые лиганды: например, Cys – цистеин, @GSH – восстановленный глутатион, LA – липовая кислота.

прогревали в течение 5 мин при 95°C и наносили на гель. Буфер для образцов был приготовлен на основе 0.1 М Трис-НСI буфера (рН 6.8) с 4% ДДС, 0.2% бромфенолового синего и 20% глицерина. На гель наносили по 5 мкл раствора БСА. В качестве электродного буфера использовали 0.2 М Трис-глициновый буфер (рН 8.3), содержащий 0.1%-ный ДДС. Электрофорез проводили при 4°C и $I = 50$ мА, $U = 150$ В в течение 210 мин. Параметры электрофореза обеспечивались источником питания “Эльф-4” (“ДНК-Технологии”, Россия). Данные электрофореза представлены в виде столбчатых диаграмм высокомолекулярных форм белка, полученных при обработке электрофоретического изображения с использованием программы Image Lab Software (“Bio-Rad”, США).

Статистический анализ. Для каждого образца ДНКЖ и его тиольного лиганда измерения проводили не менее чем в трех повторностях. Статистическую обработку полученных данных проводили на основе расчета средних арифметических значений и их ошибок. Различия показателей определяли с использованием критерия Стьюдента. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Различия носят статистически достоверный характер, если $p < 0.05$. Статистическую обработку результатов выполняли с помощью Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика ДНКЖ с различными тиолсодержащими лигандами. С помощью метода оптической спектрофотометрии были исследованы низкомолекулярные ДНКЖ, содержащие в качестве тиоловых лигандов N-ацетилцистеин, восстановленный глутатион (GSH) и липовую кислоту. В водных растворах при нейтральном рН тиоловые ДНКЖ существуют в виде парамагнитных моноядерных (М-ДНКЖ) и диамагнитных биядерных комплексов (Б-ДНКЖ) (рис. 1), причем содержание последних составляло до 50% от общего пула ДНКЖ [2, 30].

Спектры оптического поглощения RS-ДНКЖ представлены на рис. 2. Анализ спектров позволил предположить, что используемые в работе

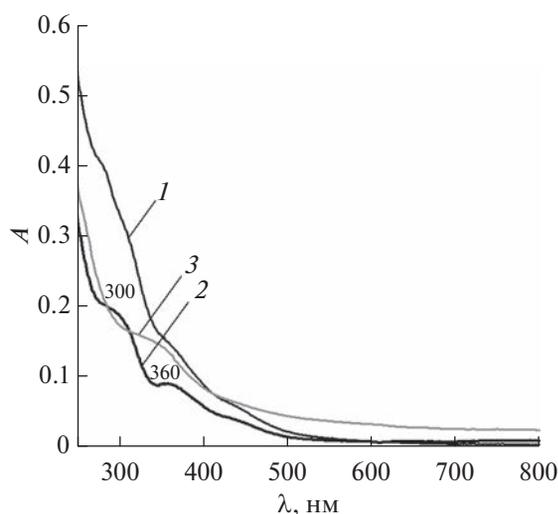


Рис. 2. Спектры оптического поглощения низкомолекулярных ДНКЖ с тиоловыми лигандами: 1 – AcCys-ДНКЖ, 2 – GS-ДНКЖ, 3 – LA-ДНКЖ.

растворы ДНКЖ действительно содержали существенную долю биядерной формы. На это указывало наличие на спектрах поглощения максимумов в области 310 и 360 нм, которые характерны для Б-ДНКЖ с глутатионом и цистеином [30]. Также было определено количество свободных тиолов в растворах ДНКЖ по флуоресценции с ThioGlo1. AcCys-ДНКЖ содержали 7.3% тиолов, GS-ДНКЖ – 11.1% и LA-ДНКЖ – 1.3%.

В живых системах существует равновесие между М-ДНКЖ и Б-ДНКЖ [2]. На это равновесие влияют редокс-условия, в первую очередь состояние глутатионовой системы. По мере окисления SH-групп М-ДНКЖ постепенно димеризуются с образованием Б-ДНКЖ, более устойчивых к окислению [2]. Если концентрация тиолов увеличивается, Б-ДНКЖ снова переходят в М-ДНКЖ. Интересно, что в тканях животных образующиеся RS-ДНКЖ в основном представлены в биядерной форме, в то время как в культуре клеток животных – в монойдерной. Причины этого до сих пор не ясны. Можно предположить, что в активно пролиферирующих клетках в культуре более высокая концентрация GSH и более высокий pH [31], что способствует смещению равновесия в сторону М-ДНКЖ.

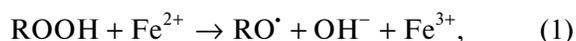
Окисление тиоловых групп, входящих в состав ДНКЖ и их лигандов. Чтобы понять, насколько тиоловые лиганды в составе ДНКЖ устойчивы к окислению, к растворам комплексов добавляли ONOO⁻ или *t*-BOOH в различных молярных соотношениях. Затем в течение 40 мин регистрировали кинетику окисления SH-групп с помощью флуоресценции тиолового аддукта с ThioGlo1. Пероксинитрит и *t*-BOOH были выбраны в качестве окислительных агентов, поскольку позволяли

моделировать нитрозативный и окислительный стресс. В условиях нитрозативного стресса, например при “дыхательном взрыве нейтрофилов”, ONOO⁻ образуется в реакции NO с супероксидным анион-радикалом [14, 15], тогда как *t*-BOOH является аналогом органических гидропероксидов, образующихся при перекисном окислении липидов.

В AcCys и GSH тиоловые группы практически полностью окислялись уже в первые 5 мин (рис. 3а и 3б, кривая 1). В случае, когда AcCys и GSH были включены в комплексы, количество детектируемых SH-групп к концу измерения достигало примерно половины от исходного уровня (рис. 3а и 3б, кривая 2). Несколько иная ситуация наблюдалась при окислении ДНКЖ, содержащих липоевую кислоту. Окисление тиолов в LA-ДНКЖ было на уровне 10%, в то время как в липоевой кислоте уровень окисления тиолов к концу измерения достигал 40% (рис. 3в).

Тиолсодержащие ДНКЖ и их лиганды по отношению к *t*-BOOH оказались менее реакционноспособны. Этот факт согласовывался с результатами работы [32], в которой показано, что реакция пероксида водорода с тиолсодержащими ДНКЖ протекала в 600 раз медленнее реакции с пероксинитритом. В экспериментах при молярном соотношении ДНКЖ : *t*-BOOH, равном 1 : 25, тиоловые лиганды в AcCys-ДНКЖ и GS-ДНКЖ окислялись практически так же, как и свободные в AcCys и GSH (рис. 4а, 4б). Причем в кинетике окисления GS-ДНКЖ и GSH значимых различий не было (рис. 4б). Однако при инкубации их с более низкой концентрацией органического гидропероксида (соотношение GS-ДНКЖ : *t*-BOOH = 1 : 2.5) удалось зарегистрировать защитное действие ДНКЖ в отношении тиоловых групп (рис. 4г). Добавление в реакционную смесь к GSH ионов Fe²⁺ в концентрации, эквивалентной их содержанию в ДНКЖ, усиливало окисление тиолов (рис. 4г, кривая 3). Этот факт служил еще одним доказательством того, что ионы Fe²⁺ в комплексе с NO не проявляют прооксидантное действие. Вместе с тем, окисление тиоловых лигандов в LA-ДНКЖ не происходило, в то время как свободная LA окислялась практически полностью (рис. 4в).

В реакционной среде, содержащей ионы Fe²⁺, органические гидропероксиды и тиолы, происходят следующие реакции [33–35]:



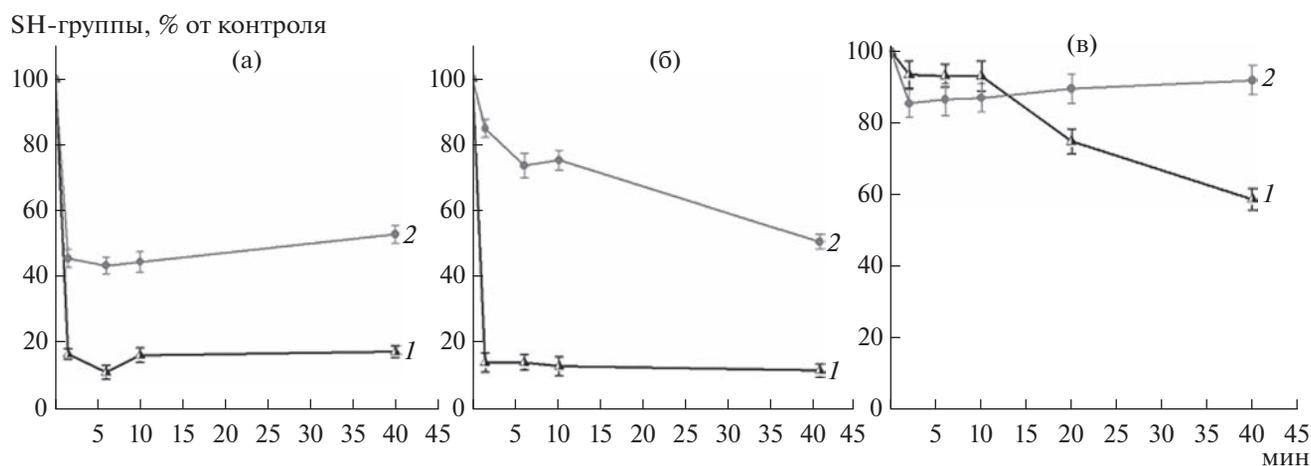


Рис. 3. Окисление SH-групп в AcCys (а, 1), GS (б, 1) и LA (в, 1) и в их ДНКЖ (2) пероксинитритом, добавленным в молярном соотношении к лигандам – 1.25 : 1, к ДНКЖ – 2.5 : 1: Различия между кривыми 1 и 2 для графиков (а) и (б) значимы со 2 мин, для графика (в) с 20 мин (t – тест, $p < 0.05$).

Основную роль в процессах перекисного окисления липидов и других биомолекул играют реакции 1 и 2, в которых образуются алкоксильные ($RO\cdot$) и алкилперекисные радикалы ($ROO\cdot$). Реакции 1 и 2 будут происходить и в присутствии примесных ионов железа, то есть без дополнительного введения последних в среду. В реакции 5 тиолы выступают в качестве антиоксидантов, восстанавливая эти радикалы. Тиольные радикалы ($R'S\cdot$), которые являются продуктами реакций 3 и 4, далее рекомбинируют с образованием дисульфидов (реакция 5). По всей видимости, уровень окисления тиоловых групп будет зависеть от соотношения компонентов реакционной среды и реакционной активности самих тиолов. Так, при высоком содержании t -BOOH увеличение концентрации тиолов в ряду LA, GSH, N-ацетилцистеин приводит к усилению окисления SH-групп. Действительно, тиолы могут стимулировать перекисное окисление липидов, восстанавливая ионы Fe^{3+} до Fe^{2+} [33]. Вместе с тем, связывание ионов железа в ДНКЖ является одним из основных механизмов их антиоксидантного действия. При инкубации с высокой концентрацией органического гидропероксида AcCys-ДНКЖ и GS-ДНКЖ могут распадаться с высвобождением тиолов и ионов железа, в то же время LA-ДНКЖ более стабильна и лучше защищает входящие в ее состав тиоловые группы (рис. 4в, кривая 2). Этот эффект может быть связан с большей гидрофобностью LA, по сравнению с другими тиоловыми лигандами.

Влияние ДНКЖ на окисление дигидрорамина пероксинитритом. Способность ДНКЖ перехватывать пероксинитрит изучали в реакции окисления DHR123 пероксинитритом, образующимся при распаде SIN-1 [27]. Поскольку при спонтан-

ном распаде SIN-1 в присутствии кислорода одновременно образуется O_2^- и NO, SIN-1 часто используют для моделирования образования $ONOO^-$ в живых системах [36]. Отметим, что скорость этой реакции очень высока.

На рис. 5 представлена кинетика окисления пероксинитритом DHR123 до родамина. Как видно из рисунка, ДНКЖ дозозависимо снижали скорость окисления DHR123. Причем LA-ДНКЖ оказались наиболее эффективными перехватчиками $ONOO^-$. При концентрации ДНКЖ 0.125 мМ AcCys-ДНКЖ снижали скорость окисления DHR123 на 7%, GS-ДНКЖ – на 42% и LA-ДНКЖ – на 83%.

Этот результат можно объяснить реакцией между $ONOO^-$ и тиоловыми лигандами. Образующийся в этой реакции тиольный радикал может быстро реагировать с NO-лигандом ДНКЖ, в результате чего должен формироваться S-нитрозо-тиол.

Влияние ДНКЖ на окисление остатка цистеина БСА. Помимо низкомолекулярных тиолов, основными мишенями действия таких окислителей, как пероксинитрит и гидропероксиды, также являются тиолы в белках [36]. ДНКЖ формируются на белках, как правило, при участии тиоловых групп остатков цистеина [2], поэтому было проведено исследование влияния ДНКЖ на окисление остатков цистеина в БСА. Нативный БСА содержит один восстановленный остаток цистеина (Cys34). С целью количественного анализа модификации SH-групп БСА также был использован ThioGlo1 [37].

В эксперименте использовали ДНКЖ, связанные с цистеином БСА. Для их получения к раствору белка добавляли ДНКЖ с фосфатными лигандами,

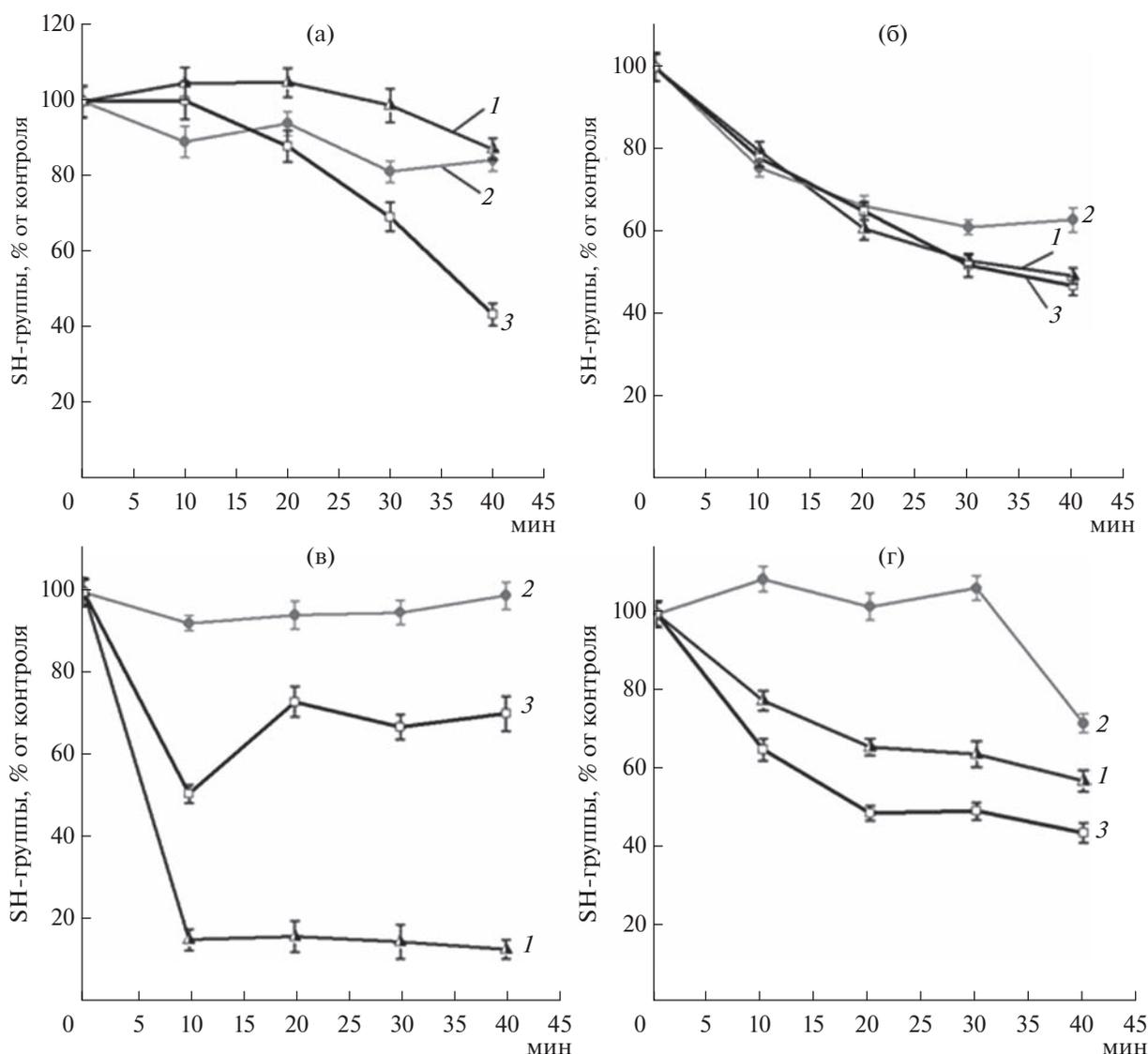


Рис. 4. Окисление SH-групп в AcCys (а), GS (б) и LA (в) и в их ДНКЖ гидропероксидом *трет*-бутила (молярное соотношение к лигандам – 12.5 : 1, к ДНКЖ – 25 : 1); (г) – окисление SH-групп в GS и в GS-ДНКЖ гидропероксидом *трет*-бутила (молярное соотношение к глутатиону – 1.25 : 1, к ДНКЖ – 2.5 : 1). Концентрация Fe²⁺ в (а), (б) и (в) – 0.16 мМ и в (г) – 0.08 мМ: 1 – лиганд, 2 – лиганд-ДНКЖ, 3 – лиганд + Fe²⁺.

которые быстро распадаются с переносом железонитрозильного фрагмента (Fe²⁺-(NO)₂) на белковый тиол. Интенсивность флуоресценции тиолового аддукта БСА-ДНКЖ была примерно на 20% ниже, чем у интактного белка (рис. 6а). Это можно объяснить тем, что включение тиолов в состав комплексов снижает их реакционную способность. Обработка БСА пероксинитритом в молярном соотношении 1 : 10 приводила к окислению 52% цистеинов (рис. 6а, столбик БСА + ONOO⁻), по сравнению с интактным неокисленным белком, при этом в образце БСА-ДНКЖ окислялось 44% цистеинов, что на 8% меньше. Аналогичные результаты были получены и при окислении БСА гидропероксидом *трет*-бутила (рис. 6б). Как и в слу-

чае ONOO⁻, протекторный эффект ДНКЖ был незначителен и составлял те же 8% при сравнении доли окисленных тиолов в БСА и БСА-ДНКЖ.

Как известно, окисление остатков цистеина сопровождается образованием сульфидных и сульфоновых кислот, а также дисульфидных связей. В последнем случае, благодаря межбелковым S–S-сшивкам образуются димеры и более высокомолекулярные агрегаты белка. Образование сшитых с помощью дисульфидных связей форм белка регистрировали методом денатурирующего ДДС-электрофореза в 7%-ном ПААГ. Добавление к образцам белка для электрофореза ДТТ, восстанавливающего дисульфидные связи, показало, что агрегация белка вызвана именно

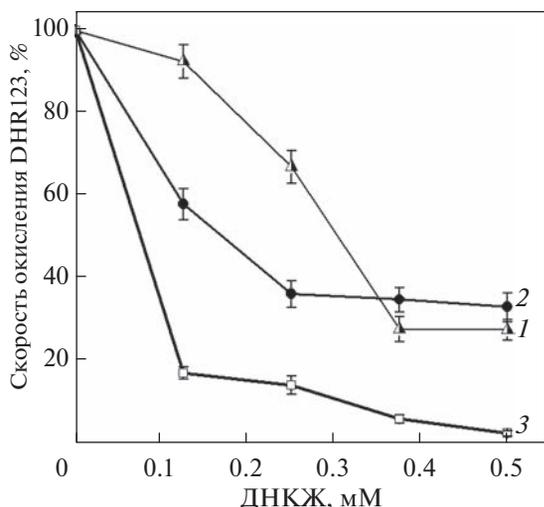


Рис. 5. Влияние низкомолекулярных ДНКЖ с тиоловыми лигандами на скорость окисления дигидрородамина пероксинитритом, образующимся при декомпозиции SIN-1: 1 – AcCys-ДНКЖ, 2 – GS-ДНКЖ, 3 – LA-ДНКЖ. Скорость окисления дигидрородамина в контрольном варианте (без добавок ДНКЖ) принимали за 100%.

S–S-сшивками. В присутствии ДТТ количество высокомолекулярных форм, в основном представленных димерами, было примерно одинаково в опытах с воздействием ONOO^- – ~14% и с $t\text{-VOOH}$ – ~7% (рис. 7, серые столбцы). В то же время без ДТТ под действием ONOO^- количество таких форм в БСА без ДНКЖ составило 25% (рис. 7а, заштрихованные столбцы), а под действием $t\text{-VOOH}$ – 12% (рис. 7б, заштрихованные столбцы). Включение тиолов БСА в ДНКЖ сни-

жало с 24 до 19% долю сшивок под действием ONOO^- и с 12 до 9% под действием $t\text{-VOOH}$ (рис. 7а и 7б соответственно, заштрихованные столбцы). Однако практически такое же количество сшивок наблюдалось и в случае неокисленного БСА-ДНКЖ. Это означает, что в процессе подготовки белка для электрофореза комплексы распадались, высвобождая ионы железа, которые индуцировали реакции окисления, в первую очередь SH-групп.

Полученные результаты, с одной стороны, демонстрировали незначительное протекторное действие ДНКЖ на белковые тиолы, а, с другой, не показали усиления процессов окислительной модификации, которые могли бы происходить в присутствии прооксидантов, образуемых с участием содержащегося в комплексах двухвалентного железа. Это служило дополнительным подтверждением слабого прооксидантного действия ДНКЖ по отношению к альбумину и согласовывалось с результатами более ранних экспериментов, в которых было показано, что ДНКЖ по отношению к гемоглобину (Hb) действуют как сайт-специфические антиоксиданты, защищающие входящий в их состав цистеин (Cys93 β) от окисления [26].

Эти результаты согласовывались с результатами работы [20], в которой было показано, что ДНКЖ, связанные с альбумином, могут защищать остатки цистеина и гистидина от модификации HOCl. В то же время установлено, что глутатионовые лиганды в ДНКЖ реагируют с HOCl гораздо менее эффективно, чем свободный GSH. Нельзя исключить и то, что в процессе окисления связанных с белками ДНКЖ они могут из моноядерной формы трансформироваться в более стабильную биядерную [2].

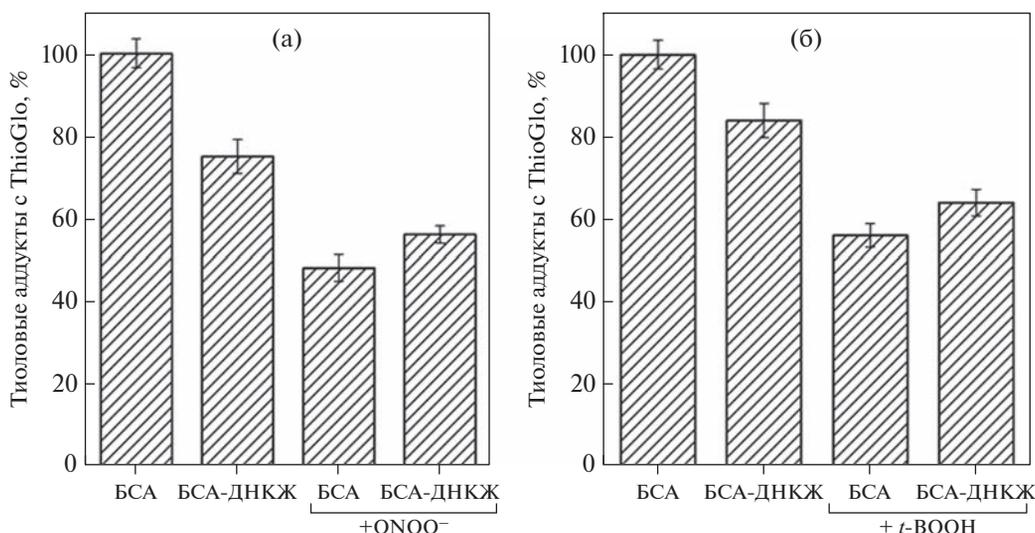


Рис. 6. Влияние образования БСА-ДНКЖ на окисление Cys34 БСА пероксинитритом (а, БСА : ONOO^- = 1 : 10) и $t\text{-VOOH}$ (б, БСА : $t\text{-VOOH}$ = 1 : 25).

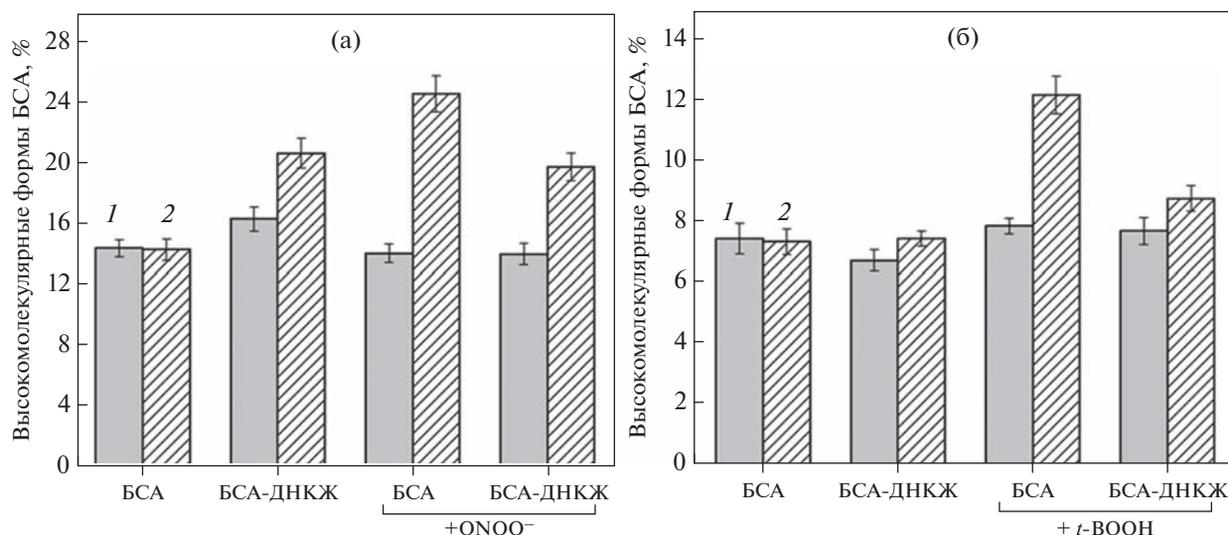
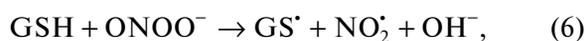


Рис. 7. Влияние связанных с БСА ДНКЖ на образование высокомолекулярных форм БСА (%) под действием пероксинитрита (а) и *t*-BOOH (б) по данным электрофореза в 7%-ном ПААГ с ДДС-Na: 1 – опыты с ДТТ, 2 – без ДТТ.

Кроме этого, ранее было исследовано влияние ДНКЖ на окислительную модификацию гемоглобина. ДНКЖ, связанные с Hb или глутатионом, эффективно защищали этот белок от окислительной модификации, вызванной ONOO^- [14, 15] и *t*-BOOH [26]. Они препятствовали образованию карбонильных производных, окислению триптофановых и тирозиновых остатков, предотвращали деградацию гемовой группы и образование межбелковых сшивок.

Взаимодействие тиолсодержащих ДНКЖ с пероксинитритом было исследовано в работах [26, 32]. Пероксинитрит окислял GS-ДНКЖ по двухэлектронному механизму ($k = 1.8 \pm 0.3 \times 10^7 \text{ M}^{-2} \text{ c}^{-1}$). В ходе этой реакции образуется интермедиат, содержащий связанный с железом пероксинитрит – $(\text{GS})_2\text{-Fe-(ONOO)(NO)}$ [26, 32, 38], который распадается с высвобождением нерадикальных продуктов или участвует в нитровании биомолекул [38].

Тиоловые лиганды, входящие в состав упомянутых выше интермедиатов, скорее всего, окисляются без образования тиольных радикалов [11]. Это выгодно отличает ДНКЖ от их лигандов, которые в реакции с ONOO^- образуют свободнорадикальные продукты (реакции 6–8) [25]:



Помимо протекторного действия на SH-группы, ДНКЖ могут выступать в роли регуляторов реакционной способности белковых тиолов [39]. Так, включение Cys93β гемоглобина в состав

ДНКЖ, с одной стороны, защищает их от окисления органической гидроперекисью, а, с другой, в случае распада комплексов при высоких концентрациях окислителей, тиол может высвободиться в виде тиолят-аниона (R-S^-), реакционная активность которого значительно выше, чем у протонированной формы тиола (Cys-SH). Тиолят-анион проявляет высокую реакционную способность по отношению к электрофильным соединениям, что приводит к формированию стабильной модификации белка. Таким образом, включение SH-групп в ДНКЖ позволяет отсрочить образование стабильных модификаций белковых тиолов при слабом окислительном стрессе и, наоборот, ускорить их при высоком уровне стресса.

Результаты данного исследования показали, что тиоловые лиганды, входящие в состав низкомолекулярных ДНКЖ, в меньшей степени подвержены окислению пероксинитритом, чем их несвязанные формы. Это может быть связано со способностью комплексов катализировать разложение пероксинитрита с образованием нетоксичных продуктов, а также с их переходом в более стабильную биядерную форму. При действии на ДНКЖ гидропероксида *трет*-бутила защитное действие наблюдалось только в случае LA-ДНКЖ, что могло быть связано с большей стабильностью и липофильностью этих комплексов. Защитный эффект ДНКЖ на тиоловые группы альбумина был незначителен, однако при этом не происходило роста увеличения окислительных модификаций белка под действием ионов двухвалентного железа. Полученные результаты еще раз подтвердили, что координация железом тиоловых лигандов и NO, с одной стороны, защищает тиолы от окисления, а с другой, снижает прооксидантное дей-

стве Fe²⁺. Можно заключить, что наличие слабо-связанного железа в ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами не является препятствием для использования этих комплексов в биомедицине.

В состав ДНКЖ могут входить не только тиоловые группы цистеина и глутатиона, но и другие анионные и неанионные лиганды различных биополимеров (белков, полисахаридов и т.д.). Ранее было установлено [12, 26], что ДНКЖ, ассоциированные с белками (альбумином и гемоглобином), разрушались активными формами кислорода в меньшей степени, чем низкомолекулярные комплексы. Связанные с биологически совместимыми полимерами ДНКЖ могут послужить основой для создания наночастиц фармакологического назначения [40]. Включение ДНКЖ в состав наночастиц значительно повышает их стабильность и увеличивает выход NO в физиологических условиях. Такие наночастицы обеспечивают адресную доставку ДНКЖ в клетки и поэтому могут применяться для лечения социально значимых заболеваний, в том числе рака [40]. Стабильность ДНКЖ по отношению к действию окислителей — необходимый критерий для их использования в биомедицине.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант 19-29-12052).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hsiao H.-Y., Chung C.-W., Santos J.H., Villaflores O.B., Lu T.-T. // Dalton Transactions. 2019. V. 48. № 26. P. 9431–9453.
2. Vanin A.F. // Nitric Oxide. 2016. V. 54. P. 15–29.
3. Vanin A.F., Mokh V.P., Serezhenkov V.A., Chazov E.I. // Nitric Oxide. 2007. V. 16. № 3. P. 322–330.
4. Kapelko V.I., Lakomkin V.L., Abramov A.A., Lukoshkova E.V., Undrovinas N.A., Khapchaev A.Y., Shirinsky V.P. // Oxid. Med. Cell. Longev. 2017. V. 2017. e9456163. <https://doi.org/10.1155/2017/9456163>
5. Remizova M.I., Kochetygov N.I., Gerbout K.A., Lakomkin V.L., Timoshin A.A., Burgova E.N., Vanin A.F. // Eur. J. Pharmacol. 2011. V. 662. № 1–3. P. 40–46.
6. Bor-Kucukatay M., Wenby R.B., Meiselman H.J., Baskurt O.K. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2003. V. 284. P. 1577–1584.
7. Shamova E.V., Bichan O.D., Drozd E.S., Gorudko I.V., Chizhik S.A., Shumaev K.B. et al. // Biophysics. 2011. V. 56. № 2. P. 237–242.
8. Igrunkova A., Fayzullin A., Serejnikova N., Lipina T., Pekshev A., Vanin A. et al. // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. № 5. e4439. <https://doi.org/10.3390/ijms24054439>
9. Чазов Е.И., Родненков О.В., Зорин А.В., Лакомкин В.Л., Грамович В.В., Выборов О.Н. и др. // Кардиология. 2011. Т. 51. № 11. С. 28–37.
10. Родненков О.В., Зорин А.В., Гостеев А.Ю., Драгнев А.Г., Чазов Е.И. // Евразийский Кардиологический Журнал. 2016. № 3. С. 186–187.
11. Shumaev K.B., Petrova N.E., Zabbarova I.V., Vanin A.F., Topunov A.F., Lankin V.Z., Ruuge E.K. // Biochemistry (Moscow). 2004. V. 69. № 5. P. 569–574.
12. Shumaev K.B., Gubkin A.A., Serezhenkov V.A., Lobysheva I.I., Kosmachevskaya O.V., Ruuge E.K. et al. // Nitric Oxide. 2008. V. 18. № 1. P. 37–46.
13. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Grachev D.I., Timoshin A.A., Topunov A.F., Lankin V.Z., Ruuge E.K. // Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry. 2021. V. 15. № 4. P. 313–319.
14. Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Shumaev K.B., Chumikina L.V., Arabova L.I., Yaglova N.V. et al. // Appl. Biochem. Microbiol. 2021. V. 57. № 4. P. 411–420.
15. Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Shumaev K.B., Novikova N.N., Topunov A.F. // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. № 24. e13649. <https://doi.org/10.3390/ijms222413649>
16. Martusevich A.K., Soloveva A.G., Dmitrochenkov A.V., Ezhevskaya A.A., Razumovsky A.V. // Annual Research & Review in Biology. 2018. V. 26. № 6. P. 1–11.
17. Martusevich A.K., Soloveva A.G., Peretyagin S.P., Davyduk A.V. // Biophysics. 2014. V. 59. № 6. P. 954–959.
18. Dungal P., Perlinge M., Weidinger A., Redl H., Kozlov A.V. // Free Radic. Biol. Med. 2015. V. 89. P. 300–310.
19. Shumaev K.B., Dudylyna A.L., Ivanova M.V., Pugachenko I.S., Ruuge E.K. // BioFactors. 2018. V. 44. № 3. P. 237–244.
20. Shumaev K.B., Gorudko I.V., Kosmachevskaya O.V., Grigoryeva D.V., Panasenko O.M., Vanin A.F., Topunov A.F. et al. // Oxid. Med. Cell. Longev. 2019. V. 2019. e2798154. <https://doi.org/10.1155/2019/2798154>
21. Vanin A.F., Pekshev A.V., Vagapov A.B., Sharapov N.A., Lakomkin V.L., Abramov A.A. et al. // Biophysics (Oxf). 2021. V. 66. № 1. P. 155–163.
22. Vanin A.F., Tronov V.A., Borodulin R.R. // Cell Biochem. Biophys. 2021. V. 79. № 1. P. 93–102.
23. Vanin A.F. // Biochemistry (Moscow). 2022. V. 87. № 11. P. 1367–1386.
24. Bosworth C.A., Toledo J.C. Jr., Zmijewski J.W., Lancaster J.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. № 12. P. 4671–4676.
25. Karoui H., Hogg N., Kalyanaraman B. // Arch. Biochem. Biophys. 1996. V. 330. № 1. P. 115–124.
26. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Timoshin A.A., Vanin A.F., Topunov A.F. // Methods Enzymol. 2008. V. 436. P. 445–461.
27. Singh R.J., Hogg N., Joseph J., Konorev E., Kalyanaraman B. // Arch. Biochem. Biophys. 1999. V. 361. № 2. P. 331–339.
28. Hoff S., Larsen F.H., Andersen M.L., Lund M.N. // Analyst. 2013. V. 138. № 7. P. 2096–2103.
29. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
30. Vanin A.F., Poltorakov A.P., Mikoyan V.D., Kubrina L.K., Burbaev D.S. // Nitric Oxide. 2011. V. 23. № 2. P. 136–149.
31. Flinck M., Kramer S.H., Pedersen S.F. // Acta Physiol. (Oxf). 2018. V. 223. № 3. e13068. <https://doi.org/10.1111/apha.13068>

32. Лобышева И.И., Сереженков В.А., Ванин А.Ф. // Биохимия. 1999. V. 64. № 2. P. 194–200.
33. Tien M., Bucher J.R., Aust S.D. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1982. V. 107. № 1. P. 279–285.
34. Younes M., Strubelt O. // J. Appl. Toxicol. 1990. V. 10. № 5. P. 319–324.
35. Olson A.S., Jameson A.J., Kyasa S.K., Evans B.W., Dussault P.H. // ACS Omega. 2018. V. 3. № 10. P. 14054–14063.
36. Daiber A., Daub S., Bachschmid M., Schildknecht S., Oelze M., Steven S. et al. // Int. J. Mol. Sci. 2013. V. 14. № 4. P. 7542–7570.
37. Fabisiak J.P., Sedlov A., Kagan V.E. // Antioxid. Redox Signal. 2002. V. 4. № 5. P. 855–865.
38. Tran N.G., Kalyvas H., Skodje K.M., Hayashi T., Moënne-Loccoz P., Callan P.E. et al. // J. Am. Chem. Soc. 2011. V. 133. № 5. P. 1184–1187.
39. Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Shumaev K.B., Novikova N.N., Topunov A.F. // Appl. Biochem. Microbiol. 2020. V. 56. № 5. P. 512–520.
40. Akentieva N., Gizatullin A., Sanina N., Shkondina N., Abramova K., Tikhonov V. et al. // Biointerface Res. Appl. Chem. 2023. V. 13. № 4. e344.
<https://doi.org/10.33263/BRIAC134.344>

Effect of Peroxynitrite and *tert*-Butyl Hydroperoxide on Thiol Ligands of Dinitrosyl Iron Complexes

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

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

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

Low molecular weight dinitrosyl iron complexes (DNICs) with thiol-containing ligands are a physiological form for deposit and transport of nitric oxide (NO) in the organism, herewith DNICs can exhibit antioxidant and antiradical properties. It was that DNICs containing cysteine, glutathione and lipoic acid as ligands, decreased the rate of dihydrodamine oxidation by peroxynitrite formed during 3-morpholinononymine decomposition. Thiol (sulfhydryl) ligands are present in DNICs in the form of thiolate anions (R-S⁻), which protects these groups from oxidation by peroxynitrite. When *tert*-butyl peroxide was used as an oxidizer at low concentration, the protective effect of DNICs on their SH-groups was observed for complexes with lipoic acid (LA-DNIC) and with glutathione (GS-DNIC). LA-DNIC was more resistant to oxidizing agents and more effective peroxynitrite trap than other DNICs. DNICs associated with bovine serum albumin had a negligible protective effect on cysteine residue during oxidation by peroxynitrite and *tert*-butyl hydroperoxide. The obtained results allow us to consider low molecular weight DNICs with thiol ligands as peroxynitrite traps and thiol residues protectors in proteins.

Keywords: dinitrosyl iron complexes, thiols, *tert*-butyl hydroperoxide, peroxynitrite

УДК 577.15

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРИРОДНОЙ HydSL ГИДРОГЕНАЗЫ *Thiocapsa bogorovii* И ЕЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ С УСЕЧЕННЫМ HydS БЕЛКОМ

© 2023 г. А. С. Стародубов¹ *, М. Х. Хасимов¹,
А. Н. Хустнутдинова¹, Н. А. Зорин¹, А. А. Цыганков¹

¹Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки “Федеральный исследовательский центр “Пушчинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”, Пушкино, Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: alexkex3@mail.ru

Поступила в редакцию 07.07.2022 г.

После доработки 30.09.2022 г.

Принята к публикации 07.10.2022 г.

Показано, что природная HydSL и модифицированная $\Delta 54$ HydSL гидрогеназы, выделенные из *Thiocapsa bogorovii*, сходны по удельной активности, зависимости активности от температуры и термостабильности. Полученные данные свидетельствуют о том, что С-концевой домен не принимает участия в стабилизации белковой структуры гидрогеназы при тепловом воздействии. Ионы серебра быстро и необратимо ингибировали активность HydSL и $\Delta 54$ HydSL. В присутствии Ag^+ наблюдалось снижение пика поглощения в области 410 нм, что указывало на разрушение железосерных кластеров. Кроме того, наблюдалось разрушение белковой глобулы. Длительное воздействие Ag^+ вызывало изменения ИК-Фурье спектров гидрогеназы, что свидетельствовало о разрушении NiFe-активного центра. Предполагается, что первой мишенью ионов серебра является дистальный железосерный кластер, причем расположенный вблизи него С-конец HydS способен взаимодействовать с ионами серебра, снижая таким образом локальную концентрацию ионов.

Ключевые слова: HydSL гидрогеназа, *Thiocapsa bogorovii*, С-концевой фрагмент HydS, модифицированная гидрогеназа HydSL, термостабильность, водород, нитрат серебра

DOI: 10.31857/S0555109923040141, **EDN:** QZNSAD

Гидрогеназы микроорганизмов участвуют в метаболизме водорода, катализируя обратимую реакцию восстановления протонов до молекулярного водорода. По содержанию металлов в активном центре различают три основные группы ферментов: NiFe-гидрогеназы, содержащие биметаллический железоникелевый активный центр, FeFe-гидрогеназы, содержащие двухатомный кластер железа в активном центре и Fe-гидрогеназы, не содержащие металлов в белковой глобуле, но использующие Fe-содержащий кофактор [1, 2]. Термостабильная HydSL-гидрогеназа (КФ: 1.12.99.6) из пурпурной серной бактерии *Thiocapsa bogorovii* BBS (прежнее название штамма: *Thiocapsa roseopersicina* BBS [3]) относится к первой подгруппе NiFe-гидрогеназ [2]. Она была выделена как фермент, состоящий из двух субъединиц: малой HydS и большой HydL [4]. В большой субъединице (HydL) находится NiFe-активный центр, а малая субъединица (HydS) содержит три FeS-кластера, которые образуют транспортную систему для внутримолекулярного переноса электронов между

активным центром и поверхностью фермента [1]. Ранее для этой гидрогеназы показано, что С-концевой участок HydS принимает участие в закреплении гидрогеназы на мембране, по-видимому, путем связывания с трансмембранным Isp1 белком, который на основании структуры hyd-оперона считается входящим в тетрамерный мембранный комплекс HydS-Isp1-Isp2-HydL [5, 6]. Этот С-концевой участок находится вблизи дистального FeS кластера, и его роль в стабилизации конформации молекулы гидрогеназы неизвестна. Удаление этого участка и присоединение гистидиновой метки может помочь в ориентированной иммобилизации гидрогеназы на поверхности с уменьшенным расстоянием от электрода до дистального FeS кластера. HydSL гидрогеназа *T. bogorovii* BBS с удаленными 54 аминокислотными остатками с С-конца HydS, $\Delta 54$ HydSL и введением гистидиновой метки описана ранее [5].

Цель работы – сравнение активности, температурной зависимости, термостабильности и устойчивости к токсическому действию ионов серебра

природной HydSL модифицированной $\Delta 54$ HydSL гидрогеназы.

МЕТОДИКА

Клетки пурпурной серной бактерии *Thiocapsa bogorovii* и мутанта ($\Delta 54$ HydSL?) выращивали в анаэробных фотогетеротрофных условиях на модифицированной среде Пфеннига [7]. Получение мутанта с модифицированной гидрогеназой описано ранее [5]. При его выращивании в среду добавляли 25 мкг/л канамицина. В работе использовали метилвиологен, HEPES и реактивы для электрофореза в ПААГ фирмы “Sigma” (Германия), фенилсефарозу CL-4B “Pharmacia” (Швеция), ДЭАЭ-целлюлозу DE₅₂ “Whatman” (Англия) и дитионит натрия “Fluka” (Швейцария). Остальные реактивы — отечественного производства марок х. ч. и о. с. ч.

Получение экстрактов клеток и очистка гидрогеназы. Для получения природной и модифицированной гидрогеназы использовали одну и ту же методику. Клетки отделяли от культуральной жидкости в конце экспоненциальной фазы роста на проточной центрифуге. Клеточную пасту ресуспендировали в 20 мМ К-фосфатном буфере (рН 7.0) и разрушали обработкой ацетоном, затем ультразвуком на дезинтеграторе УЗГТ-01/22 (22 кГц, 3 раза по 10 мин, 10°C) как описано ранее [8]. Неразрушенные клетки и их осколки осаждали центрифугированием (10000 g, 30 мин, 4°C) и получали бесклеточный экстракт. Для очистки гидрогеназы использовали фракционирование бесклеточного экстракта сульфатом аммония и последовательную жидкостную хроматографию на колонках с фенилсефарозой CL-4B и ДЭАЭ-целлюлозой DE₅₂. Окончательную стадию очистки препаратов гидрогеназы осуществляли с использованием препаративного электрофореза в 7%-ном ПААГ как описано ранее [9].

Влияние нитрата серебра на активность гидрогеназ. Действие AgNO₃ проверяли при разных концентрациях ингибитора и фермента. Для опытов использовали свежеприготовленный 0.1 М раствор AgNO₃ в 50 мМ HEPES буфере, рН 7.0 в защищенном от света стеклянном сосуде. Константу скорости инактивации первого порядка определяли графическим методом.

Определение гидрогеназной активности. Активность гидрогеназы определяли по реакции восстановления окисленного метилвиологена водородом спектрофотометрическим методом [9]. Реакционная смесь (общий объем 2 мл) содержала 50 мМ Tris-HCl буфер (рН 9.0), 4 мМ метилвиологен и 0.1–10 мкг гидрогеназы. Кювету заполняли водородом и для инициирования реакции добавляли следовые количества (5–10 мкл) 20 мМ раствора дитионита натрия, приготовленного в анаэ-

робных условиях. Стандартные измерения активности фермента проводили в термостатируемой кювете при температуре 30°C. При изучении зависимости активности гидрогеназы от температуры кювету с пробой фермента термостатировали не менее 5 мин и затем измеряли активность при заданной температуре. Термостабильность гидрогеназы оценивали после 10 мин выдерживания пробы фермента в термостате по величине остаточной активности в стандартных условиях. Кинетическую кривую восстановления метилвиологена строили на основании показаний спектрофотометра “Shimadzu 1600” (Япония) при длине волны 600 нм. Для расчета активности использовали коэффициент экстинкции восстановленного метилвиологена $\epsilon_{600} = 13.00 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Ферментативную активность гидрогеназы выражали в мкмоль H₂/мин в расчете на 1 мг белка.

Регистрация и обработка спектров. ИК-Фурье спектры препаратов гидрогеназы регистрировали на спектрофотометре Bruker IFS 66v/S (“Bruker”, Германия). Образцы фермента концентрировали до ~50 мг белка/мл с использованием микроконцентраторов “Microcon-10” (“Amicon”, США) и помещали в кювету толщиной 50 мкм со стеклами из фторида кальция. Для получения ИК спектров с Фурье преобразованием первоначально измеряли 256 сканов базовой линии на воздухе с пустым кюветным отделением, затем записывали 256 сканов образцов 50 мМ HEPES-буфера или гидрогеназы в буфере. ИК спектры регистрировали в диапазоне 4000–1000 см⁻¹ с детектором МСТ (“Visinic”, Израиль) при комнатной температуре с разрешением 2 см⁻¹ в двух повторностях с последующим усреднением. Из ИК спектра поглощения гидрогеназы вычитали ИК спектр поглощения буфера, нормированный в максимуме полосы поглощения воды при ~2130 нм. Искажения базовой линии в полученном спектре корректировали в ручном режиме в программе Origin.

Спектры поглощения образцов гидрогеназы в области 250–600 нм регистрировали на спектрофотометре “Shimadzu 1600” (Япония). Концентрацию препаратов фермента определяли по поглощению при 400 нм с использованием для расчета коэффициента экстинкции: $\epsilon_{400} = 42 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение природной HydSL и мутантной $\Delta 54$ HydSL гидрогеназ проводили на основе сравнения удельной активности выделенных ферментов, зависимости их активности от температуры и стабильности при прогревании в течение 10 мин.

Свежевыделенные электрофоретически гомогенные препараты гидрогеназ имели удельную активность при 30°C 130 ± 25 и 110 ± 22 мкмоль мин⁻¹ мг⁻¹ белка для нативной и модифицированной гидро-

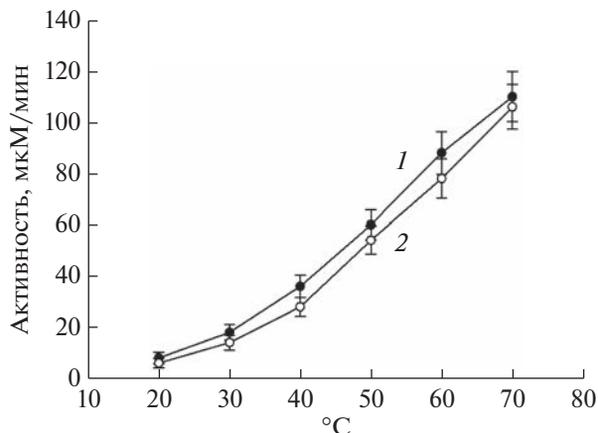


Рис. 1. Зависимость активности нативной HydSL (1) и модифицированной $\Delta 54$ HydSL (2) гидрогеназ *T. bogovorii* от температуры. Концентрация гидрогеназ ~ 0.1 мг/мл.

геназ соответственно, разница их активностей была в пределах доверительных интервалов. Это указывает на неизменность структуры активного центра, а также на то, что мишенью ингибитора является не белковая глобула, а дистальный железосерный кластер системы трех FeS кластеров и их функциональной связи при удалении С-концевого остатка. Зависимость активности гидрогеназы из исходного штамма и мутанта от температуры практически не отличалась: полное совпадение кривых (рис. 1).

Подсчитанные энергии активации для диапазона 20–40°C составляли 54 ± 7 и 56 ± 6 соответственно, то есть различия также были в пределах доверительных интервалов. Прогревание гидрогеназ в течение 10 мин при температурах вплоть

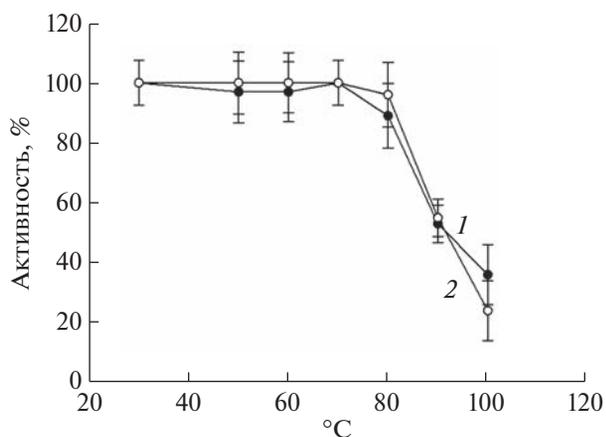


Рис. 2. Инактивация гидрогеназы HydSL (1) и $\Delta 54$ HydSL (2) после прогревания при заданной температуре в течение 10 мин: 100% активности соответствует 130 ± 25 и 110 ± 10 мкмоль мин⁻¹ мг⁻¹ белка для HydSL и $\Delta 54$ HydSL гидрогеназ соответственно. Концентрация гидрогеназ ~ 0.1 мг/мл.

до 80°C не снижало удельной активности обеих гидрогеназ и не приводило к разрушению фермента (рис. 2). Прогревание при 90°C приводило к потере примерно половины, а при 100°C около 75% активности обоих ферментов. Полученные данные свидетельствуют о том, что С-концевой домен не принимал участия в стабилизации белковой структуры гидрогеназы.

В качестве дополнительного критерия для сравнения структуры и стабильности двух гидрогеназ была выбрана чувствительность к ионам серебра. Известно, что ионы серебра способны взаимодействовать с аминокислотами, находящимися как в свободном состоянии [10], так и в составе белков, что может приводить к разрушению белков [11]. Более того, показано, что серебро способно замещать железо в FeS кластерах [12].

Нитрат серебра (0.1 мМ–5 мМ) быстро и необратимо ингибировал HydSL-гидрогеназу *T. bogovorii*. В присутствии 5 мМ AgNO₃ степень ингибирования составляла более 90% в течение 20 мин. Снижение концентрации ингибитора приводило к замедлению кинетики инактивации (рис. 3а). При концентрации 0.5–1.0 мМ ингибирование было частичным, хотя процесс инактивации гидрогеназы не выходил на плато и через 3 ч инкубации. Константа скорости инактивации первого порядка, составляла 57.3 ± 3.5 М⁻¹ мин⁻¹ при 20°C.

Для установления типа ингибирования (обратимый или необратимый) используют разбавление реакционной среды с ингибитором [13]. Только при обратимом ингибировании происходит значительное восстановление активности фермента. Снижение концентрации ингибитора при разбавлении в 1000 раз не приводило к восстановлению активности HydSL гидрогеназы, степень ингибирования не изменялась (данные не приведены). Практически полное удаление Ag⁺ при трехкратной промывке гидрогеназы на микроконцентра-

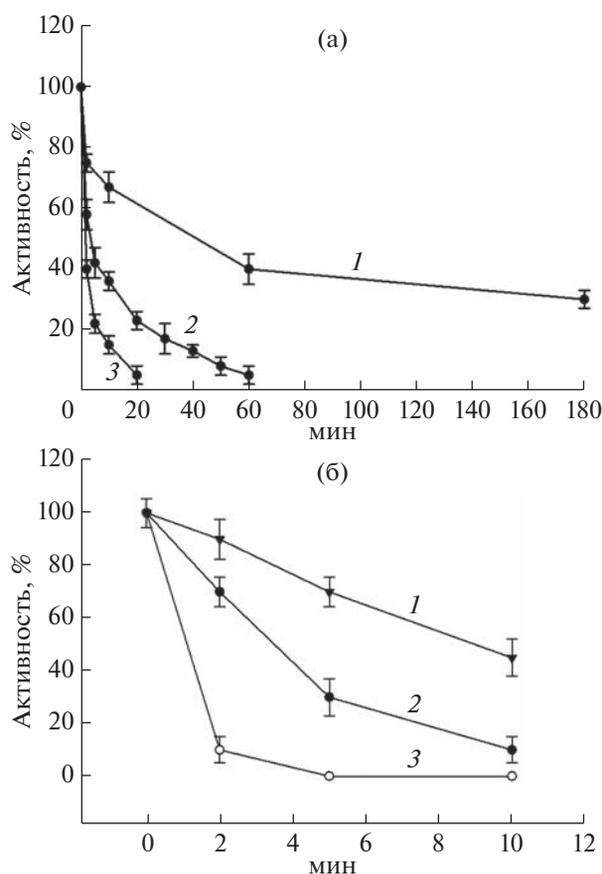


Рис. 3. Кинетика инактивации HydSL-гидрогеназы в присутствии 1 (1), 2 (2) и 5 мМ (3) (а) и $\Delta 54$ HydSL в присутствии 0.5 (1) и 1 мМ (2) AgNO_3 при 20°C (б). (50 мМ HEPES буфер, pH 7.0, концентрация гидрогеназ ~0.1 мг/мл.)

торах “Microcon10” (удаление соединений с массой < 10 kDa) также не приводило к восстановлению активности фермента, что указывает на необратимый характер ингибирования.

Действие ионов серебра на $\Delta 54$ -6his HydSL-гидрогеназу было более значительным по сравнению с гидрогеназой из родительского штамма. Ингибиторный эффект проявлялся уже при концентрации 0.5 мМ (рис. 3б), причем ингибирование также было необратимым. Константа скорости инактивации первого порядка составляла $746 \pm 15 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ при 20°C.

При изучении действия ионов серебра было отмечено, что при 5 мМ концентрации AgNO_3 и инкубации в течение 2 ч происходило помутнение раствора, что свидетельствует о денатурации белка. Для подтверждения этого явления проводили ДДС-электрофорез HydSL-гидрогеназы до и после инкубации с 5 мМ AgNO_3 . Обнаружено, что происходит частичное разрушение большой и малой субъединиц гидрогеназы, причем появляются новые полосы с меньшим молекулярным весом, что указывало на разрушение нативной структуры гидрогеназы (данные не приведены). Таким

образом, через 2 ч инкубации при 5 мМ AgNO_3 наблюдалось неполное разрушение белковой глобулы.

Известно, что при взаимодействии ферредоксина с ионами серебра при определенных редокс-состояниях возможно замещение одного атома железа в FeS кластере на серебро, что не влияет на пик поглощения при 410 нм [12]. После инкубации HydSL-гидрогеназы с 5 мМ Ag^+ в течение 20 мин происходила инактивация фермента на 90% (рис. 3а). При этом площадь пика поглощения при 410 нм снижалась на 58% и составила 19 условных единиц, а после инкубации с 1.0 и 3.0 мМ Ag^+ — 40 и 25 соответственно (рис. 4б). Можно предположить, что ион серебра замещает один атом железа в железосерном кластере гидрогеназы, как и в случае ферредоксина *Pyrococcus furiosus* [12], что приводит к образованию гибридного AgFe_3S_4 кластера, который не активен при переносе электронов. Гибридный кластер также имеет характерное поглощение в области 410 нм.

Для изучения влияния ионов серебра на активный центр фермента был использован метод ИК-Фурье-спектроскопии. Этот метод является

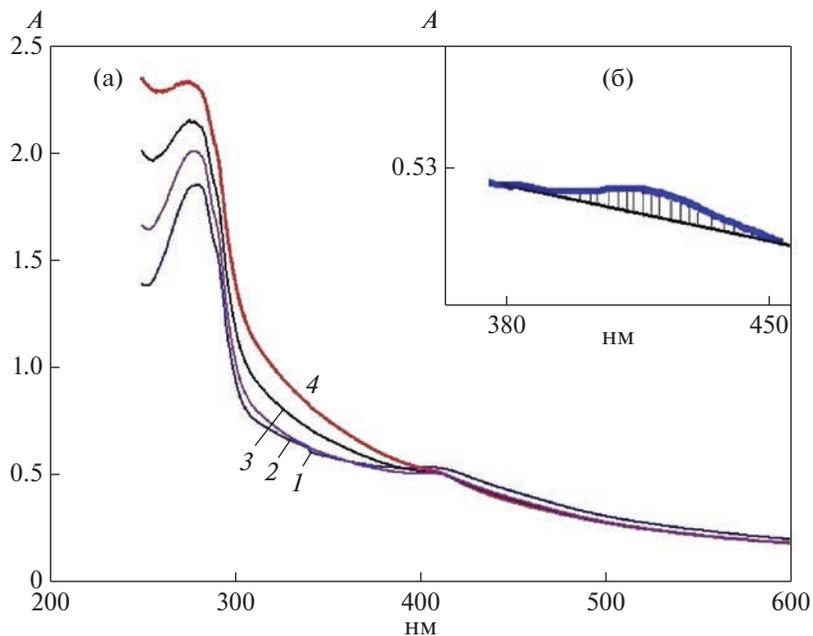


Рис. 4. Спектры поглощения HydSL гидрогеназы (а) без добавления (1) и после инкубации в присутствии 1 (2), 3(3) и 5 мМ AgNO_3 (4) в течение 30 мин при 20°C. На врезке (б) – иллюстрация измерения площади пика в области поглощения 410 нм. Концентрация гидрогеназы ~4.2 мг/мл.

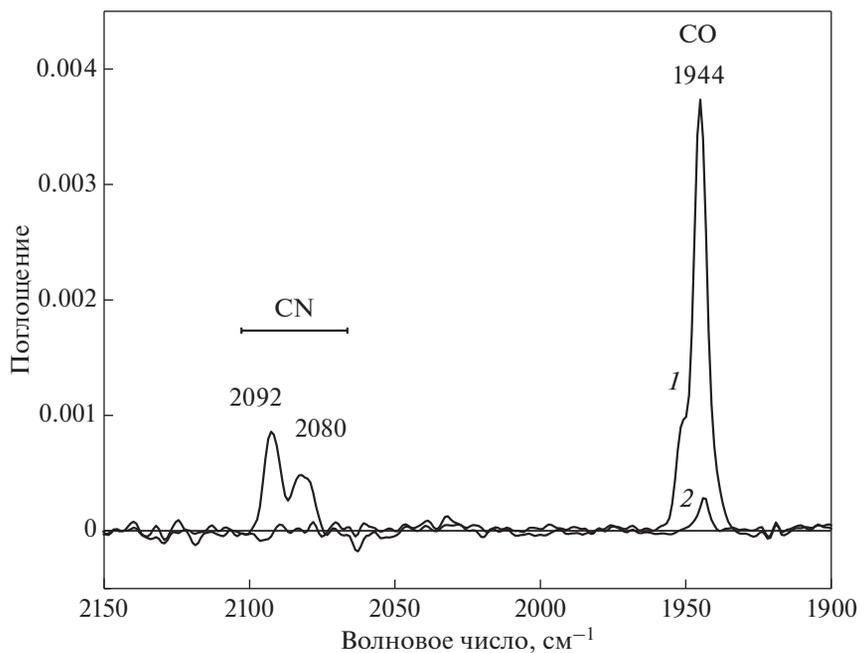


Рис. 5. ИК-Фурье-спектры нативной (1) гидрогеназы и после инкубации с 50 мМ AgNO_3 в течение 20 ч (2) при 20°C в 50 мМ HEPES буфере, pH 7.0. Концентрация гидрогеназы ~50 мг/мл.

наиболее информативным для оценки состояния активного центра гидрогеназ. ИК-Фурье-спектры HydSL-гидрогеназы проявляли характерные полосы для двухатомных лигандов CO и CN [9]. Для проверки действия AgNO₃ на активный центр HydSL гидрогеназы препарат с концентрацией 50 мг/мл выдерживали 20 ч с ингибитором (5 мМ) при 20°C, затем измеряли остаточную активность и регистрировали ИК-Фурье-спектры (рис. 5). Степень ингибирования гидрогеназной активности ионами серебра в этом эксперименте достигала 93%. Амплитуда пиков двухатомных лигандов в ИК спектре гидрогеназы значительно уменьшалась, причем положение полос лигандов не изменялось. Это соответствует степени инактивации фермента ионами серебра в аналогичных условиях (остаточная активность ~7%). Следовательно, при длительном ингибирующем действии Ag⁺ имеет место разрушение активного центра (рис. 5).

Полученные данные свидетельствуют о том, что в присутствии 5 мМ AgNO₃ через 20 мин наблюдается 90% ингибирование, а через 2 ч – частичное разрушение белка нативной гидрогеназы (см. выше), так как разрушение белковой глобулы более медленный процесс по сравнению с инактивацией. Для проверки этого предположения препарат модифицированной гидрогеназы смешивали с эквимольным количеством бычьего сывороточного альбумина и добавляли ингибитор до концентраций 1, 3 или 5 мМ. Рассчитанная константа ингибирования составляла $760 \pm 15 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ при 20°C, что практически не отличалось от константы ингибирования, полученной в отсутствие бычьего сывороточного альбумина. Это говорит о том, что первой мишенью ингибитора является не белковая глобула, а дистальный железосерный кластер.

Таким образом, под действием ионов серебра у HydSL-гидрогеназы, происходит сначала инактивация FeS-кластеров, а затем разрушение железоникелевого активного центра. Для выявления причин более быстрой инактивации Δ54-6his HydSL следует отметить, что С-конец HydS, по современным представлениям, в нативном состоянии располагается в стороне от поверхности, где расположен дистальный FeS-кластер [5]. Однако, учитывая, что этот домен гидрофобен, его расположение в воде и без взаимодействия с Isp1 может быть другим. Так, например, расчеты свидетельствуют о том, что в вакууме С-конец HydSL-гидрогеназы может быть “завернут” сам на себя и располагаться ближе к дистальному кластеру [14], экранируя его. При этом в составе С-конца HydS имеются лизин (позиции 347, 348, 351), гистидин (позиция 356) и аргинин (позиция 357). Это аминокислоты, которые взаимодействуют с ионами серебра при физиологических значениях pH [10, 11]. Можно сделать вывод, что расположенный вблизи дистального кластера С-конец HydS

способен взаимодействовать с ионами серебра, снижая таким образом локальную концентрацию ионов у дистального FeS кластера. У Δ54-6his HydSL гидрогеназы такая возможность отсутствует. Это может объяснять значительно более высокую константу ингибирования Δ54-6his HydSL ионами серебра.

Авторы выражают благодарность А.А. Забелину за содействие в регистрации и обработке ИК-Фурье-спектров гидрогеназы и Т.В. Лауринавичене за полезные советы при обсуждении результатов.

Работа выполнена в рамках Госзадания № 122041200039-0.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Vignais P., Billoud B.* // Chem. Rev. 2007. V. 107. P. 4206–4272.
2. *Greening C., Biswas A., Carere C.R., Jackson C.J., Taylor M.C., Stott M.B., Cook G.M., Morales S.E.* // Isme J. 2016. V. 10. № 3. P. 761–777.
3. *Турова Т.П., Кеннен О.И., Ковалева О.Л., Слободова Н.В., Берг И.А., Ивановский Р.Н.* // Микробиология 2009. Т. 78. С. 339–349.
4. *Гоготов И.Н., Зорин Н.А., Кондратьева Е.Н.* // Биохимия 1976. Т. 41. № 5. С. 836–841.
5. *Khasimov M.K., Petushkova E.P., Khusnutdinova A.N., Zorin N.A., Batyrova K.A., Yakunin A.F., Tsygankov A.A.* // Biochim. Biophys. Acta Bioenerg. 2021. V. 1862. № 12. P. 148492.
6. *Rakhely G., Colbeau A., Garin J., Vignais P.M., Kovacs K.L.* // J. Bacteriol. 1998. V. 180. № 6. P. 1460–1465.
7. *Богоров Л.В.* // Микробиология. 1974. Т. 43. № 2. С. 326–330.
8. *Зорин Н.А., Стародубов А.С., Цыганков А.А.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2020. V. 56. № 2. С. 135–140.
9. *Zorin N.A., Zabelin A.A., Shkuropatov A.Y., Tsygankov A.A.* // J. Inorganic Biochemistry. 2017. V. 177. P. 190–197.
10. *Gruen L.C.* // Biochim. Biophys. Acta. 1975. V. 386. № 1. P. 270–274.
11. *Betts H.D., Whitehead C., Harris H.H.* // Metallomics. 2021. V. 13. № 1. P. 1–12.
12. *Martic M., Jakab-Simon I.N., Haahr L.T., Hagen W.R., Christensen H.E.* // J. Biol. Inorg. Chem. 2013. V. 18. № 2. P. 261–276.
13. *Диксон М., Уэбб Э.* Ферменты 2. / Ред. Л.М. Гиноман, М.И. Левянт, В.К. Антонова, А.Е. Браунштейн. М.: Мир, 1998. 530 с.
14. *Abdullatypov A.V., Tsygankov A.A.* // Photosynthesis Research. 2015. V. 125. № 1–2. P. 341–353.

Comparison of HydS Hydrogenase of *Thiocapsa bogorovii* and its Modification with Truncated C-terminus of HydS

A. S. Starodubov^{a, *}, M. K. Khasimov^a, A. N. Khusnutdinova^a, N. A. Zorin^a, and A. A. Tsygankov^a

^a*Institute of Basic Biological Problems of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow region, 142290 Russia*

**e-mail: alexkex3@mail.ru*

Native HydSL hydrogenase of *Thiocapsa bogorovii* and its modification with truncated C-terminus of HydS (delta54HydS) were shown to be similar in specific activity, thermostability and temperature dependence of activity. It supports the suggestion that C-terminus of HydS does not participate in stabilization of the enzyme structure. Ag⁺ ions irreversibly inactivated both hydrogenases but delta54HydS was more sensitive to this inhibitor. In the presence of Ag⁺ the absorption peak at 410 nm was bleached indicating the destruction of FeS clusters. Protein globule was also destructed by Ag⁺. Prolonged incubation of hydrogenase with Ag⁺ ions led to disappearance of CO and CN peaks in IR spectra indicating NiFe center impairment. Data suggest that the first target of Ag⁺ ions is distal FeS cluster, and C-terminus of HydS interacts with Ag⁺ decreasing local ion concentration near the distal FeS cluster.

Keywords: HydSL hydrogenase, *Thiocapsa bogorovii*, C-terminal fragment of HydS, modified HydSL hydrogenase, thermal stability, hydrogen, silver nitrate, hydrogenase

УДК 577.152.3:579.22

ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА СТАФИЛОЛИТИЧЕСКОГО ФЕРМЕНТА ИЗ *Staphylococcus hyicus*

© 2023 г. Т. В. Федоров¹ *, М. Г. Теймуразов¹, А. К. Сурин¹, О. И. Тазина¹, С. Ф. Бикетов¹

¹ “Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии”
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека,
п. Оболенск, Серпуховский р-н, Московская обл., 142279 Россия

*e-mail: tfedorov@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.01.2023 г.

После доработки 13.04.2023 г.

Принята к публикации 30.04.2023 г.

В работе представлены результаты идентификации нового стафилолитического фермента из культуральной жидкости *Staphylococcus hyicus* В-8870. Первичная последовательность фермента имела максимальное сходство с СНАР-доменом N-ацетилмурамил-L-аланинамидазы из *Staphylococcus sciuri* DD 4747. Фермент активен в отношении широкого спектра микроорганизмов рода *Staphylococcus*, в том числе MRSA штаммов. Молекулярная масса фермента 13993 Да, коэффициент поглощения при 280 нм – $\epsilon \frac{\text{МГ}}{\text{МЛ}}$ 3.94, значение изоэлектрической точки – pI 10.35. Удельная активность фермента по отношению к клеточной суспензии *S. aureus* FDA 209P – 1518 ед./мг, оптимум pH – 7.7 и температуры – 40°C.

Ключевые слова: *Staphylococcus hyicus*, СНАР домен, стафилолитический фермент, MRSA

DOI: 10.31857/S0555109923050057, **EDN:** WTWAXK

Стафилококкозы являются наиболее распространенными социально значимыми заболеваниями, охватывающими все возрастные слои населения. Высокая распространенность, устойчивость во внешней среде, а также к антибиотикам [1], способность поражать практически все органы и ткани, хронизация инфекции с образованием биопленок, делают стафилококковые заболевания трудноизлечимыми даже при использовании современных антимикробных препаратов широкого спектра действия. Включение в схемы лечения новых лекарственных средств с принципиально иными механизмами действия, в частности, обладающих стафилолитической активностью, может существенно повысить эффективность антимикробной терапии. Исследование стафилолитических ферментов является одним из этапов на пути создания высокоэффективных медицинских препаратов, которые могут быть с успехом включены как в имеющиеся схемы лечения стафилококкозов, так и использоваться индивидуально, например, в случаях таких серьезных, практически неизлечимых заболеваний, как стафилококковый эндокардит, стафилококковое поражение суставов, разнообразные поражения внутренних органов с образованием биопленок.

В последние годы большое внимание уделяется бактериальным и фаговым лизинам, которые в основном имеют модульную организацию. Одной из структурных единиц лизинов является СНАР-домен (цистеин-гистидин зависящая амидогидролаза/эндопептидаза), длина которого составляет около 120 аминокислотных остатков [2], проявляющий самостоятельную ферментативную активность в отношении бактериального пептидогликана [3, 4]. Домен СНАР способен участвовать в двух различных каталитических реакциях расщепления пептидогликана [5, 6]. Проявляя пептидазную активность, он расщепляет связь между D-аланином и первым глицином пентаглицинового мостика. Действуя как амидаза, разрывает связь между остатком N-ацетилмурамовой кислоты и L-аланином на N-конце ствольного пептида. Присутствие СНАР-домена, по-видимому, определяет тип активности лизинов, в состав которых он входит, проявляют ли они только пептидазную активность (например, LysK), только амидазную активность (например, SkI) или обе вместе (например, LysN) [7–9]. В фаговых белках домен СНАР, в основном, расположен в N-концевой области, тогда как в бактериальных белках он присутствует на C-конце [10]. Созданные химерные лизины, в состав которых входит домен

СНАР, обладают повышенной по сравнению с исходными формами активностью [11]. Таким образом, поиск и изучение разнообразных форм бактериальных лизисов дает возможность получения перспективных антибактериальных средств широкого спектра воздействия на инфекционные агенты. Данная работа посвящена исследованию нового стафилолитического фермента, выделенного из культуральной жидкости микроорганизма *Staphylococcus hyicus*, спектру его антимикробных свойств, физико-химическим и биохимическим характеристикам.

МЕТОДИКА

Культивирование и штаммы микроорганизмов.

Культивирование микроорганизма *Staphylococcus hyicus* В-8870, а также тестовых культур проводили на плотной питательной среде LB при 37°C.

Глубинное культивирование проводили в качалочных колбах, содержащих по 200 см³ LB-бульона, при температуре 37°C со скоростью перемешивания 200 об./мин.

Тестирование лизиса культуры *S. aureus* FDA209P на чашках (Spot-тест) проводили по методу, предложенному в работе [12]. Чашку Петри заливали 20 мл агара, состоящего из питательной среды № 1 (“HiMedia Laboratories Pvt. Ltd”, Индия) с добавлением бактериологического агара до 1%. После застывания нижнего слоя агара в колбу с расплавленным и охлажденным до 50°C полужидким агаром Мюллер-Хинтона (“HiMedia Laboratories Pvt. Ltd”) вносили суспензию тест-штамма *Staphylococcus aureus* FDA209P до конечной концентрации 0.5 ед. по Мак-Фарланду, перемешивали и наслаивали по 5 мл на чашки с уже разлитым слоем агара. Чашки оставляли до застывания агара и слегка подсушивали. На подготовленные чашки наносили по 10 мкл двукратных разведений исследуемого раствора фермента. Чашки инкубировали при температуре 37°C. Учет результатов проводили через 16–18 ч.

Тест-штаммы *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* FDA209P (ATCC 6538), *S. aureus* В 8479, (MRSA), *S. aureus* ATCC BAA 1717 (MRSA), *S. aureus* ATCC BAA 1707, (MRSA) получены из музея “ГКПМ-Оболенск” (Россия). Остальные штаммы – *S. xylophilus* 4/71, *S. xylophilus* 2/12, *S. warnerii* 1/136, *S. sciuri* 5/4, *S. sciuri* 5/21, *S. sciuri* 5/108, *S. piscifermentans* 4/2, *S. pasteurii* 5/103, *S. hyicus* 2, *S. haemolyticus* 5/41, *S. haemolyticus* 1/1, *S. gallinarum* 7, *S. gallinarum* 4/87, *S. gallinarum* 2/33, *S. gallinarum* 2/134, *S. gallinarum* 1/125, *S. equorum* мтц45, *S. equorum* 5/36, *S. equorum* 5/22, *S. equorum* 1/133, *S. condimentii* 4/44, *S. cohnii* 3/5, *S. chromogenes* 2/57, *S. aureus* мт2, *S. aureus* 5/77, *S. aureus* 5/23, *S. aureus* 3/135, *S. aureus* 2/137, *S. arletae* 4/39, *S. arletae* 3/13 выделены из клинического материала от птиц и

свиней в лаборатории “ГКПМ-Оболенск” (Россия).

Тестирование чувствительности к противомикробным препаратам проводилось диск-диффузионным методом на чашках с агаром Мюллера-Хинтона (“HiMedia Laboratories Pvt. Ltd”, Индия) в соответствии с рекомендациями руководства Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI 2012, Франция). Штаммы тестировали на чувствительность к пятнадцати антибиотикам разных классов: ванкомицин (Va – 10 мкг/диск), хлорамфеникол (С – 30 мкг/диск), Клиндамицин (Cd – 10 мкг на диск), канамицин (К – 30 мкг на диск), линезолид (Lz – 10 мкг на диск), амикацин (Ak – 30 мкг на диск), виргинамицин (Vi – 15 мкг на диск), тобрамицин (Tb – 10 мкг на диск), тетрациклин (Т – 30 мкг на диск), стрептомицин (S – 10 мкг на диск) – все “HiMedia Laboratories Pvt.” (Индия), тейкопланин (Te – 30 мкг на диск), эритромицин (Е – 5 мкг на диск), левофлоксацин (Le – 5 мкг на диск), метициллин (М – 10 мкг на диск), бензилпенициллин (Р – 10 мкг на диск) – Bioanalyse (Диакон, Россия). Анализы проводились в двух повторах.

Видовую принадлежность исследуемого микроорганизма определяли с помощью масс-спектрометрического анализа MALDI TOF (“Bruker Daltonics” Германия). Подготовку проб проводили согласно предложенной методике [13]. Экстракцию белков осуществляли согласно протоколу компании “Bruker Daltonics” (Германия). Также использовали метод прямого нанесения культуры на мишень. Результаты исследований были автоматически обобщены с использованием программы FlexAnalysis (версия 3.3) (“Bruker Daltonics” Германия).

Биохимические свойства оценивали с помощью набора “Staphy-test” (“Lachema”, Чехия).

Выделение и очистка фермента. Стафилолитическую активность определяли, используя в качестве субстрата живые клетки *S. aureus* FDA209P. За 1 единицу (ед.) активности принимали снижение оптической плотности клеточной суспензии вдвое, в течение 10 мин в объеме 6 мл при начальной оптической плотности $D_{620} \approx 0.250$ и температуре 37°C с учетом значения спонтанного лизиса контрольной суспензии микробных клеток. Исходная активность раствора фермента была не более 4.5 ед./мл. Конечная концентрация фермента во всех экспериментах составляла ~85–100 нг/мл (0.13–0.15 ед./мл).

Определение антистафилококковой активности стафилолитической амидазы из *S. hyicus* В-8870 проводили по той же методике, используя в качестве субстрата суспензии клеток референсных штаммов и клинических изолятов различных видов стафилококков.

Хроматографическую очистку стафилолитической амидазы из *S. hyicus*-887 проводили на хроматографе ÄKTA start (“Cytiva”, США) с программным обеспечением UNICORN start 1.0, на колонке с носителем CM-Sepharose Fast Flow (“Cytiva”), объемом 100 см³, уравновешенным буферным раствором (5 мМ трис-НСl, рН 7.8). Освобождение от балластных веществ проводили тем же буферным раствором, содержащим 250 мМ NaCl. Элюцию фермента проводили, увеличивая концентрацию NaCl до 500 мМ. Концентрацию белка оценивали спектрофотометрически по поглощению раствора при D_{280} . Раствор фермента хранили при -70°C .

Степень чистоты фермента оценивали электрофорезом по Лэмли с соавт. [14] в 15%-ном ПААГ, с использованием маркерных белков P126628 (“Thermo Fisher Scientific”, Германия).

Аминокислотная последовательность. Аминокислотную последовательность фермента определяли методом масс-спектрометрии. Анализируемый белок подвергали независимому гидролизу тремя протеазами (трипсин, химотрипсин и протеиназа К). Полученные пептиды разделяли с помощью нанопотоковой хроматографии на хроматографе Easy nLC1000 (“Thermo Fisher Scientific”, США), разделение пептидов проводили на капиллярной колонке C18 с зернением 3.5 мкм, с порами 100 Å. Длина колонки составляла 150 мм, диаметр колонки 0.075 мкм. Разделение проводили в градиенте ацетонитрила 5–80% в течение 90 мин, скорость потока растворителя при хроматографии составила 250 нл/мин. В качестве детектора использовали масс-спектрометр высокого разрешения Orbitrap Elite (“Thermo Fisher Scientific”, Германия). Пептиды, элюируемые с колонки ионизировали методом наноэлектрораспыления. Напряжение на входном капилляре составляло 1.9 кВ, температура входного капилляра – 200°C . Ионы пептидов анализировали с помощью тандемной масс-спектрометрии, фрагментацию ионов инициировали соударением с инертным газом (азотом), в высокоэнергетической ячейке соударений. Панорамные спектры записывали в диапазоне 300–160 m/z с разрешением 60000, спектры фрагментации записывали в диапазоне 100–2000 m/z с разрешением 15000.

Анализ полученных результатов проводили с помощью коммерческой программы Peaks Studio 7.5. При идентификации белка использовали следующие параметры: ошибка в измерении массы не более 10.0 ppm, ошибка в определении масс фрагментов не более 0.3 Да. В качестве возможных модификаций аминокислот использовали окисление метионинов и модификацию муравьиной кислотой.

Расчет коэффициента поглощения раствора белка 1 мг/мл при 280 нм, проводили по формуле:

$(5700n\text{Tyr} + 1300n\text{Trp})/M$, где M – молекулярная масса, n – количество аминокислотных остатков.

Физико-химические свойства. Зависимость ферментативной активности от рН исследовали в ацетатном (рН 6.4–6.8), фосфатном (рН 7.0–8.3) и трис-НСl (рН 8.5–9.0) 5 мМ буферных растворах, переводя в них суспензию стафилококковых клеток центрифугированием (4200 g, 15 мин) и 3-кратной промывкой. Замену буферных растворов в растворе фермента проводили на колонках с сефадексом PD MiniTrap G 25 (“Cytiva”, США), уравновешенных соответствующими буферными растворами. Температурную зависимость ферментативной активности исследовали в 5 мМ трис-НСl буферном растворе. В этом же растворе проводили исследования по влиянию концентрации NaCl на активность фермента. Все эксперименты проводились с использованием, в качестве контроля, суспензии стафилококковых клеток в соответствующих условиях без присутствия раствора фермента.

Кинетические свойства. Кинетические характеристики определяли на приборе Multiskan Sky (“Thermo Fisher Scientific”) в 96-луночном планшетном формате, при температуре 37°C , измеряя D_{620} суспензии клеток, не превышающую 0.9. Конечная концентрация фермента составляла 420 нг/мл. За скорость ферментативной реакции принимали снижение оптической плотности суспензии клеток *S. aureus* FDA 209P за 1 мин ($\Delta D_{620} \text{ мин}^{-1}$), с учетом значения спонтанного лизиса культуры. Кажущиеся константы $K_{m(\text{каж})}$ и $V_{\text{max}(\text{каж})}$ определяли по первичным экспериментальным данным в программе “Prism 9.3.”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

При оценке клинических изолятов сельскохозяйственной птицы был выделен микроорганизм с выраженной антистафилококковой активностью, обнаруженной, в ходе совместного роста при высеве патологического материала из подглазничного синуса бройлера на плотную питательную среду. Биохимические показатели, определенные методом “STARPHY-test”, выявили принадлежность изолята к виду *Staphylococcus hyicus*. Биохимические показатели отличались от стандартных лишь по показателям расщепления лактозы, галактозы и утилизации нитрата. Последний показатель, свойственный 70–80% штаммов, отсутствовал у данного микроорганизма (табл. 1).

Биохимические показатели штамма *Staphylococcus hyicus* В-8870. Методом масс-спектрометрического анализа MALDI TOF, определена принадлежность изолята к виду *Staphylococcus hyicus*.

В ходе совместного культивирования изолята *S. hyicus* с тестовым штаммом *S. aureus* FDA 209P на плотной питательной среде LB, было отмечено

Таблица 1. Биохимические показатели штамма *Staphylococcus hyicus* В-8870

Биохимический показатель, "STAPHYtest"								
VPT	URE	ARG	ORN	BGA	GLR	ESL	NIT	PHS
Стандарт								
–	d	+	–	–	(+)	–	+	+
Штамм В-8870								
–	–	+	–	–	–	–	–	+
GAL	SUC	TRE	MAN	XYL	MLT	MNS	LAC	OXI
Стандарт*								
+	+	+	–	–	–	+	+	–
Штамм В-8870*								
–	+	+	–	–	–	+	–	–

• * Продолжение.

Таблица 2. Очистка стафилолитической амидазы из культуральной жидкости *S. hyicus* В-8870

Стадия очистки	Объем, мл	Белок, мг/мл	Активность, ед./мл	Суммарная активность, ед.	Выход, %
Культуральная жидкость	930	–	11	10230	100
Элюат	45	0.5	205	9225	90

подавление роста колоний последнего. В процессе культивирования штамма-продуцента *S. hyicus* В-8870 на жидкой питательной среде LB до достижения значения поглощения D_{620} 9.2 была получена культуральная жидкость, обладающая антистафилококковой активностью. После отделения биомассы центрифугированием из супернатанта ме-

тодом ионообменной хроматографии, был выделен (рис. 1, табл. 2) электрофоретически чистый белок. По результатам электрофореза в ПААГ (рис. 2) белок имел молекулярную массу ~14 кДа.

Небольшая (для ферментов) молекулярная масса предполагала пониженную иммуногенность в ходе возможного парентерального применения, а степень чистоты выделенного белка была достаточной для успешного определения его первичной последовательности.

Специфическую активность фермента оценивали в Spot-тесте на агаризованной среде с культурой тест-штамма *S. aureus* FDA 209P. Как видно из результатов Spot-теста, зона просветления наблюдалась вплоть до 12 разведения раствора фермента, что составляло 103 пг в пробе.

Штамм-продуцент стафилолитической амидазы *S. hyicus* был депонирован в государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур "ГКПМ – Оболенск" под номером В-8870.

Ферментативную активность выделенного белка проверяли на клинических изолятах, а также тестовых, в том числе метициллинрезистентных и полирезистентных штаммах стафилококков (рис. 4). Помимо стафилококков, были исследованы и другие грамположительные микроорганизмы родов *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Listeria*, *Bacillus* в качестве субстратов для ферментативной активности белка

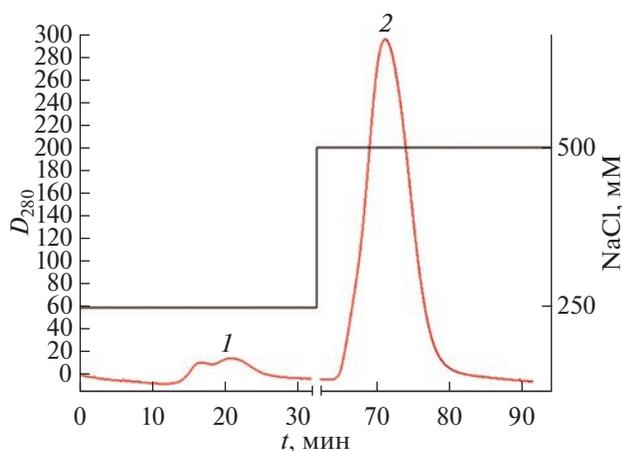


Рис. 1. Хроматограмма очистки стафилолитической амидазы из *S. hyicus* В-8870 катионообменной хроматографией: 1 – промывка колонки от балластных веществ буферным раствором, содержащим 250 мМ NaCl; 2 – элюция белка буферным раствором, содержащим 500 мМ NaCl.

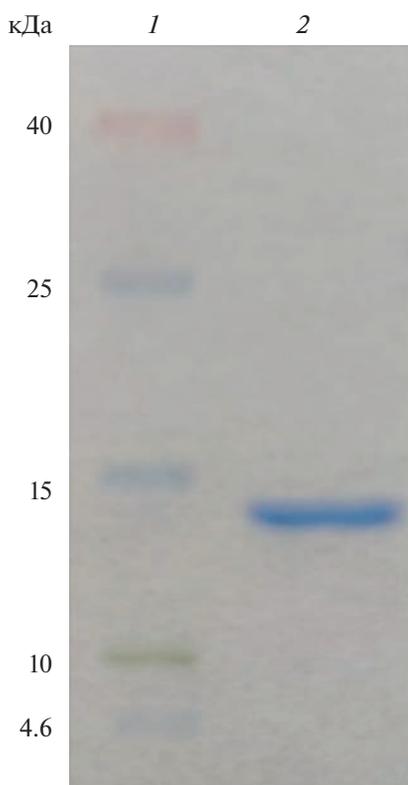


Рис. 2. Электрофорез образца очищенной катионообменной хроматографией стафилолитической амидазы из *S. hyicus* В-8870 в 15%-ном ПААГ с ДДС-Na: 1 – маркерные белки Р126628; 2 – очищенная стафилолитическая амидаза из *S. hyicus* В-8870.

(не включены в рис. 4). В этих случаях не наблюдалось бактериолитической активности фермента.

Бактериолитическая активность фермента из *S. hyicus* В-8870 проявлялась в отношении всех исследованных клинических изолятов и референсных штаммов стафилококков, что свидетельствовало о широком спектре литических свойств исследуемого фермента в отношении микроорганизмов *Staphylococcus* spp.

В результате идентификации белка хромато-масспектрометрическим анализом, были найдены 34 уникальных пептида соответствующие стафилолитической амидазе. Таким образом показано, что выделенный белок, действительно, является стафилолитической амидазой. Первичная структура стафилолитической амидазы, определенная хромато-масспектрометрическим анализом приведена ниже:

GluGluIleAspLysTyrProArgProValLysSerAlaGlnProAsnTyrHisTrpLysAsnAsnCysThrTrpCysValHisAsnLysArgAsnGlnThrLysArgTyrLeuProSerHisPheThrHisAlaLysAsnTrpLeuSerGluAlaLysLysAlaGlyPheLysThrGlyLysArgProLeuAlaGlyAlaValLeuGlnThrProLysGlyGlyAspGlyLeuGlyHisValAlaPheValGluPheValAsnAlaAsnGlySerIleLysIleSerGluTyrAsnTyrAsnValA

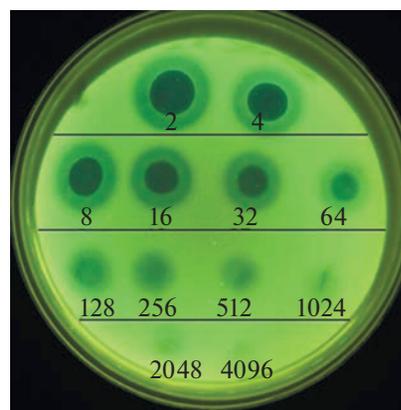


Рис. 3. Spot-тест антистафилококковой активности фермента из *S. hyicus*. Начальное количество белка в пробе 420 нг. Цифрами указаны двукратные разведения образца раствора фермента.

rgLeuGlyTyrGlyThrArgThrLeuThrLysAlaGlnAlaAlaThrTyrAsnTyrIleTyr

При оценке аминокислотной последовательности в базе данных NCBI показано 98%-ное сходство участка СНАР-домена фермента стафилолитической амидазы из *S. sciuri* DD 4747 [15] с аминокислотной последовательностью фермента из *S. hyicus* В-8870. Белок из *S. hyicus* В-8870 состоит из 123 аминокислотных остатков, 12 из которых (выделены в табл. 3) не соответствовали участку первичной последовательности белка из *S. sciuri* DD 4747, что составляло 9.8% (табл. 3).

По первичной структуре была определена молекулярная масса фермента, которая составила 13993 Да. Вычислен коэффициент поглощения белка при $D_{280} - \epsilon \frac{\text{МГ}}{\text{МЛ}}$ 3.94, а также значение изоэлектрической точки pI 10.35. На основании этих данных определена удельная активность фермента – 1518 ед./мг. Определена зависимость ферментативной активности стафилолитической амидазы от температуры. Ее максимальное значение находилось около 40°C. Начиная с 45°C активность резко падала и к 60°C практически полностью утрачивалась (рис. 5).

Представленные результаты определения рН-оптимума активности фермента и ее зависимости от концентрации NaCl в растворе (рис. 6), совпадали с результатами, приведенными в работе [16], в которой представлены близкие показатели для клонированного фрагмента бактериофагового эндолизина СНАР_{LysGH15}. Обладая заметной антимикробной активностью, в отношении референс-штамма метициллинрезистентного *S. aureus* 2701, фрагмент СНАР_{LysGH15} так же показал отрицательную корреляцию ферментативной активности с концентрацией NaCl, а температурный оптимум

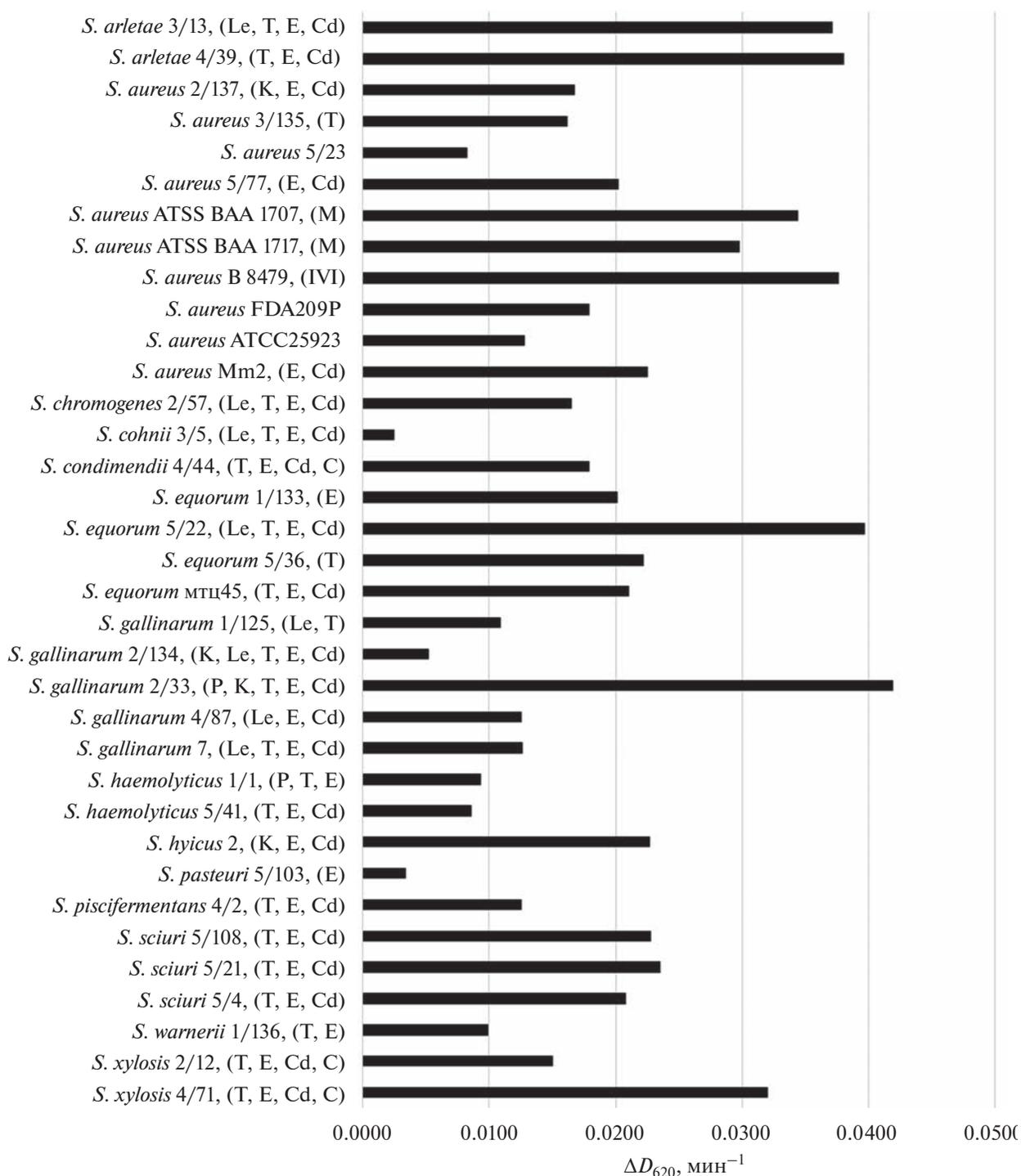


Рис. 4. Средняя скорость лизиса стафилококковых клеток стафилолитической амидазой из *S. hyicus* B-8870.

находился в пределах 40°C, что подтвердило сходство исследуемого белка с СНАР-доменом.

Ингибирующее действие ионов NaCl было подтверждено исследованием кинетических характеристик фермента. При отсутствии в буфер-

ном растворе ионов соли (NaCl) значения $K_{m(\text{каж})}$ и $V_{\text{max}(\text{каж})}$ были соответственно равны $0.5 D_{620}$ и $0.011 \Delta D_{620} \text{ мин}^{-1}$. С повышением концентрации NaCl значение $K_{m(\text{каж})}$ в реакции гидролиза амидазой суспензии стафилококковых клеток возрас-

Таблица 3. Сравнение аминокислотных последовательностей N-ацетилмуромил L-аланинамидазы из *S. sciuri* и амидазы из *S. hyicus*

Штаммы	Аминокислотная последовательность					
<i>S. sciuri</i> DD 4747	MGSNIQGENI	LNKKIATYT	VLSTLVLTF	TNIDTGVKNF	TQHEAKAAAI	DKYPRPIKTA
<i>S. hyicus</i> B-8870					EEI	DKYPRPVKSA
	QPNYHWKNNC	TWYVHNKRNQ	TKRYLPSSFT	HAKNWLSEAK	KAGFKTGKTP	LAGAILQTSK
	QPNYHWKNNC	TWCVHNKRNQ	TKRYLPSHFT	HAKNWLSEAK	KAGFKTGKRP	LAGAVLQTPK
	GGGGLGHVAF	VEKVNANGSI	KISEYNYNVS	LGYGTRTLTK	AQAATYNYIY	
	GGDGLGHVAF	VERVNANGSI	KISEYNYNVR	LGYGTRTLTK	AQAATYNYIY	

тало (табл. 4), а при концентрации соли 0.4 М не определялось, ввиду практически полной остановки ферментативной реакции, что свидетельствует об ухудшении связывания фермента с субстратом и ингибировании NaCl активности фермента, которое носит обратимый характер, поскольку перевод фермента и субстрата в буферный раствор без

NaCl полностью восстанавливал литические свойства амидазы.

Таким образом, согласно полученным результатам, штамм *S. hyicus* B-8870 обладал способностью при культивировании в среде LB секретировать в культуральную жидкость антистафилококковый лизин со стафилолитической амидазной активностью, который по своей первичной последовательности и физико-химическим характеристикам представлял СНАР-домен, обладающий литической активностью в отношении 14 исследованных видов микроорганизмов рода *Staphylococcus*, в том числе метициллинрезистентных и полирезистентных штаммов. Молекулярная масса исследованного фермента 13993 Да, коэффициент поглощения при 280 нм – $\epsilon_{\frac{\text{МГ}}{\text{МЛ}}}$ 3.94, значение изоэлектрической точки – pI 10.35. Удельная активность фермента по отношению к клеточной суспензии *S. aureus* FDA 209P – 1518 ед./мг, оптимум pH – 7.7 и температуры – 40°C. Исследован-

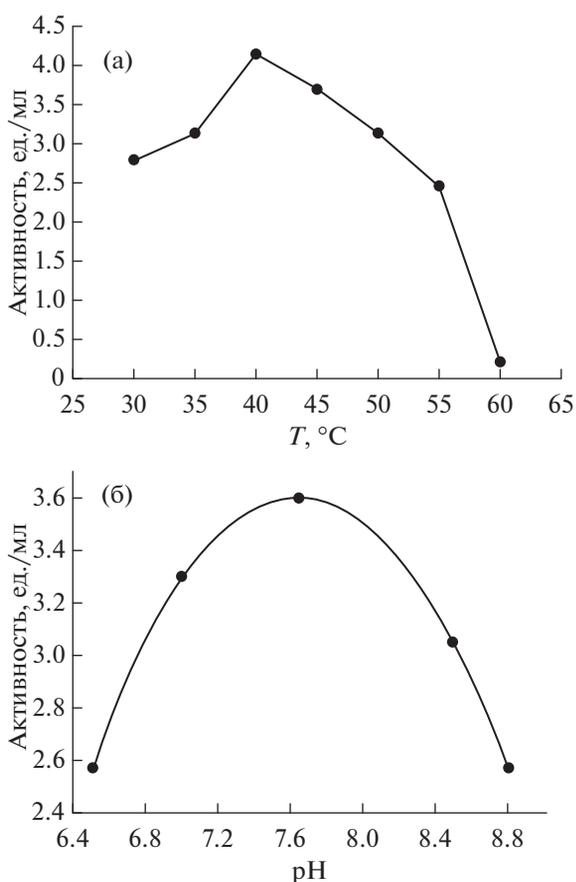


Рис. 5. Зависимость активности стафилолитической амидазы из *S. hyicus*-8870 от температуры (а) и pH буферного раствора (б).

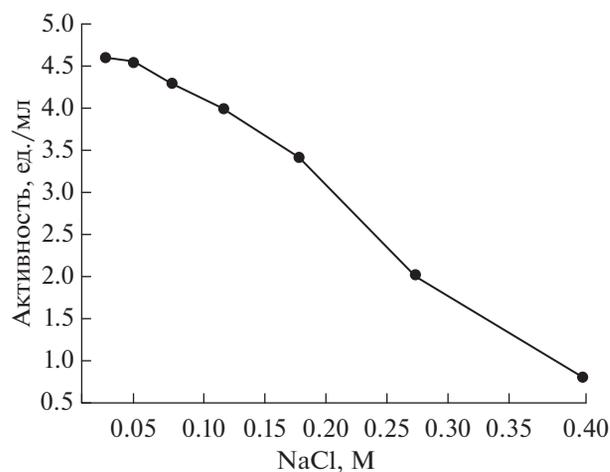


Рис. 6. Зависимость ферментативной активности стафилолитической амидазы от концентрации NaCl в растворе.

Таблица 4. Влияние ионов NaCl на кинетические параметры лизиса клеток *S. aureus* FDA 209P при действии амидазы из *S. hyicus* B-8870

[NaCl], М	K_m (каж), D_{620}	V_m (каж), ΔD_{620} мин ⁻¹
0	0.5	0.011
0.05	2.2	0.038
0.15	5.8	0.035
0.2	7.8	0.086
0.4	—	—

ный фермент может быть перспективным кандидатом для создания рекомбинантного ферментного антистафилококкового препарата как медицинского, так и ветеринарного назначения. Кроме того, фермент может быть использован в диагностических и лабораторных целях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Karam G., Chastre J., Wilcox M., Vincent J.-L. // Critical Care. 2016. V. 20. P. 136–145.
2. Vermassen A., Leroy S., Talon R., Provot C., Popowska M., Desvaux M. // Front. Microbiol. 2019. V. 10. P. 331–358.
3. Son B., Kong M., Ryu S. // Viruses. 2018. V. 10. P. 284–296.
4. Fujiki J., Nakamura T., Furusawa T., Ohno H., Takahashi H., Kitana J., Usui M., Higuchi H., Tanji Y., Tamura Y., Iwano H. // Pharmaceuticals. 2018. V. 11. P. 25–44.
5. Bateman A., Rawlings N.D. // Trends Biochem. Sci. 2003. V. 28. P. 234–237.
6. Rigden D.J., Jedrzejewski M.J., Galperin M.Y. // Trends Biochem. Sci. 2003. V. 28. P. 230–234.
7. Llull D., Lopez R., Garcia E. // FEBS Lett. 2006. V. 580. P. 1959–1964.
8. Becker S.C., Dong S., Baker J.R., Foster-Frey J., Pritchard D.G., Donovan D. M. // FEMS Microbiol. Lett. 2009. V. 294. P. 52–60.
9. Frankel M.B., Schneewind O. // J. Biol. Chem. 2012. № 287. P. 10460–10471.
10. Zou Y., Hou C. // Comput. Biol. Chem. 2010. V. 34. P. 251–257.
11. Li X., Wang S., Nyaruaba R., Liu H., Yang H., Wei H.A. // Antibiotics. 2021. V. 10. P. 461–474.
12. Ennahar S., Sashihara T., Sonomoto K., Ishizaki A. // FEMS Microbiol. Rev. 2000. V. 24. P. 85–106.
13. Alispahic M., Hummel K., Jandreski-Cvetkovic D. et al. // J. Med. Microbiol. 2010. V. 59. P. 295–301.
14. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227 № 5259. P. 680–685.
15. Heath L.S., Gargis S.R., Smithberg S.R., Johnson H.P., Heath H.E., LeBlanc P.A., Sloan G.L. // FEMS Microbiol. Lett. 2005. V. 249. P. 227–231.
16. J., Yang R., Yu S., Zhao W. // J Dairy Sci. 2021. V. 104. P. 2641–2653.

Isolation, Purification and some Properties of Staphylolytic Enzyme from *Staphylococcus hyicus*

T. V. Fedorov^a, *, M. G. Teymurazov^a, A. K. Surin^a, O. I. Tazina^a, and S. F. Biketov^a

^a “State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology” of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, Obolensk, Serpukhov District, Moscow Region, 142279 Russia

*e-mail: tfedorov@yandex.ru

The paper presents data on the identification of a new staphylolytic enzyme from the cultural liquid of *Staphylococcus hyicus* B-8870. The primary sequence of the enzyme has the maximum similarity to the CHAP domain of N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase from *Staphylococcus sciuri* DD 4747. The enzyme is active against a wide range of microorganisms of the *Staphylococcus* genus, including MRSA strains. The molecular weight of the enzyme is 13993 Da, the absorption coefficient at 280 nm is $\epsilon_{\frac{\text{mg}}{\text{ml}}}$ 3.94, the value of the isoelectric point pI 10.35. The specific activity of the enzyme in relation to the cell suspension of *S. aureus* FDA 209P is 1518 U/mg with an optimum pH of 7.7 and a temperature of 40°C.

Keywords: *Staphylococcus hyicus*, CHAP domain, Staphylolytic enzyme, MRSA

УДК 577.151.45

СРАВНЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНЫХ ХИМОЗИНОВ АЛЬПАКА (*Vicugna pacos*), ПОЛУЧЕННЫХ В ПРО- И ЭУКАРИОТЕЧЕСКОЙ СИСТЕМАХ ЭКСПРЕССИИ

© 2023 г. С. В. Беленькая^{1, 2}, В. В. Ельчанинов³, В. Ю. Чиркова⁴, Д. Н. Щербаков^{1, 4} *

¹ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”
Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, 630559 Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

³ Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, Сибирский НИИ сыроделия, Барнаул-51, 656910 Россия

⁴ Алтайский государственный университет, Барнаул, 656049 Россия

*e-mail: dshcherbakov@gmail.com

Поступила в редакцию 28.03.2023 г.

После доработки 23.04.2023 г.

Принята к публикации 28.04.2023 г.

На основе дрожжей *Kluyveromyces lactis* разработан штамм-продуцент рекомбинантного прохимозина альпака (*Vicugna pacos*). Проведен сравнительный анализ биохимических свойств рекомбинантного химозина альпака, полученного в системах экспрессии *K. lactis* и *Escherichia coli*. Установлено, что рекомбинантный химозин альпака, синтезированный в *K. lactis* превосходил аналог, полученный в *E. coli*, по числу оборотов фермента в 12.9 раза, а по каталитической эффективности – в 2.9 раза. По сравнению с химозином, экспрессированным в *E. coli*, фермент, полученный в эукариотическом продуценте, имел повышенный на 5°C порог термостабильности. Замена прокариотического продуцента на эукариотический, усиливала падение молокосвертывающей активности фермента в ответ на изменение рН молока от 6.1 до 6.9, что сопровождалось увеличением продолжительности коагуляции на 8–35%. При повышении концентрации CaCl₂ в субстрате коагуляционная активность целевого фермента, синтезированного в *E. coli* была на 12–14% выше, чем у его аналога, полученного в *K. lactis*.

Ключевые слова: рекомбинантный химозин альпака, прокариотическая система экспрессии, эукариотическая система экспрессии, *Kluyveromyces lactis*, биохимические свойства, кинетика Михаэлиса-Ментен

DOI: 10.31857/S0555109923050033, **EDN:** NMCTLZ

Химозин (Хн) (КФ 3.4.23.4) – аспарагиновая протеаза, которая широко применяется в качестве коагулянта молока при производстве различных видов сычужных сыров. Традиционно Хн получали из сычужков молочных телят, но сегодня его основным источником являются генетически модифицированные штаммы микроорганизмов [1]. Актуальность исследования новых видов рекомбинантных Хн (рХн) обусловлена возможностью обнаружения ферментов, превосходящих по комплексу биохимических свойств уже известные генно-инженерные коагулянты молока [2].

Общеизвестно, что у прокариотов, в отличие от эукариотов, почти полностью отсутствуют посттрансляционные модификации (ПТМ) белков. В подавляющем большинстве случаев, одни и те же рекомбинантные белки, полученные в про- и эукариотической системе экспрессии, различаются по физико-химическим и биохимическим характеристикам. Однако однозначного от-

вета на вопрос о характере влияния системы экспрессии на биохимические свойства получаемых рекомбинантных белков – не существует. Литературные данные, посвященные изучению этого вопроса, [3–9] свидетельствуют, преимущественно, о том, что *a priori* прогнозировать влияние системы экспрессии на биохимические свойства целевого рекомбинантного белка крайне затруднительно.

Сравнение свойств субъединицы В термолabileного энтеротоксина (ЛТВ) кишечной палочки, полученного в системах экспрессии *Pichia (Komagataella) pastoris* и *Escherichia coli*, показало, что в первом случае, за счет гликозилирования, целевой белок имел большую молекулярную массу, а также повышенную аффинность к ганглиозиду GM1, что усиливало его иммуноадаптивные свойства. Интересно, что уровень экспрессии ЛТВ в системе *P. pastoris* был примерно в 3 раза

выше, чем в гомологичном для этого белка прокариотическом продуценте [3].

В работе [4] представлен сравнительный анализ кинетических параметров рекомбинантной дофамин-сульфотрансферазы человека, синтезированной в системах продукции *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* и в клетках млекопитающих (трансформированные фибробласты обезьяны, линия COS-7 и фибробласты хомячка, линия V79). Показано, что K_m сульфотрансфераз, экспрессированных в про- и эукариотических системах были примерно равны и составляли около 1 мкМ. В то же время, отношение V_{max}/K_m у фермента, полученного в *E. coli*, было в 31, 138 и 629 раз выше, чем для сульфотрансфераз, синтезированных в *S. cerevisiae*, V79 и COS-7, соответственно.

Система экспрессии — *P. pastoris* или *E. coli* — не оказывала влияния на pH- и температурный оптимумы рекомбинантной фитазы бактерий рода *Shigella*. Оба фермента проявляли высокую специфичность к фитиновой кислоте и были резистентны к действию трипсина. Однако удельная активность фермента, полученного в эукариотическом продуценте, была в 3.1 раза ниже. По термостабильности при 60 и 70°C фитаза, синтезированная клетками *P. pastoris*, превосходила фермент, синтезированный в системе экспрессии *E. coli*, на 33 и 24% соответственно [5].

По данным [6], при экспрессии рекомбинантной монооксигеназы 1B1 кролика система (*E. coli* или *S. cerevisiae*) не оказывала достоверного влияния на термостабильность, электрофоретические и каталитические свойства фермента.

Противоречивые данные получены для рекомбинантных белков и ферментов, вовлеченных в систему гемостаза. Генно-инженерные внеклеточные домены тканевого фактора человека, синтезированные в дрожжах (*S. cerevisiae*), бактериях (*E. coli*) и клетках млекопитающих (культура СНО), обладали почти идентичными прокоагулянтными свойствами и, согласно спектрам ядерного магнитного резонанса, кругового дихроизма и флуоресценции, демонстрировали высокую структурную гомологию [7]. Фибринолитическая активность рекомбинантной человеческой урокиназы, полученной в бактериях (*E. coli*) и клеточных культурах млекопитающих (клетки миеломы мыши), была в 5 раз выше, чем у аналога, синтезированного в дрожжах (*P. pastoris*) [8].

Рекомбинантные сахарозосинтазы 1 картофеля, экспрессированные в *S. cerevisiae* и *E. coli* колличественно и качественно различались по субстратной специфичности, а также по параметрам кинетики Михаэлиса–Ментен [9]. Сравнение биохимических свойств рекомбинантных химозинов, синтезированных в про- и эукариотических системах экспрессии, не проводилось.

Таким образом, скудные и неоднозначные экспериментальные данные не позволяют обобщить наши представления о влиянии системы экспрессии на свойства целевого рекомбинантного фермента и в каждом конкретном случае требуют экспериментального изучения.

Цель работы — сравнительный анализ биохимических свойств рекомбинантного химозина альпака (pXh-Vic), полученного в системах экспрессии *E. coli* (pXh-Vic-EC) и *K. lactis* (pXh-Vic-KL).

МЕТОДИКА

Конструирование экспрессионного вектора. Для получения рекомбинантного прохимозина (pПроXh) альпака в дрожжевой системе был сконструирован оригинальный плазмидный вектор pPOG-Vic (рис. 1), обеспечивающий синтез и секрецию зимогена целевого белка клетками *K. lactis*. Вектор включал следующие структурные элементы: последовательность промотора глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (GAP), сигнальную последовательность (Ost2); нуклеотидную последовательность прохимозина альпака (VIC); терминатор транскрипции гена цитохром С-оксидазы *S. cerevisiae* (CYC); промотор гена алкогольдегидрогеназы (ADH1 promoter); ген фактора устойчивости к зеоцину (BleoR); ориджин репликации (ori); ген фактора устойчивости к ампициллину (AmpR).

Фрагменты вектора (рис. 1) были амплифицированы с использованием рассчитанных праймеров (табл. 1), выделены из агарозного геля и очищены при помощи набора Cleanup Standard (“Евроген”, Россия).

Сборку фрагментов ДНК проводили с использованием Gibson Assembly Master Mix (“NEB”, США). Полученной реакционной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* (штамм NEB Stable). Для проверки корректности сборки, плазмидную ДНК клонов секвенировали по методу Сэнгера. В результате получали вектор pPOG-Vic (рис. 1).

Получение pXh альпака в системе экспрессии *K. lactis*. Для получения рекомбинантного штамма-продуцента, электрокомпетентные клетки *K. lactis* (штамм SVB-1) трансформировали вектором pPOG-Vic. Клетки продуцента pПроXh альпака культивировали по ранее описанной методике [10]. Зимоген, накапливающийся в культуральной жидкости, активировали путем ступенчатого изменения pH [11] и получали препарат pXh-Vic-KL.

Получение pXh альпака в системе экспрессии *E. coli*. Рекомбинантный Xh альпака, экспрессированный в системе *E. coli* (штамм BL21), получали по методике, описанной в работе [12].

Исследование биохимических свойств. Для сравнения полученных pXh использовали пока-

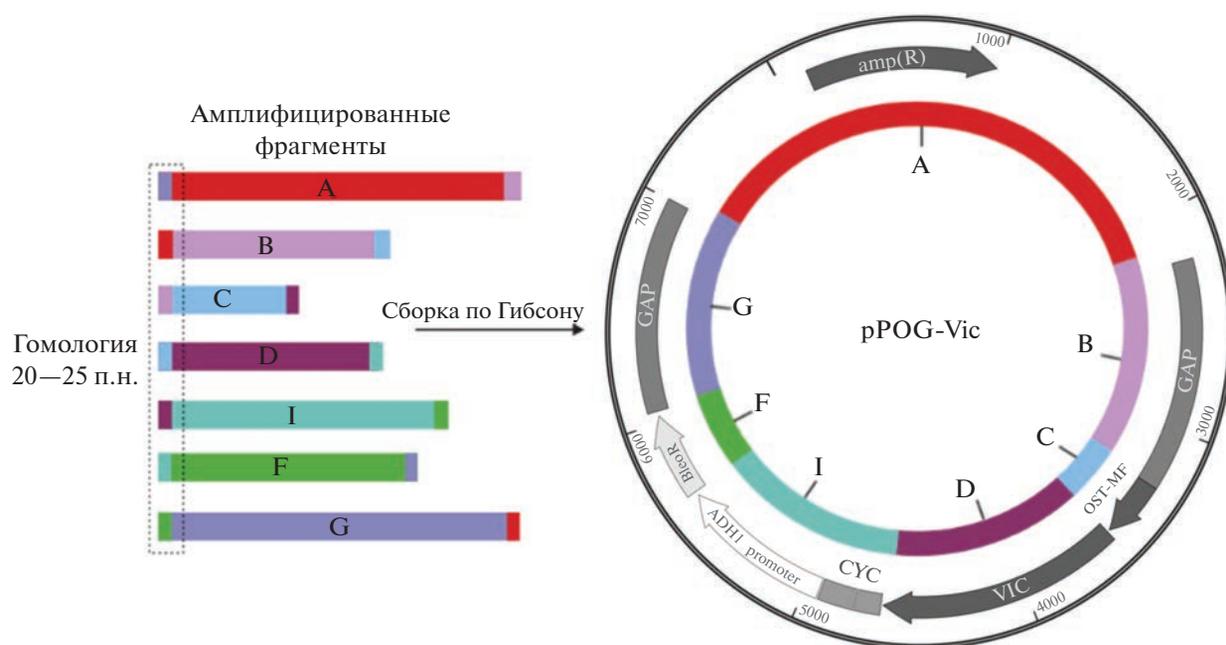


Рис. 1. Схема конструирования вектора pPOG-Vic.

затели кинетики Михаэлиса–Ментен и биохимические свойства, характеризующие молокосвертывающие протеиназы: молокосвертывающую активность (МА), общую протеолитическую активность (ПА), коагуляционную специфичность (МА/ПА), термостабильность (ТС), зависимость

МА от pH и концентрации ионов кальция в молочном субстрате.

Общую и удельную МА, неспецифическую ПА, МА/ПА, ТС и зависимость МА от pH, концентрации ионов кальция определяли по методикам, опубликованным в работах [13, 14]. При опреде-

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры, использованные для амплификации компонентов вектора pPOG-Vic

Название	Последовательность (5'–3')	Матрица	ПЦР-продукт
A-F	gaattctaagtatcccgggaagctt	pJet 1.2	ori и AmpR
A-R	aggtagtatgacctgcagtaagtatcacgtgaagctt		
B-F	aggtcatactacctcggaagattcc	ДНК <i>K. lactis</i>	5'-GAP
B-R	ccaaactgtctcattgtgtaataattcttttttactgaaactg		
C-F	gaatattacacaatgagacaagtttggttctcttggatcg	pGH-Ost2	Ost2
C-R	ggatccagcctctctttttcca	pGH-Vic	VIC
D-F	agagaggctggatccgcagagataactcgatatacctttatacaagggc		
D-R	aaggaaaagggcctgtcctaggctagatggcctttg	pKLAC2	CYC и ADH1 promoter
I-F	acaggcccctttctcttgtcg		
I-R	ggtggcagatctggaattgct	pPICZ	BleoR
F-F	agcaattccagatcgccacatggccaagttgaccagtg		
F-R	atcccagtcggtactgactcagtcctctctctcggc	ДНК <i>K. lactis</i>	3'-GAP
G-F	gtcagtaccgactgggatcttg		
G-R	tcccgggatacttagaattccatgtccgggtgtgacc		

Таблица 2. Параметры кинетики Михаэлиса-Ментен рекомбинантных химозинов

Препарат	V_{\max} , нМ/с	K_m , мкМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_m , мкМ ⁻¹ с ⁻¹
pXн-Vic-KL	938.3 ± 66.0	51.1 ± 1.5	150.1 ± 10.6	2.9 ± 0.3
pXн-Vic-EC	145.0 ± 14.5	11.6 ± 0.2	11.6 ± 1.2	1.0 ± 0.1
pXн-Bos	177.3 ± 29.8	22.9 ± 2.8	141.9 ± 23.9	6.2 ± 0.7

Таблица 3. Удельная молоковертывающая активность, общая протеолитическая активность и специфичность рекомбинантных химозинов

Препарат	Удельная МА, УЕ/мг	Удельная МА, %	Общая ПА, %	Специфичность, МА/ПА
pXн-Vic-KL	107500 ± 1182	129	26	5.0
pXн-Vic-EC	85710 ± 771	103	34	3.0
pXн-Bos	83394 ± 1167	100	100	1.0
pXн-Sam	134698 ± 1616	162	24	6.8

лении биохимических свойств в качестве ферментов сравнения использовали коммерческие препараты рХн коровы (**pXн-Bos**) и рХн верблюда (**pXн-Sam**), производства компании “Chr. Hansen” (Дания).

Определение параметров кинетики Михаэлиса-Ментен. Предельную скорость реакции (V_{\max}), константу Михаэлиса (K_m), число оборотов фермента (k_{cat}) и каталитическую эффективность (k_{cat}/K_m) определяли по методике [14], с использованием флуоресцентно меченого пептидного субстрата, имитирующего Хн-чувствительную область κ -казеина (κ -CN) коровы.

Статистическую обработку данных проводили в вычислительной среде программы Microsoft Excel (“Microsoft Corporation”, США). Результаты определения количественных переменных представлены в виде среднего арифметического (М) с указанием среднеквадратического отклонения ($\pm SD$). На графиках не указывали 95%-ный доверительный интервал, поскольку его значения были меньше 10% от значений переменных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Кинетика Михаэлиса-Ментен. Система экспрессии существенно влияла на кинетические параметры рХн-Vic (табл. 2). Значения K_m показали, что аффинность рХн-Vic-KL к флуоресцентно меченому пептидному субстрату в 4.4 и 2.2 раза ниже, чем у рХн-Vic-EC и рХн-Bos соответственно. По-видимому, активный центр рХн-Vic-KL быстрее освобождался от продуктов гидролиза субстрата, что отражалось на его k_{cat} и k_{cat}/K_m . В результате, рХн-Vic, синтезированный в *K. lactis*, превосходил аналог, полученный в *E. coli*, по числу оборотов фермента более чем на порядок (в

12.9 раза), а по каталитической эффективности – в 2.9 раза.

Превосходство рХн-Bos над рХн-Vic-EC и рХн-Vic-KL в каталитической эффективности может быть связано с различиями в первичной структуре Хн-чувствительных участков κ -CN коровы и представителей семейства Верблюдовые, к которым относится *Vicugna pacos*. По сравнению с κ -CN коровы, на участке E96-N119 κ -CN альпака обнаруживается 9 аминокислотных замен. Одна из них затрагивает Хн-чувствительную связь F105-M106, в которой наблюдается замена M106 → I [2].

Молоковертывающая активность, специфичность. Поскольку МА является частным случаем общей ПА фермента, направленной на гидролиз связи F105-M106 в молекуле κ -CN, для сравнения специфичности разных рХн используется соотношение МА/ПА. Специфичность новых видов рХн традиционно сравнивается с характеристиками рХн коровы – первого генно-инженерного коагулянта молока для сыроделия [1, 2, 15].

По специфичности рХн-Vic-KL и рХн-Vic-EC превосходили рХн коровы, но уступали рХн одногорбого верблюда. При этом, удельная МА рХн-Vic-KL оказалась на 25% выше, чем у рХн-Vic-EC. По сравнению с рХн-Vic, полученным в *E. coli*, экспрессия целевого фермента в *K. lactis* приводила к снижению его общей ПА на 24% (табл. 3). В результате, соотношение МА/ПА рХн-Vic-KL становилось в 5 раз выше, чем у рХн-Bos и приближалось к показателю рХн-Sam, специфичность которого по отношению к связи F105-M106 была максимальной среди известных молоковертывающих аспаратных протеиназ [1, 15].

Термостабильность. Порогом ТС считали температуру прогревания, при которой снижение остаточной МА фермента составляло $\geq 20\%$. Согласно данному критерию, пороги ТС рХн-Vic-

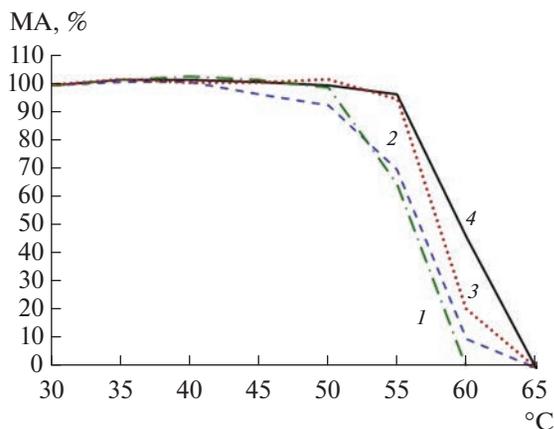


Рис. 2. Зависимость остаточной молокозвертывающей активности (МА, %) от температуры прогревания (T , °C): 1 – рХн-Bos; 2 – рХн-Vic-EC; 3 – рХн-Cam; 4 – рХн-Vic-KL.

ЕС и рХн-Vic-KL равны 55 и 60°C соответственно (рис. 2). Пороги ТС рХн коровы и верблюда также различались на 5°C, что согласуется с данными других авторов [1].

Низкую ТС рХн-Vic-EC можно объяснить незавершенным рефолдингом фермента, полученного в прокариотической системе экспрессии, в частности, неполным (или некорректным) замыканием дисульфидных связей. По данным [16] разрушение связи C45–C50 в молекуле рХн коровы, экспрессированного в *E. coli*, значительно снижает его ТС [16]. Другое возможное объяснение этого феномена – отсутствие ПТМ гетерологичных белков, полученных в *E. coli*. В частности, это относится к гликозилированию, которое может влиять на терморезистентность Хн. Так, в работе [17] приводятся данные, свидетельствующие о том, что при снижении степени гликозилирования рХн одногорбого верблюда ТС фермента падает.

Зависимость МА от рН. Говоря о влиянии рН на продолжительность ферментативного свертывания молока, необходимо учитывать два аспекта. Во-первых, концентрация H^+ влияет на баланс электростатических и гидрофобных сил, стабилизирующих мицеллы казеина [18, 19]. При повышении рН молока, суммарные отрицательные заряды казеинов увеличиваются. Как следствие, возрастают силы межмицеллярного электростатического отталкивания и ослабевают казеин-казеиновые гидрофобные взаимодействия, что негативно влияет на скорость сычужного свертывания молока. Во-вторых, изменение рН субстрата отражается на ферментативных свойствах Хн. Оптимумы активности различных вариантов рХн находятся в диапазоне рН 4.5–5.5 [https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.4.23.4#pH%20OP-

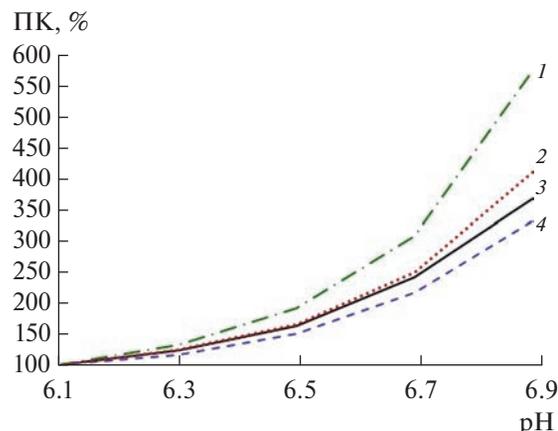


Рис. 3. Зависимость продолжительности коагуляции (ПК) от рН молочного субстрата: 1 – рХн-Bos; 2 – рХн-Cam; 3 – рХн-Vic-KL; 4 – рХн-Vic-EC.

ПТМУМ] и удаление от него приводит к снижению их коагуляционной способности.

По мере нарастания рН молока в диапазоне 6.1–6.9 скорость образования сгустка под действием генно-инженерных химозинов-замедляется [1].

Графики, представленные на рис. 3, показали, что наибольшую чувствительность к снижению концентрации H^+ в молочном субстрате демонстрировал рХн коровы, а наименьшую – рХн альпака, полученный в эукариотической системе продукции. При увеличении рН с 6.1 до 6.9 продолжительность коагуляции (ПК) молока, после внесения рХн-Bos, увеличивалась в 5.8 раза. Генно-инженерные Хн представителей семейства Верблюдовых (*Camelidae*) – одногорбого верблюда и альпака – были менее чувствительны к увеличению рН молока. Повышение рН с 6.1 до 6.9 замедляло свертывание молока, после внесения рХн-Vic-EC, рХн-Vic-KL и рХн-Cam, в 3.3, 3.7 и 4.1 раза соответственно.

Сравнивая рХн-Vic-EC и рХн-Vic-KL следует отметить постоянно увеличивающиеся различия в коагуляционной способности этих ферментов по мере увеличения рН субстрата. Если при рН 6.3 продолжительность свертывания молока под действием рХн-Vic-KL была всего на 8% больше, чем для рХн-Vic-EC, то при рН 6.9 эта разница составляла уже 35%. Таким образом, замена прокариотической системы экспрессии на эукариотическую усиливала негативную чувствительность коагуляционной активности рХн альпака к нарастанию рН субстрата в диапазоне 6.1–6.9, что приводило к увеличению продолжительности образования молочного сгустка на 8–35%.

Зависимость МА от концентрации ионов кальция. Внесение хлорида кальция в молоко ускоряет его свертывание под действием различных ви-

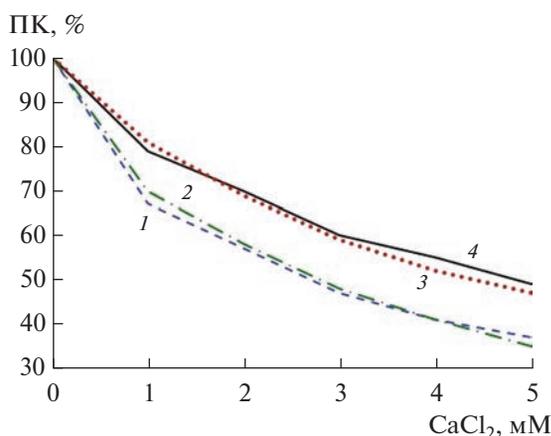


Рис. 4. Зависимость продолжительности коагуляции (ПК) от концентрации хлорида кальция (мМ) в молочном субстрате: 1 – рХн-Vos; 2 – рХн-Vic-EC; 3 – рХн-Sam; 4 – рХн-Vic-KL.

дов натуральных и генно-инженерных химозинов [1]. Стимулирующее действие экзогенного кальция обусловлено его влиянием и на первичную (ферментативную), и на вторичную (агрегационную) фазу сычужного свертывания молока. Повышение концентрации Ca^{2+} в молоке вызывает экранирование отрицательного заряда стабилизирующего “волоскового слоя”, который образуют на поверхности казеиновых мицелл анионные С-терминальные участки к-CN. Снижение плотности анионных групп на поверхности мицелл облегчает доступ молокосвертывающего фермента к Хн-чувствительной связи к-CN (F105–M106) и ускоряет удаление “волоскового слоя” в первичной фазе сычужного свертывания. Во вторичной фазе экзогенный кальций усиливает агрегацию дестабилизированных мицелл за счет образования ионных мостиков между фосфорилированными остатками серина альфа- и бэта-казеинов сокращая, тем самым, продолжительность коагуляции молока [20].

Коммерческие рХн различаются по чувствительности к концентрации ионов кальция в молоке. Согласно литературным данным [1, 13, 15], коагуляционная активность рХн одногорбого верблюда в меньшей степени зависит от концентрации хлорида кальция, чем активность рХн коровы.

В данном исследовании при внесении в молоко 1 мМ CaCl_2 продолжительность образования сгустка под действием рХн-Vos и рХн-Sam сокращалась на 30 и 19% соответственно. Разница в 11–12% между этими ферментами сохранялась на протяжении всего исследуемого диапазона концентраций хлорида кальция (рис. 4).

Система экспрессии оказывала значительное влияние на чувствительность рХн альпака к изменению концентрации хлорида кальция в диапазо-

не 1–5 мМ. Фермент, синтезированный в прокариотической системе, ведет себя как рХн коровы, а Хн полученный в *K. lactis*, напротив, в большей степени напоминает рХн-Sam (рис. 4).

Так же, как и в паре “фермент коровы – фермент верблюда”, рХн-Vic-EC свертывал молоко на 12–14% быстрее, чем рХн-Vic-KL, во всем исследованном диапазоне концентраций CaCl_2 . Предположительно, разная чувствительность химозинов, синтезированных в про- и эукариотах, к изменениям концентрации Ca^{2+} обусловлена наличием посттрансляционного процессинга цельного фермента в системе экспрессии *K. lactis* и его отсутствием в *E. coli* [21].

Таким образом, впервые проведено сравнение биохимических свойств рХн альпака, полученного в системах экспрессии *E. coli* и *K. lactis*. Показано, что замена прокариотического продуцента рХн-Vic на эукариотический, на 8–35% усиливала падение МА фермента, в ответ на изменение рН молока от 6.1 до 6.9, приводила к росту его ТС на 5°C, на 12–14% снижала чувствительность МА к изменению концентрации хлорида кальция в диапазоне 1–5 мМ, а также увеличивала коагуляционную специфичность и улучшала показатели каталитической эффективности фермента.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

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

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение от 12.10.2021 № 075-15-2021-1355) в рамках реализации отдельных мероприятий Федеральной научно-технической программы развития синхротронных и нейтронных исследований и исследовательской инфраструктуры на 2019–2027 гг.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Belenkaya S.V., Balabova D.V., Belov A.N., Koval A.D., Shcherbakov D.N., Elchaninov V.V. // Appl. Biochem. Microbiol. 2020. V. 56. № 4. P. 363–372.
2. Ельчанинов В.В. Проблема поиска новых молоко-свертывающих ферментов для сыроделия: критерии выбора источников генов для получения рекомбинантных химозинов. Барнаул: Изд. Алтайского гос. ун-та, 2021. 170 с.
3. Ma X., Yao B., Zheng W., Li L. // J. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 20. № 3. P. 550–557.
4. Dajani R., Sharp S., Graham S., Bethell S.S., Cooke R.M., Jamieson D.J., Coughtrie M.W. // Protein Expr. Purif. 1999. V. 16. №1. P. 11–18.

5. Pal Roy M., Mazumdar D., Dutta S., Saha S.P., Ghosh S. // PloS one. 2016. V. 11. № 1. P. e0145745.
6. Lawton M.P., Philpot R.M. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. № 8. P. 5728–5734.
7. Stone M.J., Ruf W., Miles D.J., Edgington T.S., Wright P.E. // Biochem. J. 1995. V. 310. № 2. P. 605–614.
8. Wang P., Zhang J., Sun Z., Chen Y., Gurewich V., Liu J.N. // Thromb. Res. 2000. V. 100. № 5. P. 461–467.
9. Sauerzapfe B., Engels L., Elling L. // Enzyme Microb. Technol. 2008. V. 43. № 3. P. 289–296.
10. Belenkaya S.V., Elchaninov V.V., Shcherbakov D.N. // Biotekhnologiya. 2021. V. 37. № 5. P. 20–27.
11. Рудометов А.П., Бельнская С.В., Щербаков Д.Н., Балабова Д.В., Кригер А.В., Ельчанинов В.В. // Сыроделие и маслоделие. 2017. Т. 6. С. 40–43.
12. Belenkaya S.V., Rudometov A.P., Shcherbakov D.N., Balabova D.V., Kriger A.V., Belov A.N., Koval A.D., Elchaninov V.V. // Appl. Biochem. Microbiol. 2018. V. 54. № 6. P. 569–576.
13. Belenkaya S.V., Shcherbakov D.N., Balabova D.V., Belov A.N., Koval A.D., Elchaninov V.V. // Appl. Biochem. Microbiol. 2020. V. 56. № 6. P. 647–656.
14. Belenkaya S.V., Bondar A.A., Kurgina T.A., Elchaninov V.V., Bakulina A.Yu., Rukhlova E.A., Lavrik O.I., Ilyichev A.A., Shcherbakov D.N. // Biochemistry (Moscow). 2020. V. 85. № 7. P. 781–791.
15. Kappeler S.R., van den Brink H.(J.)M., Rahbek-Nielsen H., Farah Z., Puhan Z., Hansen E.B., Johansen E. // Biochem. Biophys. Res. Comm. 2006. V. 342. № 2. P. 647–654.
16. Zhang Y., Li H., Wu H., Don Y., Liu N., Yang K. // Biochim. Biophys. Acta (BBA). 1997. V. 1343. № 2. P. 278–286.
17. Jensen J.L., Molgaard A., Poulsen J.-C.N., Harboe M.K., Simonsen J.B., Lorentzen A.M., Hjerno K., van den Brink J.M., Qvist K.B., Larsen S. // Acta Cryst. (Section D, Biol. Crystallogr.). 2013. V. 69. № 5. P. 901–913.
18. Horne D.S. // Curr. Opin. Coll. Interface Sci. 2002. V. 7. P. 456–461.
19. Horne D.S. // Int. Dairy J. 1998. V. 8. P. 171–177.
20. Lucey J.A. // J. Dairy Sci. 2002. V. 85. № 2. P. 281–294.
21. Spohner S.C., Schaum V., Quitmann H., Czermak P. // J. Biotechnol. 2016. V. 222. P. 104–116.

Comparison of Biochemical Properties of Recombinant Alpaca (*Vicugna pacos*) Chymosins Produced in Pro- and Eukaryotic Expression Systems

S. V. Belenkaya^{a, b}, V. V. Elchaninov^c, V. Y. Chirkova^d, and D. N. Shcherbakov^{a, d, *}

^a State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559 Russia

^b Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia

^c Federal Altai Scientific Center for Agrobiotechnologies, Siberian Research Institute of Cheese Making, Barnaul-51, 656910 Russia

^d Altai State University, Barnaul, 656049 Russia

*e-mail: dnscherbakov@gmail.com

Based on the yeast *Kluyveromyces lactis*, a strain-producer of recombinant alpaca prochymosin (*Vicugna pacos*) was developed. A comparative analysis of the biochemical properties of recombinant alpaca chymosin obtained in the expression systems of *K. lactis* and *Escherichia coli* was carried out. It was found that the recombinant alpaca chymosin synthesized in *K. lactis* exceeds the analog obtained in *E. coli* by 12.9 times in the number of enzyme turnovers, and by 2.9 times in catalytic efficiency. Compared to chymosin expressed in *E. coli*, the enzyme obtained in a eukaryotic producer has a thermal stability threshold increased by 5°C. Replacing a prokaryotic producer with a eukaryotic one enhances the negative sensitivity of the milk-clotting activity of recombinant alpaca chymosin to an increase in substrate pH in the range of 6.1–6.9, which is accompanied by an increase in the duration of coagulation by 8–35%. With an increase in the concentration of CaCl₂ in the substrate, the coagulation activity of the target enzyme synthesized in *E. coli* was 12–14% higher than that of its analogue obtained in *K. lactis*.

Keywords: recombinant chymosin alpaca, prokaryotic expression system, eukaryotic expression system, *Kluyveromyces lactis*, biochemical properties, Michaelis–Menten kinetics

УДК 577.15:579.6

ЦИКЛОДЕКСТРИНГЛЮКАНОТРАНСФЕРАЗА АЛКАЛОФИЛЬНОГО ШТАММА *Caldalkalibacillus mannanilyticus* IB-OR17-B1

© 2023 г. П. Ю. Мильман¹, Е. А. Гильванова¹, Г. Э. Актуганов¹, *

¹ Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, 450054 Россия

*e-mail: gleakt@anrb.ru

Поступила в редакцию 30.03.2023 г.

После доработки 15.04.2023 г.

Принята к публикации 29.04.2023 г.

Впервые охарактеризована внеклеточная циклодекстрин-глюканотрансфераза (ЦГТаза, К.Ф.2.1.19) штамма бактерий *Caldalkalibacillus mannanilyticus* IB-OR17-B1. Фермент выделяли из культуральной среды с помощью ультрафильтрации и аффинной адсорбции на кукурузном крахмале. Удельная активность ЦГТаза после очистки возрастала 18-кратно, выход составил 56%. Молекулярная масса очищенного фермента по данным денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле – 70 кДа. ЦГТаза *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 проявляла максимальную циклизующую активность при pH 8.0 и температуре 60°C, была стабильна в диапазоне pH 7–10 и при температуре ≤70°C. Термостабильность фермента при 70°C повышалась на 10–15% в присутствии 5–10 мМ солей кальция и магния. Катионы Ag⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺ и Fe³⁺ в концентрации 5 мМ ингибировали ЦГТаза на 90, 26, 23, 18 и 11%, соответственно. Очищенная ЦГТаза при оптимальных условиях и концентрации фермента 1.0 ед./г субстрата в течение 24 ч осуществляла конверсию картофельного крахмала с образованием смеси альфа-, бета- и гамма- циклодекстринов в соотношении 38.8 : 52.6 : 8.6 (по массе) и выходом 42%.

Ключевые слова: циклодекстринглюканотрансфераза, циклодекстрины, *Caldalkalibacillus mannanilyticus*, алкалофильные бактерии, термостабильный фермент

DOI: 10.31857/S0555109923050124, **EDN:** UAFGUR

Циклодекстринглюканотрансфераза (ЦГТаза, К.Ф. 2.4.1.19) – внеклеточный фермент, катализирующий четыре взаимосвязанные реакции: циклизацию, связывание, диспропорционирование и гидролиз. Благодаря циклизующей активности, ЦГТаза является уникальным ферментом, способным превращать крахмал и родственные субстраты в циклодекстрины (ЦД) [1–3]. ЦД – циклические невосстанавливающие олигосахариды, состоящие из шести, семи или восьми единиц глюкозы, связанных альфа-(1-4)-гликозидными связями, и называемых, соответственно, альфа-(α-), бета-(β-) и гамма-(γ)-ЦД [3]. ЦД обладают внутренней гидрофобной полостью и гидрофильной поверхностью, и могут образовывать комплексы включения с гостевыми молекулами, изменяя их физические и химические свойства [4, 5]. Благодаря этой особенности, ЦД находят широкое применение в пищевой, текстильной и косметической промышленности, сельском хозяйстве, фармацевтике, защите окружающей среды, а также в таких областях как надмолекулярная и аналитическая химия, мембранные технологии и др. [6–11].

Наряду с циклизующей активностью, большую практическую ценность имеют также гидролитические свойства ЦГТаза и их способность катализировать реакцию межмолекулярного трансгликозирования, что находит широкое применение при создании различных подсластителей-заменителей сахара, гомо- и гетероолигосахаридов, а также в целях улучшения качества лекарственных препаратов [12–14].

В недавнем исследовании ЦГТаза из *Bacillus cereus* YURP-10 была использована в качестве фунгицидного агента, ингибирующего рост мицелия, прорастание и продукцию спор у *Verticillium dahliae* [15].

ЦГТаза обнаружена, главным образом, у бактерий родов *Bacillus* и *Paenibacillus*, но встречается также и у представителей *Actinomyces*, *Brevibacterium*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Thermoanaerobacterium*, *Thermoanaerobacter* и др. [16–19].

Большинство бактериальных ЦГТаза катализируют реакцию трансформации крахмала с образованием смеси α-, β- и γ-ЦД. Выход и соотношение ЦД различаются в зависимости от происхож-

дения ЦГТаз и условий ферментативной реакции [16]. ЦГТазы из разных микробных источников различаются по кинетике образования той или иной формы ЦД, степени трансформации крахмала и наличию побочных реакций, снижающих уровень конверсии. По этой причине характеристика каждого нового типа ЦГТазы представляет не только теоретический интерес, но и привлекает большое внимание с точки зрения промышленного производства ЦД, особенно это касается алкалофильных микроорганизмов, обладающих высокой ферментативной активностью в широком диапазоне рН и температуры.

Цель настоящего исследования – очистка и характеристика ЦГТазы, продуцируемой алкалофильной бактерией *Caldalkalibacillus mannanilyticus* IB-OR17-B1, выделенной из донных отложений содового озера Белое (Бурятия, Россия).

МЕТОДИКА

В качестве объекта исследования был выбран штамм *Caldalkalibacillus mannanilyticus* IB-OR17-B1 из коллекции Уфимского института биологии УФИЦ РАН. Штамм депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) под номером В-2715D. Идентификация таксономического положения штамма была осуществлена ранее на основе изучения его физиолого-биохимических свойств и анализа гена 16S рПНК [20]. Последовательность 16S рДНК *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 депонирована в Генбанке NCBI под номером HE663240. После недавней таксономической ревизии семейства *Bacillaceae* [21], возникла необходимость в дополнительном уточнении филогенетического положения исследуемого штамма. Сравнительный анализ и поиск гомологичных последовательностей гена 16S рПНК проводили с помощью ресурсов EzBioCloud [22] и GenBank, а также онлайн-программ BLAST и MOLEBLAST [23]. Расчет эволюционных расстояний осуществляли по принципу максимального правдоподобия, филогенетическое дерево строили методом присоединения соседей, используя программу Mega X 10.0.4 [24]. Устойчивость топологии дендрограммы оценивали с помощью бутстреп-анализа из 500 заданных повторностей [25].

Культуру поддерживали на плотной питательной среде К1 следующего состава (мас. %): крахмал картофельный – 1.0; пептон – 0.4; дрожжевой экстракт – 0.5; KH_2PO_4 – 0.1; Na_2HPO_4 – 0.1; агар – 1.5, рН среды доводили до 7.9–8.0 добавлением 10%-ного стерильного раствора Na_2CO_3 . Для работы препарата ЦГТазы штамм выращивали в жидкой среде того же состава без добавления агара (см. выше). Культивирование проводили в течение 96 ч в колбах Эрленмейера на 250 мл в шей-

кере-инкубаторе Innova 40R (“New Brunswick Scientific”, США) при 250 об./мин и 50°C.

Бактериальный рост оценивали по оптической плотности (OP_{600}) культуральной жидкости (КЖ), измеренной на спектрофотометре СФ-56 (“ЛОМО-Спектр”, Россия) каждые 24 ч на протяжении 2–7 сут. Повторность измерений пятикратная.

Для выделения ЦГТазы из КЖ *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 бактериальные клетки удаляли центрифугированием на центрифуге ОПН-8 (“Дастан”, Киргизия) при 6000 об./мин в течение 30 мин. Полученный супернатант концентрировали с помощью ультрафильтрации на модуле VivaFlow 200 (“Sartorius”, Германия) с диаметром пор 30 кДа. Очистку ЦГТазы проводили методом крахмальной адсорбции по Мартинусу [26] с модификациями. К 20 мл концентрированного ферментного препарата добавляли нерастворимый кукурузный крахмал (5% вес/об.) и сульфат аммония до концентрации 1.0 М. Реакционную смесь инкубировали в течение 1 ч при пониженной температуре (8°C) и постоянном умеренном перемешивании для обеспечения максимально полной адсорбции фермента. Затем крахмал отделяли центрифугированием при 5000 g в течение 10 мин и дважды промывали равным объемом холодной воды. Адсорбированный фермент элюировали, инкубируя субстрат в течение 30 мин в присутствии 5 мл 1.0 мМ β -ЦД в 50 мМ трис-НСI буфере (рН 8.0) при 37°C и постоянном встряхивании, после чего смесь снова центрифугировали, как описано выше. Процедуру повторяли еще один раз с использованием 2 мл буфера для элюирования. Полученные элюаты объединяли (7 мл) и диализовали против 50 мМ трис-НСI буфера (рН 8.0) при 8°C.

Измерение активности ЦГТазы проводили фенолфталеиновым методом на спектрофотометре СФ-56 (“ЛОМО-Спектр”, Россия) при длине волны 553 нм [27]. Повторность измерений пятикратная. За 1 ед. активности ЦГТазы принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль β -ЦД из 2%-ного раствора растворимого картофельного крахмала (рН 6.9) в течение 1 мин при 50°C.

Наличие циклизующей активности у исследуемого фермента оценивали модифицированным методом Тильдена-Хадсона [28]. Формирование кристаллов комплекса α - и β -ЦД в присутствии йода определяли после 30-минутной инкубации при 37°C 3%-ного растворимого картофельного крахмала и раствора ферментного препарата в 50 мМ натрий-ацетатном буфере (рН 6.9). Визуально образование кристаллов оценивали в световом микроскопе “Leica DL1000” (“Leica Microsystems”, Германия) при увеличении $\times 100$. Изоб-

ражения получали с помощью цифровой камеры “Leica DFC290” того же производителя.

Молекулярную массу и степень чистоты фермента оценивали методом денатурирующего электрофореза в 12%-ном ПААГ по Лэммли. Белки в геле окрашивали Кумасси ярко-синим G-250 (“Fluka”, Швейцария) по методике [29]. В качестве маркеров молекулярной массы использовали набор неокрашенных рекомбинантных белков “PageRuler Broad Range” 5–250 кДа (“Thermo Scientific”, США). Концентрацию белка в растворах определяли спектрофотометрически по методу Варбурга и Кристиана [30].

pH-Оптимум очищенной ЦГТаза (5.5 ед./мл) определяли в интервале pH 3–10, используя в качестве растворителя 50 мМ фосфатно-цитратный (pH 4–7), натрий-фосфатный (pH 7–8), трис-HCl (pH 8–9) и глицин-NaOH (pH 9–11) буферные растворы. Стабильность фермента при разных pH оценивали, инкубируя его в тех же буферных растворах (pH 3–10, разведение 1 : 10 об./об.) в течение 1 ч при 28°C, после чего измеряли остаточную активность при pH 8.0. Активность образца, не подвергавшегося инкубации, принимали равной 100%.

Для определения температурного оптимума ЦГТаза реакционную смесь инкубировали в течение 60 мин при pH 8.0 и температурах от 40 до 90°C с дальнейшей оценкой скорости накопления ЦД по стандартной методике. Термостабильность фермента оценивали по уровню его остаточной активности (%) после 60 мин инкубации в диапазоне 40–90°C в отсутствие субстрата. Перед термообработкой очищенную ЦГТазу (5.5 ед./мл) разбавляли в 10 раз 0.1 М натрий-фосфатным буфером, pH 8.0.

Влияние катионов металлов на активность ЦГТаза оценивали, выдерживая очищенный фермент в присутствии 5, 10 и 15 мМ разных солей Ag⁺, Ca²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, K⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Na⁺, Ni²⁺, Pb²⁺ и Zn²⁺ (рис. 7). Все использованные в работе соли были марки “х. ч.”. Раствор фермента (5.5 ед./мл) разбавляли в 10 раз 0.1 М натрий-фосфатным буфером (pH 8.0), содержащим соли металлов в указанных концентрациях, и инкубировали смесь при 28°C в течение 1 ч, после чего определяли остаточную ферментативную активность стандартным методом. Аналогичным образом оценивали влияние ионов кальция и магния на термостабильность ЦГТаза при 70–80°C.

Анализ продуктов трансформации крахмала очищенной ЦГТазой осуществляли с помощью ВЭЖХ на жидкостном хроматографе “Laboratori Pistoje Praha” (Чехия). Реакционную смесь (5 мл) с ферментом в различных концентрациях (0.2–15 ед./г субстрата) и картофельный крахмал (3 мас. %), клейстеризованный в 50 мМ натрий-

фосфатном буфере (pH 8.0), инкубировали в течение 24 ч при 60°C. После инкубации из реакционной смеси отбирали пробы по 900 мкл в микроцентрифужные пробирки. К каждой из проб в качестве внутреннего стандарта добавляли 90 мкл 10%-ного раствора ксилозы, затем вносили 990 мкл ацетонитрила и удаляли остатки нетрансформированного крахмала центрифугированием при 8000 об./мин в течение 10 мин на центрифуге CM-50 (“ELMI”, Латвия). Супернатант разделяли на колонке “SEPARON-NH₂”-5 мкм (3 × 150 мм, “Tessek Ltd.”, Чехия), используя в качестве элюента смесь ацетонитрил–вода в объемном соотношении 63 : 37. Поддачу растворителя осуществляли насосом HPP-5001 со скоростью 0.7 мл/мин, в качестве детектора использовали рефрактометр RIDK-102 (“Laboratori Pistoje Praha”, Чехия). Регистрацию и оцифровку аналогового сигнала с последующей обработкой хроматограмм проводили с помощью программного-вычислительного комплекса “Мультихром” 1.59 (“Амперсенд”, Россия). Калибровку прибора осуществляли методом внутреннего стандарта, используя индивидуальные ЦД фирмы “Wacker Chemie” (США).

Эксперименты проводили в трехкратной повторности, статистическую обработку результатов осуществляли, используя программу Origin 7.0 (Origin Lab Corp., США). Достоверность отличий опытных вариантов от контрольных оценивали с помощью критерия Стьюдента. Результаты считали достоверными при критерии вероятности $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Культура алкалофильных аэробных спорообразующих бактерий *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1, известная ранее как *Bacillus mannanilyticus* IB-OR17-B1, была выделена в 2009 г. из донных отложений содового озера Белое (Россия). Вид *Bacillus mannanilyticus* изначально был назван в 2005 г. японскими исследователями при таксономической ревизии ранее выделенных штаммов алкалофильных бактерий [31]. Изменение текущего родового названия этого вида обусловлено недавним пересмотром классификации рода *Bacillus* на основе новых данных сравнительного филогенетического анализа более 300 геномов *Bacillus/Bacillaceae* [21]. Полученные результаты позволили выделить из рода *Bacillus* 17 отдельных монофилетических групп, составляющих, соответственно, новые рода семейства *Bacillaceae*. Род *Caldalkalibacillus* включает в настоящее время, помимо *C. mannanilyticus* еще три вида бактерий, проявляющих алкалофильные/алкалотолерантные и термофильные свойства [32, 33].

В связи с этим, текущее филогенетическое положение *B. mannanilyticus* IB-OR17-B1 было уточнено на основе сравнительного анализа последова-

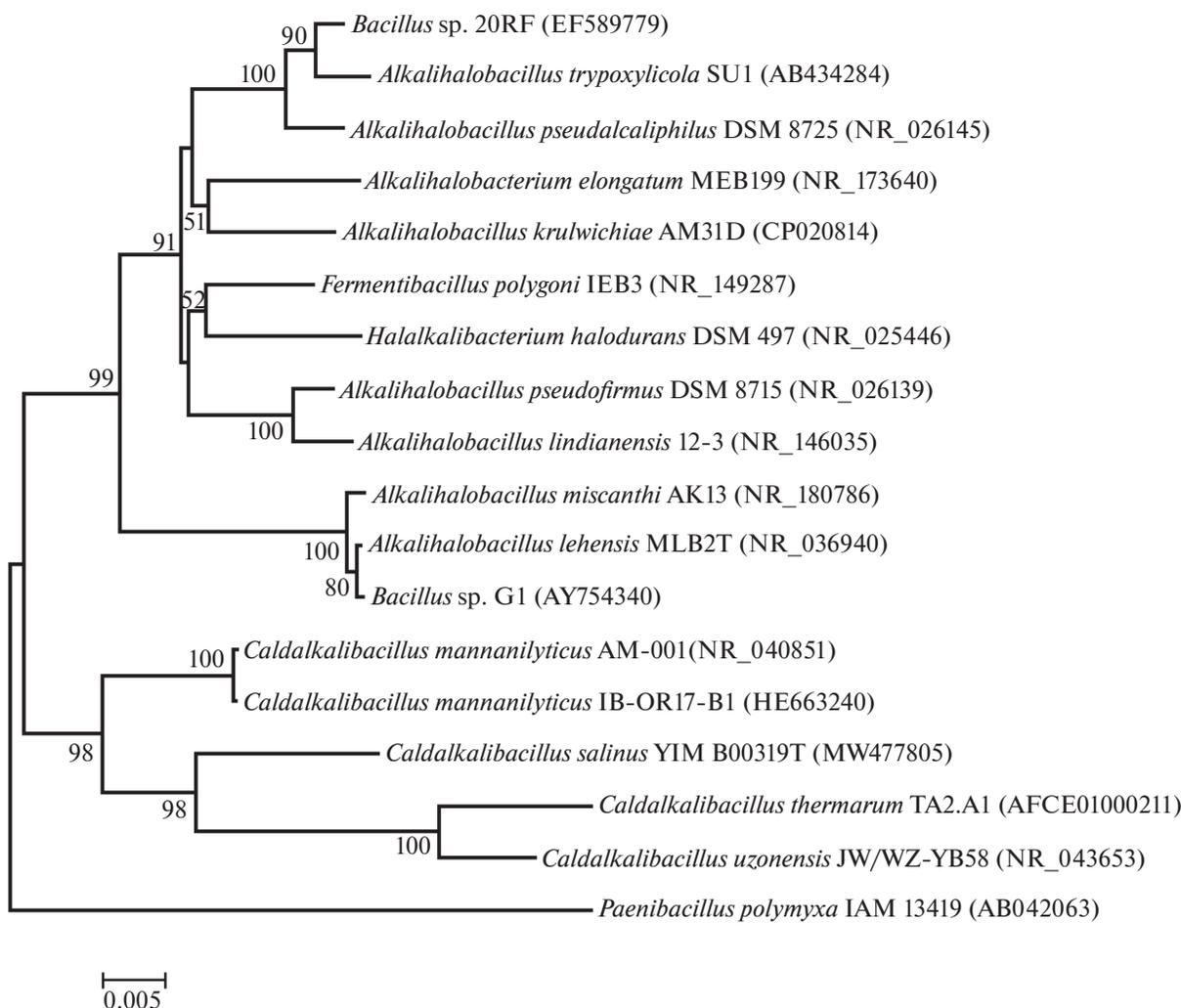


Рис. 1. Филогенетическое положение штамма *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 по гену 16S рРНК (1523 п. о.) по отношению к ближайшим родам алкалофильных бактерий семейства *Bacillaceae*. Филогенетическое дерево построено методом присоединения соседей, в узлах приведены значения бутстреп-поддержки (>50%). В качестве внешней группы выбран представитель *Paenibacillus polymyxa* IAM 13419. Масштаб отражает эволюционное расстояние, соответствующее 5 нуклеотидным заменам на каждые 1000 нуклеотидов.

тельности гена 16S рРНК данного штамма и ранее охарактеризованных 4 видов *Caldalkalibacillus*, а также представителей близкородственных родов алкалофильных бактерий *Alkalihalobacillus* (7 видов), *Fermentibacillus*, *Halalkalibacterium* и *Alkalihalobacterium*. В эту группу включены также ближайшие по уровню сходства гена 16S рРНК последовательности алкалофильных продуцентов ЦГТаз. На филогенетическом дереве *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 образует общую кладу с референтными штаммами рода *Caldalkalibacillus* при высоком значении бутстреп-поддержки и показывает степень сходства 99.93% по отношению к типовому штамму вида *Caldalkalibacillus mannanilyticus* (рис. 1). Оценка филогенетического положения *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 внутри семейства *Bacillaceae* по последовательности гена

16S рРНК показала более высокую степень сходства данного штамма с представителями родов алкалофильных и галофильных бактерий, в отличие от аэробных и анаэробных термофилов, в том числе, продуцентов ЦГТаз, таких как *Anaerobranca*, *Caldanaerobacter* и *Thermoanaerobacterium* (последовательности не представлены на рис. 1). Топология филогении *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 совпадала с результатами филогенетической реконструкции, проведенной ранее для *Caldalkalibacillus* [34].

Штамм *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 продуцировал внеклеточную β -манназу и хитиназу, а также обладал антагонистической активностью в отношении некоторых фитопатогенных грибов [20]. Однако до настоящего времени не сообща-



Рис. 2. Микрофотография кристаллов ЦД, образующихся при ферментативной трансформации 3%-ного растворимого картофельного крахмала (3 ч, 37°C) ЦГТазой *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1, согласно тесту Тильдена-Хадсона. Стрелки и цифры показывают кристаллы α - (1) и β -ЦД (2) в виде игл и призм, соответственно. Световая микроскопия, цена деления = 100 мкм.

лось о способности бактерий этого вида к синтезу ЦГТаз и продукции ЦД.

Штамм *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 активно рос на агаризованной среде К1 при 45–50°C, формируя зоны просветления крахмала вокруг колоний, соответствующие области образования и накопления ЦД, что подтверждалось фенолфталеиновым методом (данные не представлены). Циклизующая активность исследуемого фермента в КЖ качественно подтверждалась положительной реакцией Тильдена–Хадсона на формирование кристаллов комплекса йод–ЦД. При микрокопировании продуктов ферментативной трансформации крахмала отмечалось образование небольших и коротких призм β -ЦД, окрашенных в светло-коричневый цвет и резко отличающихся от иглообразных друз, характерных для комплекса α -ЦД и йода (рис. 2).

При культивировании в жидкой среде штамм показывал оптимум роста и синтеза ЦГТазы при 50°C. Накопление бактериальной биомассы достигало максимума на 48 ч, тогда как наибольший уровень секреции ЦГТазы достигался к 48–72 ч (рис. 3). Снижение ферментативной активности штамма к 96 ч культивирования, вероятно, связано не только с истощением исходного субстрата в среде, но и с накоплением в качестве побочных продуктов метаболизма глюкозы и мальтозы, оказывающих репрессирующее действие на синтез ЦГТазы [35].

Основную изоформу фермента выделяли из фильтрата культуральной среды с помощью ультрафильтрации и последующей аффинной сорбции на крахмале. В ранее опубликованных работах очистка ЦГТаз осуществлялась, как правило, по более сложной схеме, включающей этапы ультрафильтрации, гель-фильтрации, адсорбции на крахмале и ионообменной хроматографии [36–

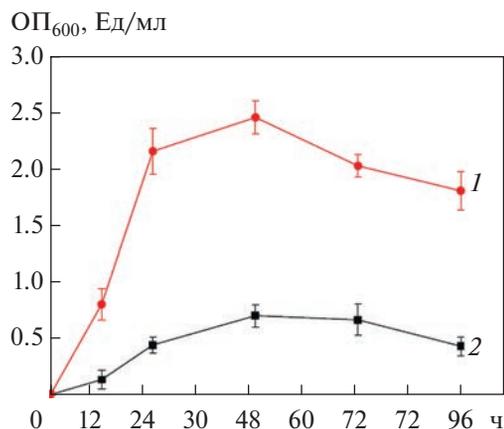


Рис. 3. Динамика роста (1) и продукции внеклеточной ЦГТазы (2) штаммом *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 при глубинном культивировании (250 об./мин, 50°C) в жидкой среде с 1%-ным картофельным крахмалом.

39]. Для ЦГТазы из *B. pseudocaliphilus* 20RF была применена комбинация ультрафильтрации и адсорбции на нерастворимом кукурузном крахмале (10 мас. %), что обеспечило мягкую и быструю процедуру очистки фермента с 18-кратным увеличением удельной активности и выходом 63% [40]. Данная схема была успешно воспроизведена для выделения ЦГТазы *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1. Наиболее высокая степень очистки фермента отмечалась на этапе аффинной сорбции на крахмале (табл. 1). Предварительная оптимизация параметров сорбции ЦГТазы в зависимости от типа крахмала и его концентрации показала, что нерастворимый кукурузный крахмал (5 мас. %) является более эффективным сорбентом по сравнению с нерастворимым картофельным крахмалом, благодаря чему не требуется проведение дополнительных стадий очистки фермента (данные не представлены).

Итоговая степень очистки фермента составляла около 18× при выходе 56%, при этом фермент демонстрировал электрофоретическую гомогенность, достаточную для характеристики его физико-химических и каталитических свойств. Молекулярная масса очищенной ЦГТазы, согласно результатам денатурирующего электрофореза, составляла около 70 кДа (рис. 4).

Близкие по молекулярной массе ЦГТазы были описаны ранее у штаммов алкалофильных бактерий *Bacillus* sp. 7–12 [41], *B. pseudocaliphilus* 20RF [40] и *B. pseudocaliphilus* 8SB [42].

Очищенный фермент проявлял наибольшую циклизующую активность при pH 8.0 (рис. 5a). pH-оптимум ранее охарактеризованных ЦГТаз варьировал в интервале pH 5–10, в зависимости от штамма-производителя [40]. ЦГТаза *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 сохраняла 92–100% своей пер-

Таблица 1. Очистка ЦГТаза *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1

Стадия очистки	Объем, мл	ЦГТаза		Белок, мг	Степень очистки	Выход, %
		Ед.	Ед./мг белка			
Исходная КЖ	200	180	0.86	208	1.0	100
Ультрафильтрация	42	115.08	3.30	34.86	3.8	64
Адсорбция на крахмале	37	100.64	15.11	6.66	17.5	56

воначальной активности в интервале рН 7–10. Очищенный фермент был более стабилен при щелочных значениях рН, теряя около 50% первоначальной активности при рН > 10, тогда как при рН < 7.0 полуинактивация фермента наблюдалась уже при рН ~ 5.5–5.6 (рис. 6а). Максимальная скорость конверсии крахмала ЦГТазой *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 отмечалась при 60°C, тогда как при 90°C фермент полностью терял свою активность (рис. 5б).

Важной особенностью ЦГТаза *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 была ее высокая термостабильность. Так, очищенный фермент сохранял более 60% первоначальной активности после 1 ч инкубации при 70°C (рис. 6б); период полуинактивации фермента составлял 1 ч при 75°C (данные не показаны). У штамма *B. pseudocaliphilus* 20RF

остаточная активность при 70°C составляла 31% после 30-минутной термообработки [40]. Охарактеризованные ранее ЦГТаза других видов алкалофильных бактерий отличались еще меньшей термостабильностью, сохраняя первоначальную активность при температурах не более 45–55°C [40]. Термостабильность ЦГТаза *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 при 70°C незначительно повышалась в присутствии 5–10 мМ хлорида кальция. Остаточная активность фермента после 1 ч инкубации возрастала примерно на 10% по сравнению с контролем (рис. 6б). Многие исследования показывают, что, подобно амилазам, ЦГТаза имеют консервативные сайты связывания ионов Ca²⁺, которые оказывают стабилизирующее действие на третичную структуру фермента, улучшая его термостабильность [38]. Добавление сульфата магния в тех же концентрациях оказывало менее выраженный положительный эффект: остаточная активность фермента после 30 мин термообработки увеличивалась не более чем на 5% (рис. 6б). Увеличение концентрации солей кальция и магния до 15 мМ не оказывало существенного влияния на стабильность фермента при 70°C (данные не представлены). Термостабильность ЦГТаза штамма *B. pseudocaliphilus* 20RF кратно возрастала в присутствии катионов Ca²⁺ и Mg²⁺, а ее остаточная активность после 1 ч инкубации при 60°C составляла 72 и 46%, соответственно [40].

Таким образом, по сравнению с ЦГТазами, синтезируемыми штаммами других алкалофильных бактерий, ЦГТаза *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 отличалась высокой активностью и стабильностью при рН 7–10 и температурах 60–70°C, что является существенным фактором в выборе фермента для производства ЦД.

Влияние ионов металлов на ЦГТаза различного происхождения может носить как ингибирующий, так и активирующий характер. Катионы металлов зачастую необходимы для поддержания активной конформации многих ферментов [38]. Нами была проведена оценка влияния солей разных групп металлов в концентрации 5 мМ на активность очищенной ЦГТаза *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 (рис. 7). Наиболее выраженный ингибирующий эффект на ЦГТазу оказывали ионы серебра (снижение активности более, чем на

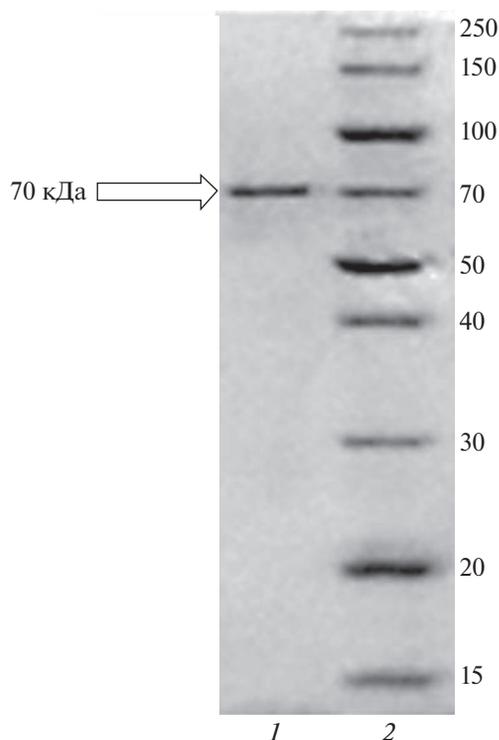


Рис. 4. Электрофореграмма препарата очищенной ЦГТаза *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 в 12.5%-ном ПААГ с 0.1% ДДС-На (1); белковые маркеры М.М. (кДа) (2).

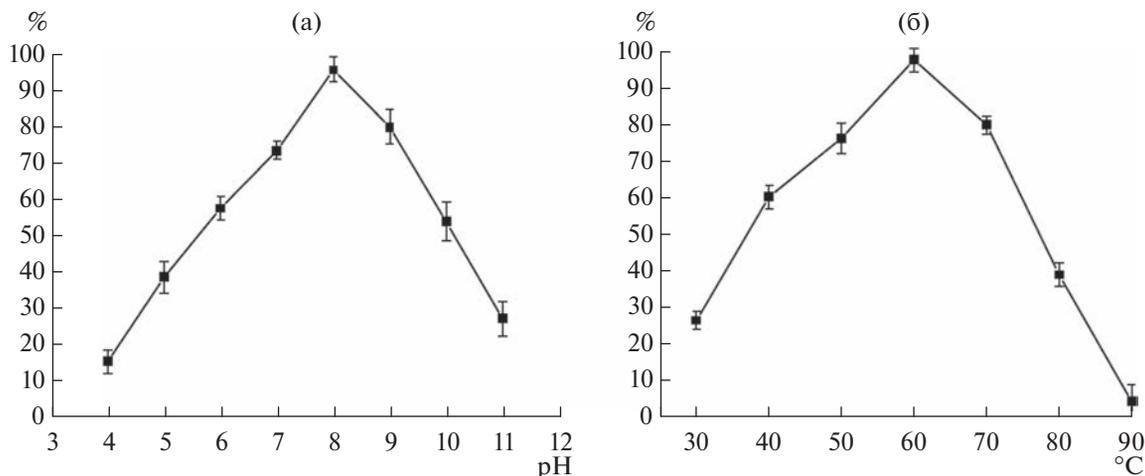


Рис. 5. Влияние pH (а) и температуры (б) на активность очищенной ЦГТазаы (%) *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1. (Активность фермента в % от максимального значения).

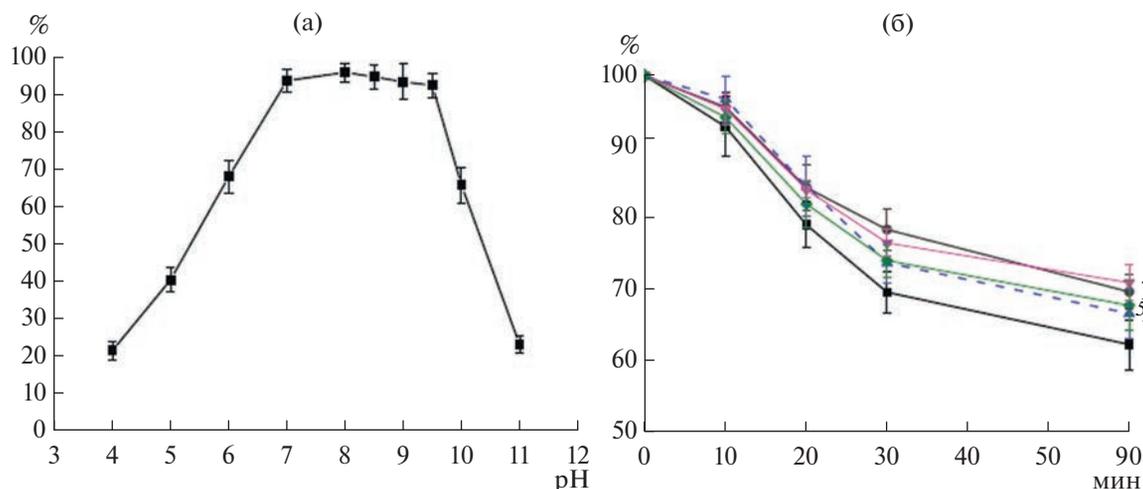


Рис. 6. Влияние pH при 28°C (а) и солей кальция и магния при 70°C (б) на стабильность очищенной ЦГТазаы *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1: 1 – контроль (фермент, инкубированный при 70°C без солей); 2, 3 – 5 и 10 mM CaCl₂; 4, 5 – 5 и 10 mM MgSO₄. На оси абсцисс – остаточная активность в % от первоначальной активности фермента, не подвергавшегося 1-часовой инкубации в интервале pH 4–11 (а) или 10–60-минутной термообработке при 70°C (б).

90%), далее в порядке убывания степени ингибирования следуют катионы меди, цинка, двух- и трехвалентного железа (снижение активности на 26, 23, 18 и 11% соответственно). Основным механизмом ингибирования ЦГТазаы катионами металлов может быть связан с окислением аминокислотных остатков фермента, участвующих в реакции циклизации [26]. Ранее сообщалось, что ионы меди оказывают значительное ингибирующее действие на ЦГТазаы, продуцируемые штаммами *Bacillus* AL-6 [43], *B. firmus* [44, 45] и *B. agaradhaerens* [26], в отличие от фермента из *B. pseudocaliphilus* 20RF, который сохранял 90% своей активности в присутствии 15 mM Cu²⁺ [40]. В настоящей работе была проведена сравнительная

оценка влияния сульфата и хлорида меди на активность ЦГТазаы *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1. В обоих случаях катионы Cu²⁺ оказывали ингибирующее действие на фермент, однако, в присутствии сульфата меди циклизующая активность фермента была почти на 10% ниже, чем в случае с хлоридом (данные не представлены). Таким образом, можно предположить, что катионы металлов в сочетании с SO₄²⁻-анионом оказывают более сильное дестабилизирующее действие на фермент по сравнению с хлоридами тех же металлов. Сходные результаты были получены для ЦГТазаы штамма *Bacillus* sp. G1 при использовании соответствующих солей цинка, двухвалентного железа и калия [14]. Имеются данные, что анионы не-

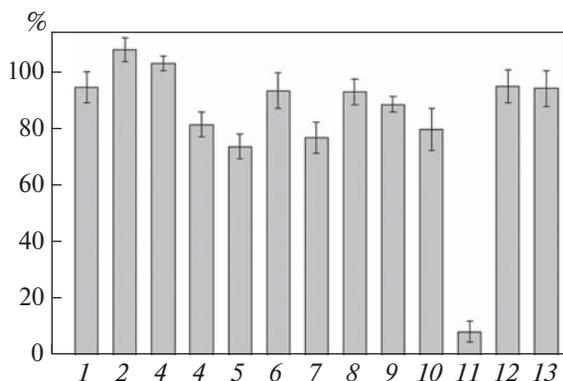


Рис. 7. Влияние катионов металлов на активность очищенной ЦГТазы *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1. Концентрация солей металлов 5 мМ в 0.1 М натрий-фосфатном буфере (рН 8.0). 1 – NiCl₂, 2 – CaCl₂, 3 – MgSO₄, 4 – FeSO₄, 5 – CuSO₄, 6 – PbSO₄, 7 – ZnSO₄, 8 – MnSO₄, 9 – FeCl₃, 10 – CuCl₂, 11 – AgNO₃, 12 – K₂SO₄, 13 – Na₂SO₄. На оси абсцисс – остаточная активность фермента в % от активности в отсутствие солей (100%).

органических кислот также могут играть значительную роль в стабилизации ЦГТазы [14, 46].

Катионы Ni⁺, Pb⁺, Mn²⁺, Na⁺ и K⁺ не оказывали существенного влияния на циклизующую активность ЦГТазы *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 (рис. 7). Активность очищенного фермента достоверно возрастала в присутствии катионов кальция (5 мМ CaCl₂), что является распространенным явлением среди ЦГТаз [26]. Катионы Mg²⁺, при концентрации 5 мМ, также стимулировали активность ЦГТазы *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1, в отличие от аналогичных ферментов *Bacillus* sp. G1 и *B. pseudocaliphilus* 20RF, активность которых снижалась в присутствии сернокислого магния на 55 [14] и 45% [40] соответственно. Активность ЦГТазы *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 катионами кальция и магния наблюдалась при концентрациях последних 5–10 мМ, однако при 15 мМ отмечалось ингибирование фермента солями обоих металлов на 35–37%.

Важнейшей характеристикой ЦГТаз является их специфичность в отношении спектра ЦД, образующихся при ферментативной конверсии крахмала. Определяющее значение для эффективности реакции, катализируемой ЦГТазой *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1, имеет количество фермента в реакционной смеси. С увеличением концентрации фермента в реакционной смеси от 1 до 4 ед./г субстрата общий выход ЦД достигал максимума 42%, однако при дальнейшем увеличении концентрации фермента до 7–15 ед./г продукция ЦД резко снижалась до 26% от содержания субстрата (табл. 2). При избытке фермента в его действии начинала преобладать реакция диспропорционирования с образованием линейных мальтоолигосахаридов, что приводило к резкому снижению выхода ЦД. Эффективность конверсии крахмала в ЦД заметно снижалась также в присутствии низких концентраций ЦГТазы (0.2 ед./г), что обусловлено низкой скоростью ферментативной реакции в условиях полного насыщения фермента субстратом.

Таким образом, для получения удовлетворительного выхода ЦД количество добавляемого фермента необходимо оптимизировать. Полученные данные свидетельствовали, что оптимальной для трансформации крахмала в ЦД можно считать концентрацию ЦГТазы в диапазоне 1–4 ед./г субстрата. Действие исследуемой ЦГТазы на 3%-ный картофельный крахмал при 60°C и концентрации 1 ед./г субстрата приводило к одновременному накоплению α-, β- и γ-ЦД в соотношении 38.8 : 52.6 : 8.6 (мас. %) соответственно и выходу 42%, при этом реакция фактически прекращалась через 10–12 ч. По своим каталитическим свойствам ЦГТаза *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 была сопоставима с ЦГТазами из *Geobacillus stearothermophilus* ET1 и *G. thermoglucosidans* СНВ1, которые продуцировали смесь α-, β- и γ-ЦД в соотношении 37.8 : 53.1 : 9.1 (мас. %) [47] и 32 : 56.2 : 11.8 (мас. %) [48] соответственно. При этом для ЦГТазы из *G. stearothermophilus* ET1 общий выход ЦД составлял 44% после 12 ч обработки клейстеризованного кукурузного крахмала при 60°C и рН 6.0, а для

Таблица 2. Влияние концентрации ЦГТазы *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 на продукцию ЦД из 3%-ного картофельного крахмала

Концентрация ЦГТазы, ед./г	Выход, мас. %			Общий выход ЦД, %
	α-ЦД	β-ЦД	γ-ЦД	
0.2	45.1	45.8	9.1	19.4
1.0	38.8	52.6	8.6	42.2
4.0	36.4	52.6	11	41.5
7.0	36.4	53.8	9.8	26.07
10	36.9	52.8	10.3	26.5
15	41.8	47.4	10.8	29.46

фермента из *G. thermoglucosidans* СНВ1 60.3% после 21 ч обработки 3%-ного растворимого картофельного крахмала при 60°C и pH 6.0.

Таким образом, в представленной работе впервые дана характеристика свойств ЦГТазы, продуцируемой новым термоалкалотолерантным штаммом вида *C. mannaniyiticus* IB-OR17-B1 – представителя рода *Caldalkalibacillus*, составляющего отдельный кластер алкалофильных эндоспорообразующих бактерий. Для выделения данного фермента в электрофоретически гомогенном состоянии успешно использована простая двухэтапная схема очистки, включающая ультрафильтрацию и адсорбцию на кукурузном крахмале. Молекулярная масса очищенного фермента близка значениям некоторых ранее описанных ЦГТаз и составляла около 70 кДа. Фермент показывал наибольшую активность при pH 8.0 и 60°C, был стабилен в интервале pH 7–10 и температуры 65–70°C. Катионы кальция и магния в концентрациях 5–10 мМ существенно увеличивали термостабильность ЦГТазы при 70°C, а также активировали сам фермент. Сильное ингибирование фермента отмечалось в присутствии ионов серебра (5 мМ), тогда как катионы меди, цинка, двух- и трехвалентного железа характеризовались умеренным или незначительным ингибирующим действием на активность ЦГТазы. Достижимый уровень ферментативной конверсии картофельного крахмала в ЦД – 42% с преимущественным образованием α - и β -ЦД (38.8 и 52.6 мас. %, соответственно) и незначительным количеством γ -ЦД (8.6 мас. %) после 24 ч инкубации дает основания рассматривать ЦГТазу *C. mannaniyiticus* IB-OR17-B1 в качестве перспективного кандидата для разработки технологии получения ЦД. Несомненно, термостабильность и алкалотолерантность исследованного фермента позволила также внести штамм *C. mannaniyiticus* IB-OR17-B1 в список потенциальных доноров гена ЦГТазы при создании генетически модифицированных продуцентов, либо его использования в качестве одного из базовых продуцентов для дальнейшей селекции.

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)”.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Jemli S., Messaoud E., Ayadi-Zouari D., Naili B., Khe-makhem B., Bejar S.* // Biochem. Eng. J. 2007. V. 34. № 1. P. 44–50.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.11.016>
2. *Aroob I., Ahmad N., Rashid N.* // Amylase. 2021. V. 5. № 1. P. 23–37.
<https://doi.org/10.1515/amyase-2021-0003>
3. *Kurkov S.V., Lofisson T.* // Int. J. Pharm. 2013. V. 453. № 1. P. 167–180.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.055>
4. *Astray G., Gonzalez-Barreiro C., Mejuto J., Rial-Otero R., Simal-Gándara J.* // Food Hydrocoll. 2009. V. 23. № 7. P. 1631–1640.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.01.001>
5. *Abdel-Naby M.A., El-Refai H.A., Abdel-Fattah A.F.* // J. Appl. Microbiol. 2011. V. 111. № 5. P. 1129–1137.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05136.x>
6. *Szejtli J.* Cyclodextrin Technology – Topics in Inclusion Science. / Netherlands: Springer Science & Business Media, 2013. 450 p.
<https://doi.org/10.1007/978-94-015-7797-7>
7. *Czinkoczky R., Nemeth A.* // Hung. J. Ind. Chem. 2019. V. 47. № 2. P. 5–10.
<https://doi.org/10.33927/hjic-2019-14>
8. *Hamoudi M., Fattal E., Gueutina C., Nicolas V., Bochota A.* // Int. J. Pharm. 2011. V. 416. № 2. P. 507–514.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.01.062>
9. *Marcon F., Mathiron D., Pilard S., Lemaire-Hurtel A., Dubaele J., Djedaini-Pilard F.* // Int. J. Pharm. 2009. V. 379. № 2. P. 244–250.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.05.029>
10. *Sian H.K., Said M., Hassan O., Kamaruddin K., Ismail A.F., Rahman R. et al.* // Process Biochem. 2005. V. 40. № 3–4. P. 1101–1111.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.03.018>
11. *Wang J., Cao Y., Sun B., Wang C.* // Food Chem. 2011. V. 127. № 4. P. 1680–1685.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.036>
12. *Lim C.H., Rasti B., Sulisty J., Hamid M.A.* // Heliyon. 2021. V. 7. e06305.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06305>
13. *Saini K., Pathak V.M., Tyagi A., Gupta R.* // Catalysis Research. 2022. V. 2. № 3.
<https://doi.org/10.21926/cr.2203029>
14. *Zhao F., Li Y., Li C., Ban X., Gu Z., Li Z.* // Food Hydrocolloids. 2022. V. 133. № 1. 107951.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107951>
15. *Zhou J., Feng Z., Liu S., Wei F., Shi Y., Zhao L. et al.* // Mol. Plant Pathol. 2021. V. 22. № 1. P. 130–144.
<https://doi.org/10.1111/mpp.13014>
16. *Biwer A., Antranikian G., Heinzle E.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 59. № 6. P. 609–617.
<https://doi.org/10.1007/s00253-002-1057-x>

17. *Zheng M., Endo T., Zimmermann W.* // Aust. J. Chem. 2002. V. 55. № 2. P. 39–48.
<https://doi.org/10.1071/CH01189>
18. *Li C., Ahn H.J., Kim J.H., Kim Y.W.* // Carbohydr. Polym. 2014. V. 99. P. 39–46.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.056>
19. *Saini K., Pathak V.M., Tyagi A., Gupta R.* // Catalysis Research. 2022. V. 2. № 3: 029. P. 1–56.
<https://doi.org/10.21926/cr.2203029>
20. *Melentiev A.I., Galimzianova N.F., Gilvanova E.A., Shchelchkova E.A., Kuzmina L.Yu., Boyko T.F. et al.* // Adv. Microbiol. 2014. V. 4. № 8. P. 455–464.
<https://doi.org/10.4236/aim.2014.48050>
21. *Gupta R.S., Patel S., Saini N., Chen S.* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2020. V. 70. № 11. P. 5753–5798.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004475>
22. *Yoon S.H., Ha S.M., Kwon S., Lim J., Kim Y., Seo H. et al.* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. № 5. P. 1613–1617.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>
23. *Adebule A.P.* // J. Adv. Med. Life Sci. 2018. V. 6. № 3. P. 1–3.
<https://doi.org/10.5281/zenodo.1198928>
24. *Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K.* // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. № 6. P. 1547–1549.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
25. *Felsenstein J.* // Evolution. 1985. V. 39. № 4. P. 783–791.
<https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
26. *Martins R.F., Hatti-Kaul R.* // Enzyme Microb. Technol. 2002. V. 30. № 1. P. 116–124.
[https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00461-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00461-6)
27. *Usanov N.G., Gil'vanova E.A., Eli'zarev P.A., Prutsakova E.A., Melent'ev A.I.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2007. V. 43. № 1. P. 105–110.
<https://doi.org/10.1134/S000368380701019X>
28. *Tilden E.B., Hudson G.S.* // J. Bacteriol. 1942. V. 43. № 4. P. 527–544.
<https://doi.org/10.1128/jb.43.4.527-544.1942>
29. *Neuhoff V., Arold N., Taube D., Ehrhardt W.* // Electrophoresis. 1988. V. 9. № 6. P. 255–262.
<https://doi.org/10.1002/elps.1150090603>
30. *Доусон Р., Элиот Д., Элиот У., Джонс К.* Справочник биохимика: Перевод с англ. / М.: Мир, 1991. 544 с.
31. *Nogi Y., Takami H., Horikoshi K.* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2005. V. 55. № 6. P. 2309–2315.
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.63649-0>
32. *Xue Y., Zhang X., Zhou C., Zhao Y., Cowan D.A., Heaply S. et al.* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006. V. 56. № 6. P. 1217–1221.
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.64105-0>
33. *Zhao W., Zhang C.L., Romanek C.S., Wiegand J.* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2008. V. 58. № 5. P. 1106–1108.
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.65363-0>
34. *de Jong S.I., van den Broek M.A., Merkel A.Y., de la Torre Cortes P., Kalamorz F., Cook G.M. et al.* // Extremophiles. 2020. V. 24. № 6. P. 923–935.
<https://doi.org/10.1007/s00792-020-01205-w>
35. *Yampayont P., Iizuka M., Ito K., Limpaseni T.* // J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. 2006. V. 56. № 1–2. P. 203–207.
<https://doi.org/10.1007/s10847-006-9084-3>
36. *Alves-Prado H.F., Carneiro A.A.J., Pavezzi F.C., Gomes E., Boscolo M., Franco C.M.L. et al.* // Appl. Biochem. Biotechnol. 2008. V. 146. № 1–3. P. 3–13.
<https://doi.org/10.1007/s12010-007-8093-z>
37. *Savergave L.S., Dhule S.S., Jogdand V.V., Nene S.N., Gadre R.V.* // Biochem. Eng. J. 2008. V. 39. № 3. P. 510–515.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.09.020>
38. *More S.S., Niraja R., Evelyn C., Byadgi A.M., Shweta V., Mangaraj S.D.* // Croatian J. Food Technol. Biotechnol. Nutrit. 2012. V. 7. № 1–2. P. 90–97.
39. *Reddy S.V., More S.S., Annappa G.S.* // J. Basic Microbiol. 2017. V. 57. № 11. P. 974–981.
<https://doi.org/10.1002/jobm.201700270>
40. *Atanasova N., Kitayska T., Bojadjieva I., Yankov D., Tonkova A.* // Process Biochem. 2011. V. 46. № 1. P. 116–122.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.027>
41. *Cao X., Jin Z., Chen F., Wang X.* // J. Food Biochem. 2005. V. 28. № 6. P. 463–475.
<https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2004.04603.x>
42. *Kitayska T., Petrova P., Ivanova V., Tonkova A.* // Appl. Biochem. Biotechnol. 2011. V. 165. № 5–6. P. 1285–1295.
<https://doi.org/10.1007/s12010-011-9346-4>
43. *Fujita Y., Tsubouchi H., Inagi Y., Tomita K., Ozaki A., Nakanishi K.* // J. Ferment. Bioeng. 1990. V. 70. № 3. P. 150–154.
[https://doi.org/10.1016/0922-338X\(90\)90174-U](https://doi.org/10.1016/0922-338X(90)90174-U)
44. *Yim D.G., Sato H.H., Park Y.H., Park Y.K.* // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 1997. V. 18. № 6. P. 402–405.
<https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900400>
45. *Higuti I.H., Grande S.W., Sacco R., Jose do Nascimento A.* // Braz. Arch. Biol. Technol. 2003. V. 46. № 2. P. 183–186.
<https://doi.org/10.1590/S1516-89132003000200007>
46. *Li C., Chen S., Gu Z., Hong Y., Cheng L., Li Z.* // Food Biosci. 2018. V. 26. P. 139–144.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.10.006>
47. *Chung H.-J., Yoon S.-H., Kim M.-J., Kweon K.-S., Lee I.-W., Kim J.-W. et al.* // J. Agric. Food Chem. 1998. V. 46. № 3. P. 952–959.
<https://doi.org/10.1021/jf970707d>
48. *Jia X., Ye X., Chen J., Lin X., Vasseur L., You M.* // Starch – Stärke. 2017. V. 70. № 1–2.
<https://doi.org/10.1002/star.201700016>

Cyclodextrin Glucanotransferase of Alkalophilic Strain *Caldalkalibacillus mannanilyticus* IB-OR17-B1

P. Yu. Milman^a, E. A. Gilvanova^a, and G. E. Aktuganov^{a, *}

^a Institute of Biology of Ufa Federal Research Centre of the RAS, Ufa, 450054 Russia

*e-mail: gleakt@anrb.ru

Extracellular cyclodextrin glucanotransferase (CGTase, K.F.2.1.19) was characterized for the first time in a strain of bacteria of the species *Caldalkalibacillus mannanilyticus* IB-OR17-B1. The enzyme was isolated from the culture supernatant using ultrafiltration and affinity adsorption on corn starch. The specific activity of the CGTase was increased in 18-fold as a result of purification with the enzyme yield 56%. The molecular mass of the purified enzyme was 70 kDa according to the denaturing electrophoresis in polyacrylamide gel. The CGTase of *C. mannanilyticus* IB-OR17-B1 demonstrated a maximal cyclizing activity under pH 8 and temperature 60°C, respectively, and it was stable in the pH range 7–10 and temperatures ≤70°C. The thermal stability of the enzyme under 70°C increased by 10–15% in the presence 5–10 mM of calcium and magnesium salts. The cations of Ag⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺ and Fe³⁺ in concentration 5 mM inhibited a CGTase activity by 90, 26, 23, 18 and 11%, respectively. The purified CGTase under optimal conditions and enzyme-substrate ratio 1 U/g converted a potato starch during 24 h to mixture of α-, β- and γ-cyclodextrins with mass ratio 38.8 : 52.6 : 8.6 and yield 42%.

Keywords: cyclodextrin glucanotransferase, cyclodextrins, *Caldalkalibacillus mannanilyticus*, alkalophilic bacteria, thermostable enzyme

УДК 579.67

ИЗМЕНЕНИЕ ПРОФИЛЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ И ОБРАЗОВАНИЕ ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ПРИ ФЕРМЕНТАЦИИ КОРОВЬЕГО МОЛОКА ПРОБИОТИЧЕСКИМИ ШТАММАМИ *Lactocaseibacillus paracasei*

© 2023 г. К. В. Моисеенко¹, А. В. Шабаев¹, О. А. Глазунова¹, О. С. Савинова¹, Т. В. Федорова^{1, *}

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

*e-mail: fedorova_tv@mail.ru

Поступила в редакцию 09.04.2023 г.

После доработки 20.04.2023 г.

Принята к публикации 29.04.2023 г.

Проведен сравнительный анализ профиля жирных кислот (ЖК) и летучих органических соединений (ЛОС) коровьего обезжиренного молока, ферментированного четырьмя различными пробиотическими штаммами *Lactocaseibacillus paracasei* (АВК, КF1, МА2 и МА3). Анализ профилей ЖК и ЛОС проводили с использованием ГХ-МС. Для дополнительной характеристики изменений запаха и его выраженности в образцах ферментированного *L. paracasei* молока использовали анализатор запахов E-nose “электронный нос”. Суммарно во всех образцах было обнаружено 42 различных ЖК, из которых 17 были насыщенными, 8 – мононенасыщенными и 5 – полиненасыщенными ЖК. Различия между исследованными образцами носили штамм-специфичный характер и не могли быть объяснены лишь варьированием вклада нескольких отдельно взятых ЖК. Рассчитанные на основе состава ЖК индексы, характеризующие пищевую и биологическую ценность образцов, отличались для молока, ферментированного различными штаммами. Анализ ЛОС показал, что основными формирующими запах соединениями в исследованных образцах были ЖК и продукты их метаболизма – 2-гептанон, 2-нонанон и 2-нонанол, которые образовывались в результате превращений: β-окисление → → декарбоксилирование → восстановление. Аромат продуктов ферментации *L. paracasei*, предсказанный на основе запахов индивидуальных ЛОС, в целом, совпадал с описанным при органолептической оценке, как типичный для сквашенного молока (йогурт, простокваша) аромат с цветочно-фруктовыми нотками.

Ключевые слова: *Lactocaseibacillus paracasei*, коровье молоко, ферментация, ГХ-МС, “электронный нос”, жирные кислоты, летучие органические соединения

DOI: 10.31857/S0555109923050136, EDN: NRGPVU

На территории Российской Федерации и стран СНГ кисломолочные продукты такие, как кефир, ряженка, йогурт и простокваша, традиционно пользуются большой популярностью. Спрос на эти продукты исторически обусловлен их высокой питательной ценностью, приятными органолептическими характеристиками и долгими сроками хранения. Более того, систематическое употребление этих продуктов снижает риск возникновения различных заболеваний и способствует сохранению и улучшению состояния здоровья [1].

В настоящее время продукты, которые помимо их питательной ценности так же обладают различными оздоравливающими эффектами (антигипертензивные, гипохолестеринемические и иммуномодулирующие) принято называть “функциональными” [2]. Сегодня рынок функциональных

продуктов более чем наполовину представлен кисломолочными продуктами [3]. Функциональные свойства этих продуктов прежде всего обусловлены заквасочными культурами, используемыми для их изготовления [4]. В процессе ферментации в результате протеолиза, гликолиза и липолиза соответственно белков, жиров и углеводов молока, при участии ферментов заквасочных культур образуется ряд летучих и нелетучих соединений, включая органические кислоты, пептиды, аминокислоты и другие низкомолекулярные соединения [5]. Образование этих соединений приводит к повышению кислотности, формированию уникального вкуса и аромата, а также изменению питательных и функциональных свойств ферментированного продукта [6].

Возрастающий спрос на функциональные продукты питания вызвал повышенный интерес к изменению состава традиционных и созданию принципиально новых заквасок [7–9]. Так в состав заквасок наряду со стартерными (техническими) культурами молочнокислых бактерий (МКБ) включают различные микроорганизмы с пробиотическими свойствами, способные оказывать благотворное влияние на функционирование как всего организма, так и отдельных его систем [10].

Одной из наиболее перспективных лактобактерий, способной существенно повысить функциональный потенциал получаемого кисломолочного продукта, является *Lacticaseibacillus paracasei* (ранее *Lactobacillus paracasei*) [11]. На сегодняшний день ряд выделенных штаммов *L. paracasei* уже используются как в качестве пробиотиков, так и в качестве дополнительных штаммов в традиционных йогуртовых заквасках: *L. paracasei* DG (*L. paracasei* CNCM I-1572) используется в качестве моноштаммового пробиотика в пищевой добавке Enterolactis итальянской компании SOFAR; *L. paracasei* F19 от Chr. Hansen используется как часть закваски в популярном скандинавском йогурте от компании Arla Foods; *L. paracasei* Shirota используется как моноштаммовая закваска для приготовления японского подслащенного пробиотического молочного напитка Yakult компании Yakult Honsha.

Несмотря на то, что в настоящее время известно более 300 штаммов *L. paracasei* с секвенированными геномами [12], поиск новых перспективных штаммов *L. paracasei* продолжается. Ранее в работе Моисеенко с соавт. [13] были охарактеризованы штаммы *L. paracasei* KF1, АВК, выделенные из кефирных грибков, и штаммы *L. paracasei* МА2 и МА3, выделенные из традиционного Южно-Африканского безалкогольного напитка на основе кукурузы, махеву. Также был проведен сравнительный анализ секвенированных геномов данных четырех штаммов и исследован ряд их пробиотических и функциональных свойств таких, как антагонистическая активность в отношении распространенных патогенных микроорганизмов и способность синтезировать в процессе ферментации коровьего молока биоактивные пептиды с антиоксидантными и антигипертензивными свойствами [13].

Целью настоящей работы было исследование изменения профиля жирных кислот (ЖК) и образование летучих органических соединений (ЛОС) при ферментации коровьего молока пробиотическими штаммами *L. paracasei* KF1, АВК, МА2 и МА3. Знания о составе ЖК и ЛОС для молока, ферментированного различными штаммами *L. paracasei*, в совокупности со знанием генетических особенностей, определяющих метаболический потенциал каждого из штаммов, формируют научную базу для дальнейшего их использования при созда-

нии новых функциональных пре- и пробиотических субстанций.

МЕТОДИКА

Штаммы и условия культивирования. Штаммы лактобактерий *L. paracasei* АВК, *L. paracasei* KF1, *L. paracasei* МА2 и *L. paracasei* МА3 были получены из Коллекции Всероссийского научно-исследовательского Института молочной промышленности (ВНИМИ, Москва, Россия), где их хранили при температуре -80°C в обезжиренном молоке, содержащем 10% (об./об.) глицерина. Штаммы *L. paracasei* АВК и *L. paracasei* KF1 были выделены из кефирного грибка [14], штаммы *L. paracasei* МА2 и *L. paracasei* МА3 из махеву – традиционного безалкогольного напитка в Южно-Африканской Республике, получаемого путем ферментации кукурузной муки [15]. Для всех штаммов последовательности генов 16S рРНК были депонированы в GeneBank: *L. paracasei* МА2 под номером MW558121.1, *L. paracasei* АВК – MN994625.1, *L. paracasei* МА3 – MW558122.1 и *L. paracasei* KF1 – MW558119.1. Также геномы всех штаммов были отсекувенированы и депонированы в GeneBank [13]: *L. paracasei* МА2 под номером GCA_018966985.1, *L. paracasei* АВК – GCA_018967025.1, *L. paracasei* МА3 – GCA_023470655.1 и *L. paracasei* KF1 – GCA_023470645.1.

Для культивирования лактобактерий использовали восстановленное (120 г на 1 л воды) обезжиренное коровье молоко (ОАО “Слуцкий сыродельный комбинат”, Республика Беларусь) после автоклавирования (1 атм., 10 мин).

Ферментированные образцы получали внесением в стерилизованное обезжиренное коровье молоко 3% инокулята *L. paracasei* каждого штамма с последующей инкубацией в течение 48 ч при температуре $(37 \pm 1)^{\circ}\text{C}$. По окончании ферментации концентрация лактобактерий в каждом образце составляла в среднем (8.8 ± 0.1) lg КОЕ/мл.

По окончании ферментации проводили органолептическую оценку образцов с участием восьми экспертов, знакомых с продуктом. Образцы оценивали по консистенции, аромату, вкусу, горечи, цвету и общей приемлемости.

Профиль жирных кислот ферментированного молока. Экстракцию ЖК из образцов ферментированного молока проводили по методу Фолча. После экстракции ЖК были дериватизированы с использованием 3 М метанольного раствора HCl (“Supelco”, США) в соответствии с протоколом производителя. Производные ЖК разделяли на хроматографе GC 2010 (“Shimadzu”, Япония) с колонкой MDN-5 (30 м × 0.25 мм; “Thermo Scientific”, США) и анализировали с на масс-детекторе GCMS-QP 2010 в режиме температурного градиента. В качестве стандарта использовали набор

ПНЖК-2 (“Supelco”, США). Идентификацию ЖК проводили, как описано в работе Моисеенко с соавт. [15]. Относительные интенсивности (далее относительные содержания) ЖК получали нормированием на общую интенсивность припи-

сываемых пиков. Все эксперименты проводились в трехкратной повторности.

Оценку показателей качества жиров кислomолочных продуктов проводили с использованием следующих индексов, которые рассчитывали в соответствии с Чен с соавт. [16]:

$$\begin{aligned} \text{ПНЖК/НЖК} &= \frac{\sum \text{ПНЖК}}{\sum \text{НЖК}}; \\ \text{IA} &= \frac{[\text{C12:0} + (4 \times \text{C14:0}) + \text{C16:0}]}{[\sum \text{МНЖК} + \sum \text{ПНЖК}]}; \\ \text{НРI} &= \frac{[\sum \text{МНЖК} + \sum \text{ПНЖК}]}{[\text{C12:0} + (4 \times \text{C14:0}) + \text{C16:0}]}; \\ \text{IT} &= \frac{[\text{C14:0} + \text{C16:0} + \text{C18:0}]}{[0.5(\sum \text{МНЖК} + \sum \text{ПНЖК}\{n-6\})]}; \\ \text{НН} &= \frac{[\text{C18:1} + \sum \text{ПНЖК}]}{[\text{C12:0} + \text{C14:0} + \text{C16:0}]}; \\ \text{UI} &= 1(\% \text{monoenoics}) + 2(\% \text{dienoics}) + 3(\% \text{trienoics}) + 4(\% \text{tetraenoics}), \end{aligned}$$

где НЖК – насыщенные жирные кислоты; МНЖК – мононенасыщенные жирные кислоты; ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты; IA – индекс атерогенности; НРI – индекс здоровья (является обратным IA и используется в основном в исследованиях молочных продуктов); IT – индекс тромбогенности; НН – соотношение между гипохолестеринемическими и гиперхолестеринемическими жирными кислотами; UI – индекс ненасыщенности.

Анализ запаха и его интенсивности на приборе “электронный нос”. Для проведения мультисенсорных исследований запаха ферментированного разными штаммами *L. paracasei* коровьего молока на приборе “VOCmeter” (“AppliedSensor”, Германия), из каждого анализируемого образца после его перемешивания отбирали по три пробы массой 3 г и помещали в специальные стеклянные вials, которые затем плотно закрывали и термостатировали при температуре 60°C. Далее в вials вводилась игла для автоматического отбора анализируемого газа, который поступал в прибор “VOCmeter”. Анализ полученных откликов металлоксидных сенсоров (MOS 1–4) прибора проводили с использованием специальной программы “Argus”.

Анализ летучих органических соединений методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией. Для анализа ЛОС были объединены эквивалентные объемы молока, заквашенного с помощью *L. paracasei* KF1, *L. paracasei* АВК, *L. paracasei* МА2 и *L. paracasei* МА3. Летучие соединения экстрагировали методом твердофазной микроэкстракции с применением картриджей SPME Fiber Assembly Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene (PDMS/DVB) (“Supelco”, США). Экстрагированные ЛОС анализировали на газовой хроматографе GS 2010 (“Shimadzu”, Япония) с колонкой Optima-1 (25 м × 0.25 мм, “Supelco”, США), непосредственно подключенному к масс-спектрометру GCMS-QP 2010 (“Shimadzu”, Япония). Перед анализом колон-

ка была откалибрована по стандартам индекса удерживания (“Sigma” США) алифатических углеводородов C8 и C32. Обнаружение массы проводилось в режиме регистрации ТИС в диапазоне масс (m/z) от 45 до 450. Относительные интенсивности (далее относительное содержание) ЛОС были получены нормированием на общую интенсивность идентифицированных пиков. Летучие соединения идентифицировали путем сравнения их экспериментальных спектров со спектрами Национального института стандартов и технологий (база данных масс-спектров NIST/EPA/NIH, NIST 11). Только отнесения пиков с достоверностью идентификации ≥90% считались надежными. Данные об ароматах отдельных соединений были извлечены из базы FlavorDB [17].

Статистический и биоинформационный анализ. Все статистические сравнения выполнялись с использованием подхода однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и применением F-критерия Фишера. При обнаружении значимого ($p < 0.05$) значения F-статистики попарные различия между средними оценивали с помощью теста множественных сравнений, применяя критерий Тьюки (HSD тест Тьюки) ($p < 0.05$).

Анализ главных компонент (англ. Principal Components Analysis, PCA) проводился на нормализованных z-масштабированных данных. Для иерархической кластеризации тепловой карты в качестве меры близости использовалось корреляционное расстояние, а кластеризация проводилась методом k-средних.

Для поиска генов, кодирующих ферменты метаболических путей, использовали как аннотацию геномов, ранее полученную [13] с помощью программы Anvi'o [18, 19], так и аннотацию, полученную в ходе выполнения данной работы с помощью программы eggNOG-mapper v2 [20]. Визуальный анализ полноты того или иного метаболического пути проводили с помощью программы KEGG Mapper [21].

Таблица 1. Соотношение различных ЖК в образцах молока, ферментированного исследуемыми штаммами *L. paracasei*

Категории	Штамм <i>L. paracasei</i>				
	Молоко	МА2	АВК	МА3	КФ1
	Вклад, %*				
Насыщенные ЖК	56	58	57	60	63
Короткоцепочечные ЖК	6	6	5	4	8
Мононенасыщенные ЖК	30	29	27	28	20
Полиненасыщенные ЖК	10	9	13	7	6
Разветвленные ЖК	3	2	Н.о.**	4	Н.о.
2-гидрокси-разветвленные ЖК	Н.о.	0.8	0.6	0.1	7.3
Окисленные ЖК	1.2	1.1	2.2	Н.о.	3.4

* Предел погрешности не превышал единицы последней значащей цифры.

** Н.о. — не обнаружено.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Профиль жирных кислот ферментированного молока. В результате анализа состава ЖК, во всех исследованных образцах было обнаружено 42 различные ЖК, большая часть которых относилась к насыщенным (17 соединений) и ненасыщенным (8 соединений мононенасыщенные и 5 — полиненасыщенные) (рис. 1). Соотношения различных ЖК в образцах представлены в табл. 1. Содержание насыщенных ЖК в молоке, ферментированном штаммами *L. paracasei* АВК и МА2, статистически значимо не отличалось от такового в не ферментированном молоке (57%), а в молоке, ферментированном штаммами *L. paracasei* КФ1 и МА3 — значимо увеличивалась (до 60 и 63%, соответственно). Содержание мононенасыщенных ЖК в молоке, ферментированном штаммами *L. paracasei* МА2 и МА3 было таким же, как в не ферментированном в молоке (30%), а в молоке, ферментированном штаммами *L. paracasei* АВК и КФ1 — значимо уменьшалась (до 27 и 20%, соответственно). Содержание полиненасыщенных ЖК в молоке, ферментированном штаммом *L. paracasei* МА2, было таким же, как в неферментированном молоке (10%); в молоке, ферментированном штаммом АВК — увеличивалось до 13%; в молоке, ферментированном штаммами *L. paracasei* КФ1 и МА3 — уменьшалось до 7%. Изменение содержания свободных ЖК в ходе ферментации молока с одной стороны может быть связано с процессами липолиза молочного жира, а с другой — с биосинтезом ЖК лактобациллами *de novo*. Ранее в работе Моисеенко с соавт. [13] было показано, что все 4 штамма *L. paracasei* в тестах API ZYM проявляли С4-эстеразную и С8-липазную/эстеразную активности, что в свою очередь могло приводить к гидролизу триглицеридов молочного жира с высвобождением преимущественно короткоцепочечных (С4:0–С10:0) ЖК

[22]. Причем штаммы из кефирного грибка АВК и КФ1 имели более высокую эстеролитическую активность *in vitro*. С другой стороны, анализ геномов *L. paracasei* показал наличие генов, кодирующих белки FabD, FabF, FabG, FabZ, FabK и др., которые участвуют в синтезе алифатических карбоновых кислот с числом углеродных атомов от 6 до 18, в частности капроновой (гексановой С6:0), каприловой (октановой С8:0), каприновой (декадановой С10:0), лауриновой (додекановой С12:0), миристиновой (тетрадекановой С14:0), пальмитиновой (гексадекановой С16:0), стеариновой (октадекановой С18:0).

Также в образцах ферментированного молока было обнаружено от 1 до 4% разветвленных ЖК (9 соединений) и от 0.1 до 7% 2-гидрокси-разветвленных ЖК (ВСНА, branched chain hydroxy acids). Среди 2-гидрокси-разветвленных ЖК были идентифицированы 2 соединения, такие как 2-гидрокси-3-метилпентановая кислота (или 2-гидрокси-3-метилвалериановая, НМВА) и 2-гидрокси-4-метилпентановая кислота (или 2-гидрокси-4-метилвалериановая, или лейциновая кислота, НИСА), которые образуются в результате метаболизма разветвленных аминокислот L-изолейцина и L-лейцина в клетках МКБ: аминокислота → α-кето-кислота → → 2-гидрокси-кислота [23]. Биоинформационный анализ показал наличие в геномах всех 4 штаммов *L. paracasei* гена *ilvE*, кодирующего аминотрансферазу разветвленных аминокислот (BCAT, branched-chain aminotransferase, КФ 2.6.1.42) и различные гены, кодирующие D-специфичные дегидрогеназы 2-гидрокси-кислот (2HADHs, D-2-hydroxyacid dehydrogenases, КФ 1.1.1.-) — 4 гена у штамма КФ1 и 5 у АВК, МА2 и МА3. BCAT осуществляет трансаминирование L-изолейцина и L-лейцина с образованием 2-кето-3-метилвалерата (или 3-метил-2-оксовалерата) и 2-кето-4-метилвалерата (или 4-метил-2-оксовалерата) соответственно,

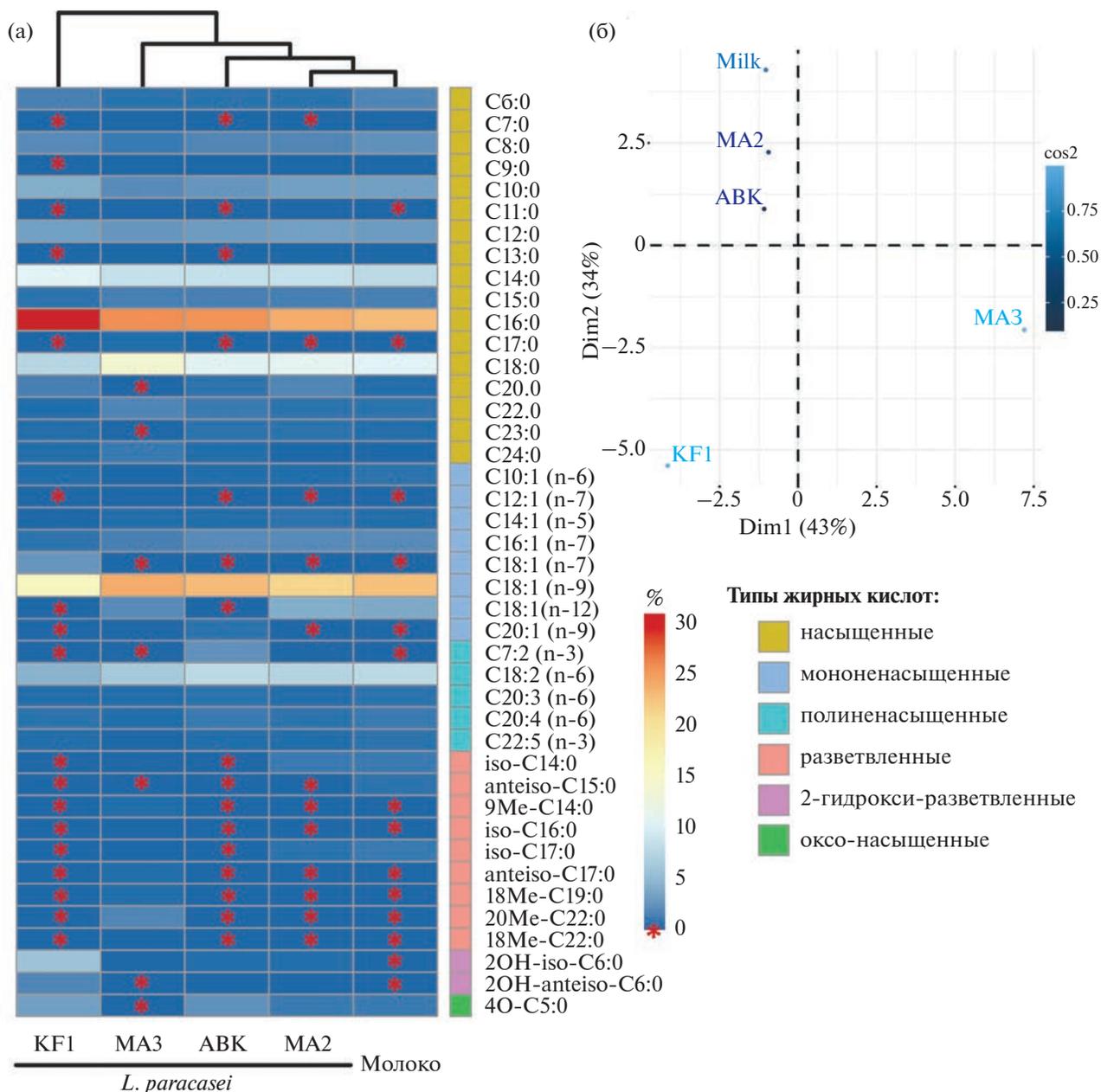


Рис. 1. Сравнение профилей ЖК в образцах молока, ферментированного исследуемыми штаммами *L. paracasei*: а – иерархически кластеризованная тепловая карта; б – диаграмма рассеяния в пространстве выделенных двух главных компонент (Dim1 и Dim2). Проценты объясненной дисперсии, показывающие долю общего разброса точек, приходящуюся на каждую из главных компонент, указаны в скобках. Величины квадратов косинусов углов между векторами индивидов и плоскостью главных компонент показаны цветом.

дальнейшее восстановление которых до 2-гидроксикислот происходит при участии оксидоредуктаз (2НАДНs) [24, 25]. Недавно в *in vivo* экспериментах на моделях сахарного диабета 2 типа и диет-индуцированного метаболического синдрома было показано, что гипогликемический и гиполипидемический эффекты при приеме йогуртов обусловлены наличием в них ВСНА (таких как НИСА, НМВА и 2-гидроксиизовалериановая

кислота НИВА), которые регулируют углеводный и липидный обмен в гепатоцитах и миоцитах лабораторных животных [26]. Авторы показали, что данные метаболиты, являясь продуктами биосинтетической активности заквасочных йогуртовых культур, отсутствовали в не ферментированном молоке. В настоящей работе также были обнаружены НИСА и НМВА только в ферментированном молоке, при этом их относительное содержание

сильно варьировало в зависимости от штамма *L. paracasei*. Самое высокое было отмечено для *L. paracasei* KF1 (табл. 1, рис. 1).

Группа окисленных ЖК была представлена только 4-оксо-пентановой (левулиновой) кислотой, содержание которой доходило до 3%. 4/5-оксо-карбоновые кислоты, возможно, могут образовываться в результате восстановления соответствующих 4/5-гидроксикислот, которые в свою очередь образуются в результате окисления свободных жирных кислот, высвобождаемых в процессе гидролиза молочного жира.

Дополнительно стоит выделить группу короткоцепочечных ЖК (C4:0–C10:0), относящихся к ненасыщенным ЖК, которые обладают особо выраженным положительным воздействием на здоровье человека: нормализуют уровень липидов и глюкозы в крови, купируют воспалительные процессы и ингибируют пролиферацию опухолевых клеток [27, 28]. Содержание короткоцепочечных ЖК в ферментированном штаммами *L. paracasei* МА2 и АВК молоке было таким же как в неферментированном (6%). В молоке, ферментированном штаммом *L. paracasei* МА3 уменьшалось до 4%, а в молоке, ферментированном штаммом KF1, напротив, увеличивалась до 8%.

Во всех исследованных образцах наблюдалось доминирование пяти ЖК (рис. 1) – пальмитиновой (C16:0), олеиновой (C18:1 (n-9)), стеариновой (C18:0), миристиновой (C14:0) и линолевой (C18:2 (n-6)). Вклад пальмитиновой кислоты составлял от 23 до 31%, олеиновой – от 16 до 24%, стеариновой – от 7 до 14%, миристиновая – от 8 до 11% и линолевой – от 4 до 8%. Вклад остальных ЖК варьировал от 0.02 до 3.5% (в среднем – 0.7%). Среди короткоцепочечных ЖК (C4:0–C10:0) преобладали декановая (C10:0; 2–4%) и октановая (C8:0; 1–2%) кислоты, а суммарное количество короткоцепочечных ЖК составляло от 4 до 8%.

В целом полученные данные по ЖК составу исходного молока и молока, ферментированного различными штаммами *L. paracasei* находятся в пределах значений, ранее опубликованных для коровьего молока и кисломолочных продуктов. Во многих работах было показано, что из более чем 400 различных ЖК, входящих в состав триацилглицеридов молочного жира, почти все присутствуют в следовых количествах, и только около 15 кислот присутствуют на уровне 1% или выше [29]. Обычно, примерно 70% всех ЖК коровьего молока приходится на насыщенные ЖК, при этом на долю пальмитиновой, стеариновой и миристиновой кислот приходится около 30, 12 и 11% соответственно. Примерно 11% приходится на короткоцепочечные ЖК. Приблизительно 25% ЖК в молоке являются мононенасыщенными, при этом доля олеиновой кислоты (18 : 1) составляет около 24%. Полиненасыщенные жирные кисло-

ты составляют ~2% от общего количества жирных кислот [30–32].

На данный момент опубликовано лишь небольшое количество работ об изменениях состава ЖК молока в процессе его ферментации чистыми культурами МКБ, при этом данные, приводимые в этих работах, весьма противоречивы. Так в работе Соломон с соавт. [33] было показано, что ферментация сливок восемью чистыми культурами широко используемыми в промышленности МКБ, существенно не изменяла состав их ЖК. В то же время, в работе Йылмаз-Эрсан с соавт. [34] было показано, что чистые культуры трех пробиотических МКБ увеличивали содержание среднецепочечных и полиненасыщенных ЖК в ферментированных сливках. В работе Экинчи с соавт. [35] при ферментации сливок шестью пробиотическими МКБ было показано, что содержание короткоцепочечных ЖК существенно изменялось в зависимости от используемого микроорганизма, а концентрации длинноцепочечных ЖК оставались неизменными. Напротив, в работе Бао с соавт. [36] показали значительное увеличение длинноцепочечных ЖК и неизменность содержания короткоцепочечных при ферментации молока *Lactobacillus casei*. Также стоит отметить, что сравнительные исследования изменения ЖК состава молока при его сбраживании различными штаммами одного вида МКБ практически отсутствовали.

Сравнение полученных профилей ЖК для исходного молока и молока, ферментированного четырьмя различными штаммами *L. paracasei* представлено в виде тепловой карты с иерархической кластеризацией и диаграммы рассеяния в пространстве выделенных двух главных компонент рис. 1. В целом в процессе ферментации штаммы *L. paracasei* KF1 и *L. paracasei* МА3 изменяли состав ЖК молока сильнее, чем штаммы АВК и МА2. При этом за наблюдаемое распределение точек в пространстве главных компонент были в равной степени ответственны 26 из 42 обнаруженных ЖК, каждая из которых вносила примерно равный вклад (от 2.5 до 3%) в две выделенные главные компоненты, в сумме объясняющие 77% всей вариации между образцами. Таким образом, различия между исследованными образцами носят комплексный штамм-специфичный характер и не могут быть объяснены лишь изменением вклада нескольких ЖК.

Для комплексной оценки полученных ферментированных продуктов был рассчитан ряд индексов, основанных на соотношении определенных насыщенных и ненасыщенных ЖК и характеризующих качество липидов жировой фазы (табл. 2). Так, например, IA отражает вероятность развития атеросклероза при постоянном употреблении анализируемого образца [37], IT – вероятность

Таблица 2. Расчетные индексы, характеризующих качество липидов жировой фазы в образцах молока, ферментированного исследуемыми штаммами *L. paracasei*

Индекс*	Быстрая интерпретация	Штамм <i>L. paracasei</i>				
		молоко	МА2	АВК	МА3	KF1
ПНЖК/НЖК	“чем выше, тем лучше”	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1
IA	“чем ниже, тем лучше”	1.4	1.6	1.6	1.8	2.9
НPI	“чем выше, тем лучше”	0.7	0.6	0.6	0.6	0.3
IT	“чем ниже, тем лучше”	1.9	2.1	1.6	2.6	3.5
НН	“чем выше, тем лучше”	1.0	0.8	1.0	0.8	0.5
UI	“чем выше, тем лучше”	55	51	57	45	35

* Предел погрешности в значениях индексов не превышал двух единиц последней значащей цифры.

развития тромбоза [37], а НН – вероятность развития гиперхолестеринемии [38]. В целом все рассчитанные индексы показывали, что ферментация молока штаммами *L. paracasei* АВК и МА2 значительно не влияла на риски возникновения заболеваний сердечно-сосудистой системы, связанных с его постоянным потреблением. В тоже время для молока, ферментированного штаммами *L. paracasei* KF1 и МА3 все индексы были несколько хуже, чем для исходного молока. В целом, рассчитанные индексы находились в диапазоне, ранее установленном для различных кисломолочных продуктов, таких как йогурт, кефир, ряженка и амаси [15, 16].

Анализ летучих органических соединений на приборе “электронный нос”. Мультисенсорный анализ летучей фазы образцов молочных продуктов, ферментированных исследуемыми штаммами *L. paracasei*, представлен на рис. 2. Вид “визуальных отпечатков” запаха, построенных по отклику четырех сенсоров, детектирующих общее

наличие альдегидов, низкомолекулярных азотсодержащих соединений, свободных аминокислот и кетонов, совпадал для всех исследованных образцов (на рис. 2а – одинаковые по форме, но имеющие разные размеры четырехугольники). На основании рассчитанных площадей “визуальных отпечатков” запаха (рис. 2б) можно заключить, что наиболее выраженным запахом характеризовался образец молока, ферментированного штаммом *L. paracasei* АВК. Остальные образцы имели примерно одинаковые площади “визуальных отпечатков”, которые были в среднем на 33% меньше таковой для образца АВК.

Анализ летучих органических соединений методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией. Для уточнения информации, полученной с применением системы “электронный нос”, был проведен ГХ-МС анализ профиля ЛОС объединенных образцов молока, ферментированного исследуемыми штаммами *L. paracasei* (табл. 3). В целом данные ГХ-МС не противоречили данным,

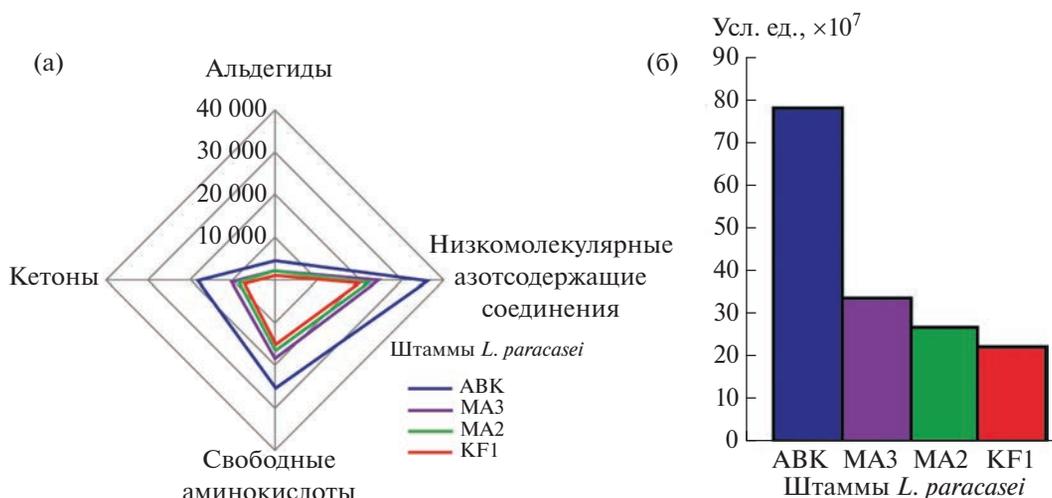


Рис. 2. Анализ профиля ЛОС на приборе “электронный нос”; а – визуальные “отпечатки запаха”, усл. ед.; б – площадь визуальных “отпечатков запаха” (усл. ед. × 10⁷).

Таблица 3. ГХ-МС-анализ профиля ЛОС объединенных образцов молока, ферментированного исследуемыми штаммами *L. paracasei*

Название	PubChem ID	Относительная интенсивность, %*	Запах
Жирные кислоты			
Декановая (каприновая)	2969	34	Цитрусовый с жирной нотой
Гексановая (капроновая)	8892	17	Типичный “козий”
Октановая (каприловая)	379	12	Слегка неприятный кисловато-фруктовый
Гексадекановая (пальмитиновая)	985	7	Практически отсутствует
Всего:		70	
Вторичные спирты			
Изопропанол	3776	9	Неприятный, резкий, напоминающий ацетон
2-нонанол	12367	4	Цветочный, фруктовый с оттенками розы и апельсина
Всего:		13	
Метилкетоны			
2-гептанон	8051	6	Бананово-фруктовый
2-нонанон	13187	4	Фруктово-цветочный
Всего:		10	
Аминокислоты			
Треонин	6288	7	Практически отсутствует
Всего:		7	

* Предел погрешности не превышал единицы последней значащей цифры.

полученным с помощью системы “электронный нос”, но при этом давали более детальное представление о составе ЛОС исследуемых образцов. Так показано, что профиль ЛОС представлен в основном такими группами соединений как жирные кислоты (69%), вторичные спирты (13%) и метилкетоны (11%). Среди ЖК были детектированы пальмитиновая (C16:0), каприновая (C10:1), каприловая (C8:0) и капроновая (C6:0), среди группы вторичных спиртов – изопропанол и 2-нонанол, а среди группы метилкетонов – 2-гептанон и 2-нонанон. Также среди ЛОС объединенной пробы было обнаружено присутствие 7% аминокислоты треонин.

Исходя из ранее опубликованных данных [17], все детектированные ЛОС, кроме пальмитиновой кислоты и треонина, обладали ярко выраженными индивидуальными запахами (табл. 3). При этом аромат продуктов ферментации, предсказанный на основе запахов индивидуальных ЛОС, в целом, совпадал с описываемым участниками органолептической оценки и являлся типичным для сквашенного молока (йогурт, простокваша) свежим ароматом с цветочно-фруктовыми нотка-

ми. Хотя пальмитиновая кислота и треонин не обладают ярко выраженными запахами они также существенно влияют на органолептические свойства продукта [17]. Пальмитиновая кислота придает сквашенному молоку “маслянистость”, а треонин – сладковатый привкус. Обе эти характеристики также отмечались участниками в ходе проведения органолептической оценки.

Предшественниками ЛОС в кисломолочных продуктах в основном являются ЖК, углеводы и аминокислоты, как присутствующие в исходном молоке, так и образующиеся в процессе его ферментации заквасочными культурами МКБ [39]. Как показало исследование при использовании штаммов *L. paracasei* для ферментации коровьего молока основным источником ЛОС были насыщенные ЖК и продукты их окислительно-восстановительных превращений – метилкетоны и вторичные спирты [40]. Считается, что для *Lactobacillus* spp. большинство биохимических реакций с участием ЖК молока происходят внутриклеточно. В клетку ЖК попадают либо напрямую через специфические транспортные системы, либо опосредовано в составе жиров, расщепляемых

внутриклеточными липазами и эстеразами [41]. Внутри клетки насыщенные ЖК вступают в реакцию β -окисления с образованием β -кетокислот, в результате декарбоксилирования которых образуются соответствующие метилкетоны [5]. Образованные метилкетоны могут далее восстанавливаться до вторичных спиртов. Как образующиеся внутри клетки ЖК, так и метилкетоны со вторичными спиртами могут в дальнейшем попадать во внеклеточное пространство либо путем диффузии, либо с участием пока еще не установленных транспортных систем [42]. В табл. 3 можно выделить две группы веществ, связанных друг с другом вышеописанными биохимическими реакциями:

каприновая кислота \rightarrow 2-нонанон \rightarrow 2-нонанол;
октановая кислота \rightarrow 2-гептанон.

Изопропанол может также быть продуктом β -окисления \rightarrow декарбоксилирования \rightarrow восстановления бутановой (масляной) кислоты.

Необходимо отметить, что *L. paracasei* относится к факультативно гетероферментативным МКБ [43] и может при выращивании на углеводах дополнительно к лактату (молочной кислоте) синтезировать такие ЛОС, как ацетат (уксусная кислота), ацетоин, ацетальдегид и/или этанол [5]. Более того в ранее отсеквенированных геномах каждого из исследуемых штаммов обнаружен полный набор ферментов для осуществления гетероферментативного типа брожения [13]. Однако при ферментации коровьего молока все исследованные штаммы *L. paracasei* не синтезировали детектируемых количеств вышеперечисленных ЛОС в качестве конечных продуктов брожения молочного сахара лактозы.

Наличие треонина среди ЛОС может косвенно свидетельствовать о повышенном уровне этой аминокислоты в ферментированном молоке. Действительно *in silico* анализ геномов показал способность всех 4 штаммов *L. paracasei* синтезировать *de novo* L-треонин из L-аспартата (KEGG MODULE: M00018 threonine biosynthesis pathway) и наличие 5 генов, кодирующих транспортные системы для выделения треонина из клетки (threonine/serine exporter ThrE family). С другой стороны, у исследуемых штаммов имеется достаточно развитая система протеолитических ферментов, включающая ассоциированные с клеточной стенкой протеиназы prtP и prtB (SER, cell-envelope proteinase), транспортеры олиго-, три- и дипептидов (Opp, DtpT, Dpp) в клетку и внутриклеточные пептидазы (PepC, PepN, PepX, PepD, PepV, PepI, PepQ, PepR, PepP, PepE, PepO, PepF и PepS). При этом, несмотря на то, что внеклеточная протеолитическая система МКБ достаточно хорошо изучена [44–46], все еще остается ряд неразрешенных вопросов, касающихся транспорта аминокислот в клетку и из нее [47]. Также мало изучены регуляторные системы МКБ участвующие в поддержа-

нии баланса между количеством необходимых для роста клеток аминокислот, полученных путем их биосинтеза, и в результате поглощения из окружающей среды [48].

В настоящей работе проведено исследование профиля ЖК коровьего молока, ферментированного штаммами *L. paracasei* KF1, АВК, МА2 и МА3. На основе полученного профиля ЖК для сквашенного молока был рассчитан ряд показателей, связанных с поддержанием нормальной работы сердечно-сосудистой системы организма человека. Кроме того, было проведено исследование спектра ЛОС, образующихся в процессе ферментации коровьего молока исследуемыми штаммами *L. paracasei* и формирующих характерный вкус и аромат получаемого кисломолочного продукта. Сопоставление полученных данных с особенностями геномов каждого из штаммов позволило предположить основные биохимические реакции ответственные за образование ими ЛОС и 2-гидрокси-разветвленных ЖК. Таким образом, полученные результаты расширяют знания о биохимическом потенциале различных штаммов *L. paracasei*, что позволит в дальнейшем использовать их при производстве биологически активных пре- и пробиотических субстанций.

При проведении исследований использовалось оборудование Центра коллективного пользования “Промышленные биотехнологии” Федерального государственного учреждения “Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук”.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант РНФ 22-16-00108.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rozhkova I.V., Moiseenko K.V., Glazunova O.A., Begunova A.V., Fedorova T.V. // De Gruyter. 2020. P. 215–234.
<https://doi.org/10.1515/9783110667462-009>
2. Granato D., Barba F.J., Bursać Kovačević D., Lorenzo J.M., Cruz A.G., Putnik P. // Annu. Rev. Food Sci. Technol. 2020. V. 11. P. 93–118.
<https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051708>
3. Turkmen N., Akal C., Özer B. // J. Funct. Foods. 2019. V. 53. P. 62–75.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.12.004>
4. Gobetti M., Cagno R.D., De Angelis M. // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2010. V. 50. P. 716–727.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2010.499770>
5. Gänzle M.G. // Curr. Opin. Food Sci. 2015. V. 2. P. 106–117.
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.03.001>
6. Granato D., Branco G.F., Cruz A.G., Faria J. de A.F., Shah N.P. // Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 2010.

- V. 9. P. 455–470.
<https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00120.x>
7. Marshall V.M. // Int. J. Dairy Technol. 1993. V. 46. P. 49–56.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.1993.tb00860.x>
 8. Bintsis T. // AIMS Microbiol. 2018. V. 4. P. 665–684.
<https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.665>
 9. Marco M.L., Sanders M.E., Gänzle M., Arrieta M.C., Cotter P.D., De Vuyst L. et al. // Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2021. V. 18. P. 196–208.
<https://doi.org/10.1038/s41575-020-00390-5>
 10. Zoumpopoulou G., Pot B., Tsakalidou E., Papadimitriou K. // Int. Dairy J. 2017. V. 67. P. 46–60.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.09.010>
 11. Jones R.M. The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology. /Eds. M. Floch, Y. Ringel, W.A. Walker. Elsevier, 2017. P. 99–108.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804024-9.00009-4>
 12. Agarwala R., Barrett T., Beck J., Benson D.A., Bollin C., Bolton E., Bourexis D., Brister J.R., Bryant S.H., Canese K. et al. // Nucleic Acids Res. 2018. V. 46. P. D8–D13.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx1095>
 13. Moiseenko K.V., Begunova A.V., Savinova O.S., Glazunova O.A., Rozhkova I. V., Fedorova T.V. // Foods. 2023. V. 12. № 1. P. 223.
<https://doi.org/10.3390/foods12010223>
 14. Begunova A.V., Savinova O.S., Moiseenko K.V., Glazunova O.A., Rozhkova I. V., Fedorova T.V. // Appl. Biochem. Microbiol. 2021. V. 57. P. 458–467.
<https://doi.org/10.1134/S0003683821040037>
 15. Moiseenko K.V., Glazunova O.A., Savinova O.S., Ajibade B.O., Ijbadeniyi O.A., Fedorova T.V. // Foods. 2021. V. 10. P. 3082.
<https://doi.org/10.3390/foods10123082>
 16. Chen J., Liu H. // Int. J. Mol. Sci. 2020. V 21. P. 5695.
<https://doi.org/10.3390/ijms21165695>
 17. Garg N., Sethupathy A., Tuwani R., Rakhi N.K., Dokania S., Iyer A. et al. // Nucleic Acids Res. 2018. V. 46. P. D1210–D1216.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx957>
 18. Eren A.M., Kiefl E., Shaiber A., Veseli I., Miller S.E., Schechter M.S. et al. // Nat. Microbiol. 2020. V. 6. P. 3–6.
<https://doi.org/10.1038/s41564-020-00834-3>
 19. Delmont T.O., Eren A.M. // Peer J. 2018. V. 6. e4320.
<https://doi.org/10.7717/peerj.4320>
 20. Cantalapiedra C.P., Hernández-Plaza A., Letunic I., Bork P., Huerta-Cepas J. // Mol. Biol. Evol. 2021. V. 38. P. 5825–5829.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msab293>
 21. Kanehisa M., Sato Y. // Protein Sci. 2020. V. 29. P. 28–35.
<https://doi.org/10.1002/pro.3711>
 22. Holland R., Liu S.-Q., Crow V.L., Delabre M.-L., Lubbers M., Bennett M., Norris G. // Int. Dairy J. 2005. V. 15. P. 711–718.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.09.012>
 23. Butel M.-J., Rimbault A., Khelifa N., Champion G., Szylit O., Rocchiccioli F. // FEMS Microbiol. Letters. 1999. V. 132. P. 171–176.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07828.x>
 24. Bernard N., Johnsen K., Ferain T., Garmyn D., Hols P., Holbrook J.J., Delcour J. // Eur. J. Biochem. 1994. V. 224. P. 439–446.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.00439.x>
 25. Matelska D., Shabalin I.G., Jabłońska J., Domagalski M.J., Kutner J., Ginalski K., Minor W. // BMC Evolutionary Biology. 2018. V. 18. №199.
<https://doi.org/10.1186/s12862-018-1309-8>
 26. Daniel N., Nachbar R.T., Tran T.T.T., Ouellette A., Varin T.V., Corillard A. et al. // Nat Commun. 2022. V. 13. Art. № 1343.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-29005-0>
 27. Yao Y., Cai X., Fei W., Ye Y., Zhao M., Zheng C. // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2022. V. 62. P. 1–12.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1854675>
 28. Tan J., McKenzie C., Potamitis M., Thorburn A.N., Mackay C.R., Macia L. // Adv. Immunol. 2014. V. 121. P. 91–119.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800100-4.00003-9>
 29. Jensen R.G. // J. Dairy Sci. 2002. V. 85. P. 295–350.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74079-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74079-4)
 30. Shingfield K.J., Bonnet M., Scollan N.D. // Animal. 2013. V. 7. P. 132–162.
<https://doi.org/10.1017/S1751731112001681>
 31. Lindmark Mansson H. // Food Nutr. Res. 2008. V. 52. Article № 1821.
<https://doi.org/10.3402/fnr.v52i0.1821>
 32. Jensen R.G., Newburg D.S. / Handbook of Milk Composition. Academic Press, 1995. P. 543–575.
 33. Salamon R.V., Lóki K., Csapó-Kiss Z., Salamon S., Csapó J. // Acta Agric. Slov. 2012. V. 100. P. 323–326.
 34. Yilmaz-Ersan L.F. // Mljekarstvo. 2013. V. 63. P. 132–139.
 35. Ekinci F.Y., Okur O.D., Ertekin B., Guzel-Seydim Z. // Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2008. V. 110. P. 216–224.
<https://doi.org/10.1002/ejlt.200700038>
 36. Bao Z., Xiong J., Lin W., Ye J. // CyTA J. Food. 2016. V. 14. P. 10–17.
<https://doi.org/10.1080/19476337.2015.1035673>
 37. Ulbricht T.L.V., Southgate D.A.T. // Lancet. 1991. V. 338. P. 985–992.
[https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)91846-M](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)91846-M)
 38. Santos-Silva J., Bessa R.J., Santos-Silva F. // Livest. Prod. Sci. 2002. V. 77. P. 187–194.
[https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(02\)00059-3](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(02)00059-3)
 39. Hu Y., Zhang L., Wen R., Chen Q., Kong B. // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2022. V. 62. P. 2741–2755.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1858269>
 40. Thierry A., Pogačić T., Weber M., Lortal S. / Biotechnology of Lactic Acid Bacteria / Eds. F. Mozzi, R. R. Raya, G. M. Vignolo. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2015. P. 314–340.
<https://doi.org/10.1002/9781118868386>
 41. Kowalczyk M., Mayo B., Fernández M., Aleksandrzyk-Piekarczyk T. / Biotechnology of Lactic Acid Bacteria / Eds. F. Mozzi, R. R. Raya, G. M. Vignolo. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2015. P. 1–24.
<https://doi.org/10.1002/9781118868386>
 42. Salvador López J.M., Van Bogaert I.N.A. // Biotechnol. Bioeng. 2021. V. 118. P. 2184–2201.
<https://doi.org/10.1002/bit.27735>

43. Hill D., Sugrue I., Tobin C., Hill C., Stanton C., Ross R.P. // Front. Microbiol. 2018. V. 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02107>
44. Savijoki K., Ingmer H., Varmanen P. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 71. P. 394–406. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0427-1>
45. Raveschot C., Cudennec B., Coutte F., Flahaut C., Fremont M., Drider D., Dhulster P. // Front. Microbiol. 2018. V. 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02354>
46. Ji D., Ma J., Xu M., Agyei D. // Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 2021. V. 20. P. 369–400. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12676>
47. Zafar H., Saier M.H. // Genes (Basel). 2020. V. 11. № 10. 1234. <https://doi.org/10.3390/genes11101234>
48. Liu E., Zheng H., Hao P., Konno T., Yu Y., Kume H., Oda M., Ji Z.-S. // Curr. Microbiol. 2012. V. 65. P. 742–751. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0214-4>

Fatty Acid Profiles Change and the Volatile Organic Compounds Formation During the Cow's Milk Fermentation with Probiotic *Lactisibacillus paracasei* Strains

K. V. Moiseenko^a, A. V. Shabaev^a, O. A. Glazunova^a, O. S. Savinova^a, and T. V. Fedorova^a, *

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

**e-mail: fedorova_tv@mail.ru*

In this work, a comparative analysis of the profile of fatty acids (FA) and volatile organic compounds (VOCs) for skimmed cow's milk fermented by four different probiotic strains of *Lactisibacillus paracasei* (ABK, KF1, MA2 and MA3) was carried out. Analysis of FA and VOC profiles was performed using gas chromatography with mass spectrometric detection (GC-MS). For additional visualization of odor changes and its intensity in the fermented milk samples, the E-nose “electronic nose” odor analyzer was used. In total, presence of 42 different FA was detected in all samples, of which 17 were saturated, 8 monounsaturated, and 5 polyunsaturated. The strain-specific differences between the studied samples were of a complex nature and could not be explained only by the variation in the contribution of several individual FAs. The FA-nutritional indices, characterizing the nutritional and biological value of the samples, were different for milk fermented by different strains. Analysis of VOCs showed that the main odor-forming compounds in the studied samples were FAs and their reaction products, 2-heptanone, 2-nonanone, and 2-nonanol, formed as a result of the following chain of transformations: β -oxidation \rightarrow decarboxylation \rightarrow reduction. The aroma of *L. paracasei* fermentation products, predicted on the basis of the odors of individual VOCs, generally coincided with their organoleptic assessment – a flavor typical of fermented milk (yogurt, curdled milk) with floral and fruity notes.

Keywords: *Lactisibacillus paracasei*, cow's milk, fermentation, GC-MS, “electronic nose”, fatty acids, volatile organic compounds

УДК 577.27:579.64:632.4:632.93

МЕХАНИЗМЫ КОНТРОЛЯ *Pseudomonas fluorescens* КОРНЕВОЙ ГНИЛИ ЯЧМЕНЯ, ВЫЗЫВАЕМОЙ *Fusarium culmorum*

© 2023 г. В. Ю. Шахназарова^{1, 2}, Д. С. Сырова¹, М. И. Лебединский^{1, 2}, Н. А. Вишневская¹, А. И. Шапошников¹, Е. В. Бородина¹, О. К. Струнникова^{1, *}

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, 196608 Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

*e-mail: olgastrunnikova@rambler.ru

Поступила в редакцию 08.03.2023 г.

После доработки 21.04.2023 г.

Принята к публикации 28.04.2023 г.

В работе установлена причина снижения интенсивности фузариозной корневой гнили ячменя, вызываемой *Fusarium culmorum* 30 в присутствии ризобактерии *Pseudomonas fluorescens* 2137, которое не сопровождалось снижением количества ДНК патогена в корнях. В стерильном вермикулите в течение 11 сут изучали ответные реакции ячменя на колонизацию его корней грибом и бактерией *P. fluorescens* 2137 по интенсивности экспрессии генов *LOX*, *PAL*, *PR4* и *PR1*. Продукцию *F. culmorum* 30 трихотеценовых токсинов оценивали по уровню экспрессии гена *TRI13*. Показано, что *P. fluorescens* 2137 индуцировал экспрессию всех изученных защитных генов уже в суточных корнях ячменя, но только в присутствии *F. culmorum* 30. При этом уровень экспрессии гена *TRI13* не снижался, однако снижение количества больных растений позволило предположить, что *P. fluorescens* 2137 способен к детоксикации трихотеценовых токсинов, продуцируемых грибом, или к индукции этой способности в ячмене.

Ключевые слова: взаимоотношения растение-фитопатоген-антагонист, экспрессия защитных генов, трихотеценовые микотоксины

DOI: 10.31857/S0555109923050161, **EDN:** NSKTKD

Fusarium culmorum (W.G. Smith) Saccardo – факультативный гемибиотрофный патоген, вызывающий корневые и стеблевые гнили, а также фузариоз колоса зерновых культур [1–3]. При инфицировании растений *F. culmorum* продуцирует опасные для здоровья человека и животных трихотеценовые микотоксины, которые накапливаются в зерне [1, 2, 4].

Известно, что естественными антагонистами обитающих в почве фитопатогенных грибов являются ризосферные бактерии, так называемые, **PGPR** (plant growth promotion rhizobacteria), обладающие биоконтрольными свойствами [5–7]. В проведенных ранее экспериментах штамм *Pseudomonas fluorescens* (W. Migula) 2137 существенно подавлял рост *F. culmorum* 30 в почве без растений [8], а также и в ризосфере ячменя [9, 10]. Однако оценка колонизационной способности *F. culmorum* 30 и *P. fluorescens* 2137 и их взаимоотношений на корнях ячменя показала, что бактерия не препятствовала колонизации корней грибом [11]. Более того, количество микроколоний гриба на корнях ячменя в присутствии бактерии даже увеличивалось в

отдельные дни анализа, тогда как количество **КОЕ** *P. fluorescens* 2137 в присутствии гриба снижалось [10–12]. Однако, несмотря на существенные колебания численности бактерии в присутствии гриба, колонизация корней этим бактериальным штаммом всегда приводила к существенному снижению корневой гнили ячменя [9–11, 13].

Было сделано предположение, что биоконтрольный механизм *P. fluorescens* 2137 может быть связан со способностью данного штамма ризобактерии стимулировать защитные реакции в ячмене. Для проверки этого предположения мы оценили в эксперименте экспрессию четырех защитных генов *PAL*, *LOX*, *PR1* и *PR4* (*Wheatwin* 1–2) в ответ на колонизацию ячменя *F. culmorum* 30, *P. fluorescens* 2137 и совместно грибом и бактерией. Было установлено, что экспрессия этих генов возрастала при колонизации *F. culmorum* корней и оснований стеблей проростков мягкой пшеницы [14].

Ген *PAL* кодирует фенилаланин-аммоний-лиазу, ключевой фермент фенилпропаноидного пути, ведущего к синтезу фитоалексинов, фитоантиси-

пинов и образованию лигнина [15]. Этот фермент участвует также и в биосинтезе салициловой кислоты (СК), увеличение количества которой в растениях, пораженных патогеном, приводит к индукции генов (PR), связанных с патогенезом [16]. Ген *LOX* кодирует липоксигеназу, участвующую в синтезе предшественника жасмоновой кислоты (ЖК). Установлено, что устойчивость злаковых растений к болезням, вызываемых грибами рода *Fusarium*, обусловлена участием как СК, так и ЖК [17]. Считается, что СК в основном участвует в индукции устойчивости к биотрофным патогенам, тогда как ЖК – к некротрофным [18]. Известно, что сигнальные пути, опосредованные СК и ЖК, являются антагонистическими по отношению друг к другу [19].

При микроскопировании корней ячменя, колонизированных *F. culmorum* 30 и *P. fluorescens* 2137, было отмечено, что в присутствии бактерии зоны некроза в месте локализации колоний гриба наблюдались гораздо реже, чем в корнях без бактерии [11, 12]. Это позволило предположить, что биоконтрольный механизм *P. fluorescens* 2137 также может быть связан и со способностью данного штамма снижать продукцию *F. culmorum* 30 трихотеценовых токсинов. Известно, что основной трихотеценовый микотоксин дезоксиниваленол (ДОН) обеспечивает эффективную колонизацию *F. culmorum* зерновых культур [14, 20, 21]. Трихотецены участвуют в возникновении некроза инфицированных тканей при развитии фузариоза колоса зерновых и были идентифицированы как важные факторы агрессивности [22].

Цель работы – изучение ранних этапов взаимодействия *F. culmorum* 30 и *P. fluorescens* 2137 и ответных реакций ячменя на колонизацию его корней грибом и бактерией, а также механизма контроля фузариозной корневой гнили ячменя в присутствии ризобактерии *P. fluorescens* 2137.

МЕТОДИКА

Объекты исследования. *Fusarium culmorum* 30 был выделен из корней больного растения ячменя в Ленинградской области. Для приготовления инокулюма *F. culmorum* 30 выращивали на агаризованной среде Чапека в течение 14 сут. Макроконидии смывали стерильной водой, осаждали центрифугированием (4000 g, 10 мин, 4°C), ресуспендировали и доводили до нужной концентрации.

Штамм *Pseudomonas fluorescens* 2137 был получен из Вedomственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ВНИИСХМ, Россия). *P. fluorescens* 2137 выращивали в течение суток на мясо-пептонном агаре (МПА). Клетки суспендировали в стерильной дистиллированной воде, осаждали центри-

фугированием (8000 g, 10 мин) и вновь суспендировали.

Ячмень (*Hordeum vulgare* L.) сорта “Белогорский”, восприимчивый к фузариозной корневой гнили, был получен из коллекции Всероссийского института растениеводства им. Н.И. Вавилова (Россия).

Условия эксперимента. Семена ячменя стерилизовали за 2 сут до начала эксперимента. Для этого их выдерживали 30 с в 96% этаноле, трижды промывали стерильной водой и на 30 мин заливали 0.1%-ным раствором AgNO_3 . Затем семена однократно погружали в 1%-ный раствор NaCl , многократно промывали стерильной водой и для проращивания помещали на влажную фильтровальную бумагу в стерильные чашки Петри.

Эксперимент был проведен в стерильном вермикулите в течение 11 сут в трехкратной повторности. Вермикулит увлажняли питательным раствором, следующего состава (г/л воды): $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 1.18, KNO_3 – 0.5, KH_2PO_4 – 0.136, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.48. В раствор в одном случае вносили суспензию макроконидий гриба (1.7×10^5 /мл), в другом – суспензию клеток *P. fluorescens* 2137 (3×10^7 /мл), в третьем – суспензию клеток гриба и бактерии в тех же концентрациях. Вермикулит контрольных сосудов не инокулировали. Общее количество воды, включая суспензии клеток гриба и бактерии – 250 мл на каждые 100 г сухого вермикулита. Вермикулит тщательно перемешивали и переносили в пластиковые сосуды емкостью 1 л, в которые затем высевали проросшие стерильные семена ячменя. В течение опыта влажность вермикулита поддерживали на уровне 60% полной влагоемкости.

Растения для анализов отбирали на 1, 2, 3, 4 и 11 сут. КОЕ *P. fluorescens* 2137 определяли посевом суспензии гомогенизированных корней ячменя на МПА. Количество растений с симптомами корневой гнили оценивали на 11 сут.

Выделение ДНК *F. culmorum* 30 из корней ячменя. Корни ячменя, предназначенные для выделения ДНК, высушивали при комнатной температуре. Выделение суммарной ДНК проводили по методике, оптимизированной ранее и описанной в работе [23]. Сухие корни ячменя растирали в ступке до состояния муки. ДНК экстрагировали с использованием буфера на основе цетилтриметиламмоний бромидом (СТАВ). Измельченные корни ячменя встряхивали в буферном растворе с керамическими шариками в гомогенизаторе Precellys 24 (“Vertin Technologies”, Франция) в режиме 600 об./мин дважды по 20 с. Пробы инкубировали 10 мин при 42°C и затем 10 мин при 65°C для денатурации белка. Для окончательного освобождения от белков пробу дважды обрабатывали смесью хлороформа и изоамилового спирта (24 : 1), после чего осаждали изопропанолом, промывали

Таблица 1. Последовательность праймеров, используемых для определения количества ДНК *F. culmorum* и экспрессии генов в корнях ячменя, колонизированных *F. culmorum* 30 и *P. fluorescens* 2137 с помощью qRT-PCR

Гены или иные участки ДНК	Последовательность нуклеотидов (5'–3')	Источник
<i>LOX</i>	AACAAGTTTCGCCGTCACCTT TTGTCCGAGGGTGATGGTCTT	[14]
<i>PR1</i>	CAATAACCTCGGCCGTCTTCATCAC TTATTTACTCGCTCGGTCCCTCTG	[14]
<i>PAL</i>	GGTTCATGGCAACGAACACCTTGT AGGAGCTTGGAACGGAGTACTTGA	[14]
<i>PR4 (Wheatwin 1-2)</i>	CGAGGATCGTGGACCAGTG GTCGACGAACTGGTAGTTGACG	[14]
<i>GAPDH</i>	CCTTCCGTGTTCCCACTGTTG ATGCCCTTGAGGTTTCCCTC	[14]
<i>TRI13</i>	CATCATGAGACTTGTKCRGTTTGGG GCTAGATCGATTGTTGCATTGAG	[24]
β - <i>tubulin</i>	GCATTGGTACACTGGTGAGG CAGCTCCTCCTCGTACTCC	[14]
Специфичный для <i>F. culmorum</i> участок ДНК, ограниченный праймерами <i>OPT18-F2</i> <i>OPT18-R</i>	GCTGGAACCTGGCACCCGAAC GATGCCAGACGCACTAAGAT	[25–27]

70%-ным этанолом, растворяли в воде и хранили при температуре -20°C . Выделение ДНК из корней проводили в трех повторностях.

Определение количества ДНК *F. culmorum* 30 в суммарной ДНК проводили методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Использовалась готовая смесь реагентов qPCRmix-HS SYBR (“Евроген”, Россия) и видоспецифичные праймеры *OPT18-F2* и *OPT18-R* (табл. 1). Каждый вариант был проанализирован в пятикратной повторности. ПЦР-РВ проводили на приборе BIO-RAD CFX96™ Real-Time System C1000™ Thermal Cycler (“BioRad, Laboratories”, США).

Производство *F. culmorum* 30 трихотеценовых токсинов оценивали по экспрессии гена *TRI13*, кодирующего один из ферментов пути синтеза ниваленола и дезоксиниваленола [24].

Выделение РНК, получение комплементарной ДНК (кДНК) и количественная оценка экспрессии генов. Корни ячменя, предназначенные для выделения РНК, замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C . Выделение РНК проводили с помощью реактива PureZol по протоколу, предложенному производителем. На основе выделенной из корней РНК с помощью обратной транскриптазы M-MuLV (“СибЭнзим”, Россия) получали кДНК. В этой кДНК методом ПЦР-РВ определяли относительное количество копий генов *PR1*, *PR4*, *PAL*, *LOX*, *TRI13*. В качестве референсного гена для защитных генов ячменя использовали *GAPDH*, для гена *TRI13* – ген β -тубулина грибов. Последовательности используемых праймеров приведены в табл. 1. Для пригото-

вления ПЦР-смеси применяли готовую смесь реагентов qPCRmix-HS SYBR (“Евроген”, Россия). ПЦР-РВ проводили на приборе BIO-RAD CFX96™ Real-Time System C1000™ Thermal Cycler (“BioRad, Laboratories”, США). Режим работы амплификатора: 25 с при 94°C , 25 с при 62°C , 25 с при 72°C , 45 циклов.

Статистический анализ полученных результатов. Результаты представляли как среднее значение \pm стандартная ошибка. Стандартные ошибки средних представлены на диаграммах вертикальной линией. Парные t-тесты использовались для сравнения каждого из показателей для каждого момента времени. Разные буквы указывают на существенные различия ($p \leq 0.05$). Все статистические анализы были выполнены с использованием программы Statistica v. 10.0 (StatSoft Inc. 1984–2011).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимоотношения *F. culmorum* 30 и *P. fluorescens* 2137 в корнях ячменя. Как гриб, так и бактерия, внесенные в вермикулит при постановке опыта, были обнаружены уже в суточных корнях ячменя (рис. 1, 2). Количество гриба и бактерии в корнях при их отдельном внесении достигало максимальных значений к третьим суткам, затем количество ДНК гриба сохранялось примерно на том же уровне, тогда как количество КОЕ бактерий снижалось.

F. culmorum 30 и *P. fluorescens* 2137, совместно колонизирующие корни ячменя, оказывали вли-

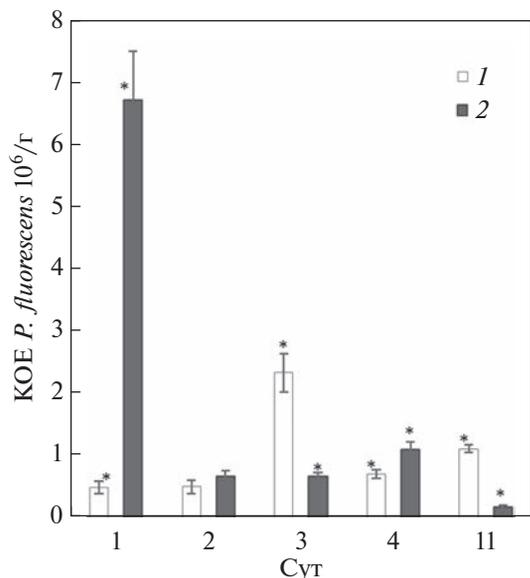


Рис. 1. Количество КОЕ *P. fluorescens* 2137 в корнях ячменя в динамике: 1 – в ячмене, колонизированном только *P. fluorescens* 2137, 2 – колонизированном *F. culmorum* 30 и *P. fluorescens* 2137. Достоверные различия обозначены звездочкой.

яние друг на друга (рис. 1, 2). В суточных корнях было отмечено увеличение количества ДНК гриба в присутствии бактерии и КОЕ бактерии в присутствии гриба. Увеличение количества *F. culmorum* 30 в корнях в присутствии *P. fluorescens* 2137 в начальные сроки колонизации наблюдалось и в ранее выполненных экспериментах [9–13]. Проведенная проверка показала, что корневые экссудаты ячменя, колонизированного *P. fluorescens* 2137, стимулировали рост *F. culmorum* 30 по сравнению с экссудатами контрольных растений [13]. Вероятно, и в этом эксперименте увеличение количества ДНК гриба в суточных корнях, колонизированных бактерией, наблюдалось из-за стимулирующего действия корневых экссудатов. Увеличение количества *P. fluorescens* 2137 в корнях в присутствии *F. culmorum* 30 в начальный период заселения микробами корней наблюдалось впервые. Возможно, этот эффект также мог быть связан с влиянием корневых экссудатов ячменя, колонизированного грибом.

Позднее, на 2 и 3 сут, было отмечено снижение количества ДНК гриба в присутствии бактерии, а на 3 и 11 сут, КОЕ бактерии в присутствии гриба (рис. 1, 2), что могло свидетельствовать о конкурентном характере взаимоотношений между грибом и бактерией. Конкурентные взаимоотношения между *F. culmorum* 30 и *P. fluorescens* 2137 на корнях ячменя были выявлены ранее неоднократно [9–12]. Было установлено также, что *F. culmorum* 30 и *P. fluorescens* 2137 имели сходные по-

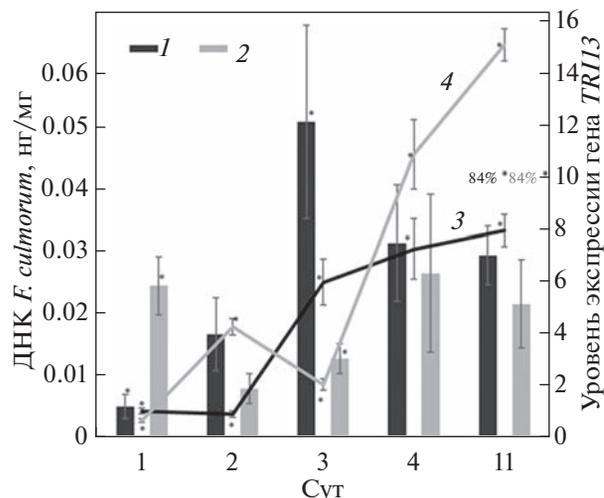


Рис. 2. Количество ДНК *F. culmorum* 30 (нг/мг) в корнях ячменя (1, 2) и относительный уровень экспрессии гена *TRI13* (3, 4) в динамике: 1, 3 – в ячмене, колонизированном только *F. culmorum* 30; 2, 4 – в ячмене, колонизированном *F. culmorum* 30 и *P. fluorescens* 2137. Над 11 сут указан процент растений ячменя с симптомами корневой гнили. Достоверные различия обозначены звездочкой.

требности, что указывало на возможность конкуренции между ними за питание [28].

К концу эксперимента колонизация корней только *F. culmorum* 30 приводила к появлению симптомов корневой гнили у 85% растений ячменя. В присутствии *P. fluorescens* 2137 количество больных растений снижалось до 15% (рис. 2).

Ответные реакции ячменя на колонизацию его корней *F. culmorum* 30 и *P. fluorescens* 2137. Ответные реакции ячменя на колонизацию его корневой фитопатогенным грибом и антагонистической бактерией различались. В ячмене, колонизированном *P. fluorescens* 2137, на более высоком уровне по сравнению с контролем экспрессировался только ген *LOX* на 4 сут (рис. 3а). В остальные дни присутствие *P. fluorescens* 2137 в корнях не приводило к увеличению экспрессии анализируемых защитных генов, в некоторых случаях уровень их экспрессии был даже ниже контрольных значений. Способность некоторых бактерий рода *Pseudomonas*, относящихся к PGPR, подавлять локальные иммунные реакции в корнях была установлена на модельном растении *Arabidopsis thaliana* в работах [29, 30]. Позднее было установлено, что полезные псевдомонады могут подавлять защитные реакции растений за счет снижения рН окружающей среды, что облегчало им колонизацию корней [31]. Возможно, в настоящем эксперименте мы наблюдали подобный феномен.

В ответ на колонизацию *F. culmorum* 30 в ячмене индуцировались на более высоком уровне только гены *LOX* и *PAL* (рис. 3а, 3б). Экспрессия

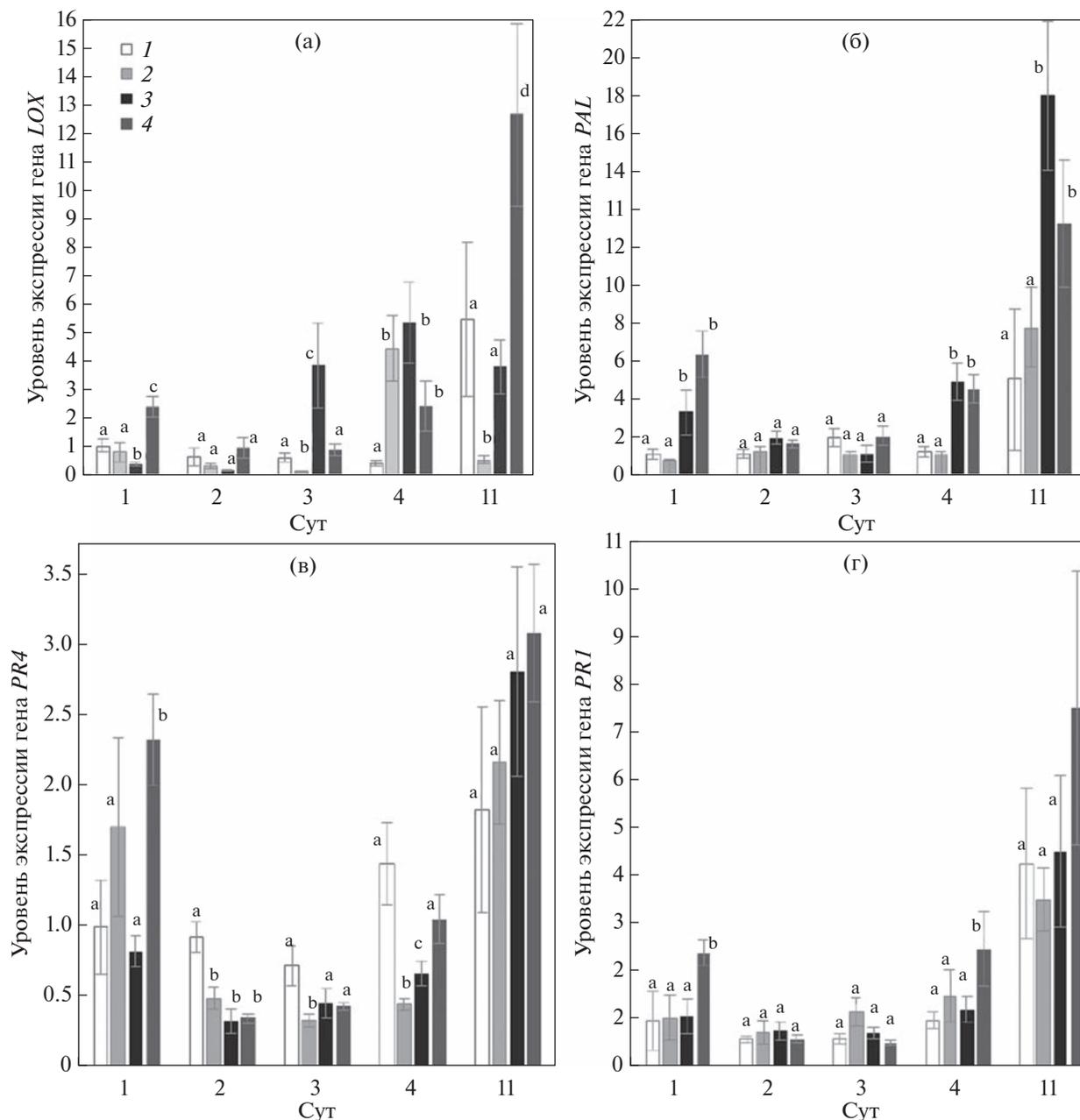


Рис. 3. Относительный уровень экспрессии генов *LOX* (а), *PAL* (б), *PR4* (в), *PRI* (г) в динамике: 1 – контрольный ячмень, 2 – колонизированный *P. fluorescens* 2137, 3 – колонизированный *F. culmorum* 30, 4 – *F. culmorum* 30 и *P. fluorescens* 2137 совместно. Достоверные, по сравнению с контролем, различия обозначены разными буквами.

гена *PAL* увеличивалась, по сравнению с контролем, на 1, 4 и 11 сут. Экспрессия гена *LOX* в корнях, колонизированных патогеном, на 1 сут была подавлена и на более высоком уровне индуцировалась только на 3 и 4 сут.

Наблюдаемое увеличение экспрессии гена *PAL*, как гена первичной защиты [32], на 1 сут не удивительно, так как в этот период гриб уже присутствовал в корнях и постепенно увеличивал свою биомассу (рис. 2). При этом на 1 сут уровень

экспрессии гена *TRI13* был низким (рис. 2). Видимо, в этот период *F. culmorum* 30 проявлял себя как биотрофный патоген. Здесь полученные результаты не совпадали с результатами других исследователей, которые показали, что при инфицировании *F. culmorum* колоса пшеницы уже через 6 ч после инокуляции происходило переключение между салицилатным и жасмонатным путями развития иммунитета, что соответствовало началу некротрофной стадии инфекции [33, 34]. В на-

стоящем эксперименте ген *LOX* индуцировался на более высоком уровне только на 3 сут. Тот факт, что к 4 сут на более высоком уровне индуцировались гены *LOX* и *PAL* свидетельствовало о том, что оба пути вовлечены в защитные реакции ячменя против *F. culmorum* 30.

Совместное присутствие *F. culmorum* 30 и *P. fluorescens* 2137 в корнях приводило к увеличению экспрессии всех исследуемых защитных генов уже на 1 сут, по сравнению с контрольными растениями (рис. 3а–3г). Одновременное увеличение экспрессии генов *PAL* и *LOX* подтверждало участие как салицилатного, так и жасмонатного путей в индукции устойчивости ячменя к фузариозной корневой гнили, вызываемой гембиотрофным патогеном *F. culmorum*. Полученные результаты совпадали с данными других исследователей, которые считают, что как салицилатный, так и жасмонатный пути необходимы для полной устойчивости растений против некротрофных и гембиотрофных патогенов [17, 18, 35]. Уровни экспрессии защитных генов в присутствии обоих микробов снижались на 2 и 3 сут. На 4 и 11 сут в корнях, колонизированных грибом и бактерией, экспрессия защитных генов *LOX*, *PAL*, а также *PR1* вновь возросла по сравнению с контролем (рис. 3а, 3б, 3г). Таким образом, усиление экспрессии защитных генов в корнях ячменя в присутствии *F. culmorum* 30 и *P. fluorescens* 2137 носило волнообразный характер.

Продукция трихотеценовых токсинов *F. culmorum* 30 и влияние *P. fluorescens* 2137 на этот процесс. В течение всего эксперимента гриб продуцировал трихотеценовые токсины, о чем свидетельствовала экспрессия гена *TRI13* (рис. 2). В корнях, колонизированных только грибом, увеличение количества его ДНК на 3 сут сопровождалось и постепенным увеличением интенсивности экспрессии гена *TRI13*. Присутствие бактерии оказывало значительное влияние не только на количество ДНК гриба в корнях, но и на уровень продуцируемых им трихотеценов. В присутствии бактерии зависимость между количеством ДНК гриба в корнях и уровнем продуцируемых им токсинов была скорее обратная, чем прямая (рис. 2). Подобная тенденция обратной зависимости отмечена между КОЕ бактерии в корнях в присутствии гриба (рис. 1) и уровнем экспрессии гена *TRI13* (рис. 2).

Рабочая гипотеза о способности *P. fluorescens* 2137 оказывать влияние на снижение продукции грибом трихотеценов не нашла подтверждения в этом эксперименте. Экспрессия гена *TRI13* в присутствии бактерии на 4 и 11 сут была выше, чем в контроле. Однако при этом количество больных растений снижалось. Этот факт позволил предположить, что *P. fluorescens* 2137 способен к детоксикации трихотеценовых токсинов, известных факторов агрессивности *F. culmorum*. Было

установлено, что обработка колосьев пшеницы и ячменя суспензией клеток двух штаммов *P. fluorescens* перед инфицированием *F. culmorum* приводила не только к снижению интенсивности фузариоза колоса, но и к снижению количества дезоксиниваленола в зерне [36]. Эти же исследователи позднее при оценке транскриптов, инициированных *P. fluorescens* МКВ158 в ответ на атаку ячменя *F. culmorum* во время развития фузариоза колоса, установили, что инициированные бактерией транскрипты связаны с различными функциями, включая детоксикацию и усиление защитных реакций хозяйского растения [37].

Отмеченный в эксперименте факт увеличения уровня продуцируемых *F. culmorum* 30 трихотеценовых токсинов в присутствии *P. fluorescens* 2137, может свидетельствовать: (1) об ответной реакции фитопатогенного гриба, направленной на подавление защитных реакций ячменя, которые были интенсивнее именно в присутствии бактерии; (2) не исключено также, что продуцируемые грибом трихотецены направлены на подавление самой бактерии либо на снижение ее антагонистического потенциала.

Очевидно, что для полного прояснения роли *P. fluorescens* 2137 в накоплении продуцируемых *F. culmorum* 30 трихотеценовых токсинов необходимы дальнейшие исследования с учетом количества этих вторичных метаболитов, продуцируемых грибом.

Таким образом, установлено, что биоконтрольный эффект *P. fluorescens* 2137 обусловлен способностью этого штамма активировать защитные реакции уже в суточных корнях ячменя, но только в присутствии *F. culmorum* 30.

В присутствии бактерии уровень экспрессии гена *TRI13* не снижался, однако уменьшение количества больных растений позволило предположить, что *P. fluorescens* 2137 способен к детоксикации трихотеценовых токсинов, продуцируемых грибом, или к индукции этой способности у растения.

Способность штамма *P. fluorescens* 2137 существенно снижать количество больных растений ячменя даже при увеличении агрессивности *F. culmorum* 30, о чем свидетельствовало увеличение количества продуцируемых грибом трихотеценовых токсинов, позволяет рассматривать данный штамм в качестве перспективного агента биоконтроля фузариозов зерновых культур.

Исследования проводились с использованием оборудования ЦКП “Геномные технологии, протеомика и клеточная биология” ФГБНУ ВНИИСХМ.

Работа по оценке экспрессии защитных генов ячменя в ответ на инфицирование *F. culmorum* 30 выполнена при финансовой поддержке Россий-

ского научного фонда в рамках проекта № 22-26-00341.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Wagacha J.M. and Muthomi J.W.* // Crop Prot. 2007. V. 26. P. 877–885.
2. *Covarelli L., Beccari G., Steed A., Nicholson P.* // Plant Pathol. 2012. V. 61. № 6. P. 121–1129. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02600.x>
3. *Scherm B., Balmas V., Spanu F., Pani G., Delogu G., Pasquali M., Migheli Q.* // Mol. Plant Pathol. 2013. V. 14. № 3. P. 323–341. <https://doi.org/10.1111/mpp.12011>
4. *Kammoun L.G., Gargouri S., Barreau C., Richard-Forget F., Hajlaoui M.R.* // Int. J. Food Microbiol. 2010. V. 140. № 1. P. 84–89.
5. *Raaijmakers J.M., de Bruijn I., de Kock M.J.D.* // Mol. Plant Microb. Interact. 2006. V. 19. № 7. P. 699–710.
6. *Weller D.M., Landa B.B., Mavrodi O.V., Schroeder L.K., De la Fuente L., Blouin Bankhead S. et al.* // Plant Biol. 2007. V. 9. № 1. P. 4–20.
7. *Lahlali R., Ezrari S., Radouane N., Kenfaoui J., Estmael Q., El Hamss H., Belabess Z., Barka E.A.* // Microorganisms. 2022. 10. № 3. 596–628. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030596>
8. *Струнникова О.К., Шахназарова В.Ю., Вишневецкая Н.А., Чеботарь В.К., Тихонович И.А.* // Микробиология. 2007. Т. 76. № 5. С. 675–681.
9. *Струнникова О.К., Шахназарова В.Ю., Вишневецкая Н.А., Чеботарь В.К., Тихонович И.А.* // Микология и фитопатология. 2008. Т. 42. № 1. С. 68–75.
10. *Strunnikova O.K., Vishnevskaya N.A., Ruchiy A.S., Shakhnazarova V.Y., Vorobyov N.I., Chebotar V.K.* // Plant Soil. 2015. V. 389. № 2. P. 131–144. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2351-y>
11. *Strunnikova O.K., Vishnevskaya N.A., Tikhonovich I.A.* // Microbiology. 2010. V. 79. № 8. P. 865–870.
12. *Струнникова О.К., Феоктистова А.С., Вишневецкая Н.А., Чеботарь В.К.* // Микология и фитопатология. 2011. Т. 45. № 4. С. 362–369.
13. *Vishnevskaya N., Shakhnazarova V., Shaposhnikov A., Strunnikova O.* // Plants. 2020. V. 9. № 3. P. 366–381. <https://doi.org/10.3390/plants9030366>
14. *G. Beccari, L. Covarelli, P. Nicholson.* // Plant Pathol. 2011. V. 60. № 6. P. 671–684. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02425.x>
15. *Dixon R.A., Achnine L., Kota P., Liu C.-J., Reddy M.S.S., Wang L.* // Mol. Plant Pathol. 2002. V. 3. № 5. P. 371–390. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2002.00131.x>
16. *Bari R., Jones J.D.G.* // Plant Mol. Biol. 2009. V. 69. № 4. P. 473–488.
17. *Ding L., Xu H., Yi H., Yang L., Kong Z., Zhang L., Xue S., Jia H., Ma Z.* // PLoS ONE. 2011. V. 6. № 4. e19008. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019008>
18. *Glazebrook J.* // Annu. Rev. Phytopathol. 2005. V. 43. № 2. P. 205–227.
19. *Li N., Han X., Feng D., Yuan D., Huang L.-J.* // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. № 3. P. 671–685.
20. *Hestbjerg H., Felding G., Elmholt S.* // Phytopathology. 2002. V. 150. № 6. P. 308–312.
21. *Scherm B., Orrù M., Balmas V., Spanu F., Azara E., Delogu G. et al.* // Mol. Plant Pathol. 2011. V. 12. № 7. P. 759–771.
22. *Maier F.J., Miedaner T., Hadelers B., Felk A., Salomon S., Lemmens M. et al.* // Mol. Plant Pathol. 2006. V. 7. № 6. P. 449–461.
23. *Шахназарова В.Ю., Феоктистова А.С., Чижевская Е.П., Вишневецкая Н.А., Струнникова О.К.* // Микология и фитопатология. 2012. Т.46. № 3. С. 287–292.
24. *Villafana R.T., Ramdass A.C., Rampersad S.N.* // Toxins. 2019. V. 11. № 1. P. 36–60. <https://doi.org/10.3390/toxins11010036>
25. *Schilling A.G., Moller E.M., Geiger H.H.* // Phytopathology. 1996. V. 86. № 5. P. 515–522.
26. *Brandfass C., Karlovsky P.* // Int. J. Mol. Sci. 2008. V. 9. № 11. P. 2306–2321. <https://doi.org/10.3390/ijms9112306>
27. *Леплянен И.В., Шахназарова В.Ю., Вишневецкая Н.А., Долгих Е.А., Струнникова О.К.* // Микология и фитопатология. 2017. Т. 51. № 4. С. 241–248.
28. *Шапошников А.И., Вишневецкая Н.А., Шахназарова В.Ю., Белимов А.А., Струнникова О.К.* // Микология и фитопатология. 2019. Т. 53. № 5. С. 301–308.
29. *Meziane H., Van der Sluis I., Van Loon L.C., Hofte M., Bakker P.A.H.M.* // Mol. Plant Pathol. 2005. V. 6. № 2. P. 177–185. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00276.x>
30. *Berendsen R.L., Van Verk M.C., Stringlis I.A., Zamioudis C., Tommassen J., Pieterse C.M.J., Bakker P.A.H.M.* // BMC Genomics. 2015. V. 16. P. 539–561.
31. *Yu K., Liu Y., Tichelaar R., Savant N., Lagendijk E., Van Kuijk S.J.L. et al.* // Curr. Biol. 2019. V. 29. № 22. P. 3913–3920. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.09.015>
32. *Yadav V., Wang Z., Wei C., Amo A., Ahmed B., Yang X., Zhang X.* // Pathogens. 2020. V. 9. № 4. P. 312–336. <https://doi.org/10.3390/pathogens9040312>
33. *Petti C., Reiber K., Ali S.S., Berney M., Doohan F.M.* // BMC Plant Biol. 2012. V. 12. P. 224–232. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-224>
34. *Motallebi P., Tonti S., Niknam V., Ebrahimzadeh H., Pisi A., Nipoti P., Hashemi M., Prodi A.* // Cereal Res. Commun. 2017. V. 45. № 2. P. 248–259. <https://doi.org/10.1556/0806.45.2017.008>
35. *Desmond O.J., Edgar C.I., Manners J.M., Maclean D.J., Schenk P.M., Kazan K.* Physiol. and Mol. Plant Pathol. 2006. V. 67. № 3–5. P. 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2005.12.007>
36. *Khan M.R., Doohan F.M.* // Biol. Control. 2009. V. 48. № 1. P. 42–47.
37. *Petti C., Khan M., Doohan F.* // Funct. Integr. Genomics. 2010. V. 10. № 4. P. 619–627. <https://doi.org/10.1007/s10142-010-0177-0>

Mechanisms of Control by *Pseudomonas fluorescens* of Barley Root Rot Caused by *Fusarium culmorum*

V. Yu. Shakhnazarova^{a, b}, D. S. Syrova^a, M. I. Lebedinskii^{a, b}, N. A. Vishnevskaya^a, A. I. Shaposhnikov^a,
E. V. Borodina^a, and O. K. Strunnikova^{a, *}

^a All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, 196608 Russia

^b Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, 199034 Russia

*e-mail: olgastrunnikova@rambler.ru

In this paper, we found out why in the presence of the rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens* 2137, the intensity of barley fusarium root rot caused by *Fusarium culmorum* 30 decreases, if there is no obvious decrease in the amount of fungus in the roots in the presence of the bacterium. It has been suggested that (1) the presence of rhizobacteria stimulates the defence reactions in barley, (2) rhizobacteria reduces the production of trichothecene toxins by *F. culmorum* 30, a known factor of aggressiveness of the fungus. The responses of barley to the colonization of its roots by fungus and bacteria were studied in sterile vermiculite for 11 days by the intensity of expression of the *LOX*, *PAL*, *PR4* and *PR1* genes. The production of *F. culmorum* 30 trichothecene toxins was evaluated by the expression level of the *TRI13* gene. As a result, it was found that *P. fluorescens* 2137 induced the expression of all studied defence genes already in diurnal barley roots, but only in the presence of *F. culmorum* 30. In the presence of the bacterium, the expression level of the *TRI13* gene did not decrease, however, a decrease in the number of diseased plants suggests that *P. fluorescens* 2137 is capable of detoxifying trichothecene toxins produced by the fungus or inducing this ability in barley.

Keywords: plant-phytopathogen-antagonist interactions, expression of defence genes, trichothecene mycotoxins

УДК 581.19;581.14;58.08

КОФЕЙНАЯ КИСЛОТА В РАЗЛИЧНЫХ ФОРМУЛЯЦИЯХ КАК РЕГУЛЯТОР РОСТОВЫХ ПРОЦЕССОВ И УСТОЙЧИВОСТИ МИКРОКЛОНОВ КАРТОФЕЛЯ В КУЛЬТУРЕ *in vitro*

© 2023 г. Н. А. Еловская¹, *, Ж. Н. Калацкая¹, Н. А. Ламан¹,
В. В. Николайчук², А. Н. Красковский², К. С. Гилевская²

¹ Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси, Минск, 220072 Республика Беларусь

² Институт химии новых материалов НАН Беларуси, Минск, 220141 Республика Беларусь

*e-mail: yalousskaya92@mail.ru

Поступила в редакцию 13.02.2023 г.

После доработки 03.04.2023 г.

Принята к публикации 29.04.2023 г.

Изучено влияние кофейной кислоты (**КК**), ее смеси с хитозаном (**Хит+КК**) и конъюгата с хитозаном (**Хит-КК**) на ростовые процессы и содержание пролина в микроклонах картофеля (*Solanum tuberosum* L.) в культуре *in vitro* в оптимальных условиях и в условиях продолжительного осмотического стресса, вызванного полиэтиленгликолем. Показано, что в оптимальных условиях конъюгат **Хит-КК** и в меньшей степени **КК**, действуя как стрессоры умеренной силы, ускоряли рост и развитие эксплантов картофеля и усиливали накопление пролина в стеблях. В условиях осмотического стресса **КК** и конъюгат **Хит-КК** способствовали повышению устойчивости микроклонов картофеля и поддержанию их активного роста, причем эффект сохранялся и в постстрессовый период. Впервые показано, что механическая смесь **Хит+КК** вызвала торможение роста и развития эксплантов и значительное накопление пролина, причем оказываемый ингибирующий эффект усугублялся в условиях стресса.

Ключевые слова: картофель (*Solanum tuberosum* L.), осмотический стресс, конъюгаты, хитозан, кофейная кислота, морфометрические показатели, пролин, *in vitro*

DOI: 10.31857/S055510923050045, **EDN:** LJQPLM

В связи с мировой тенденцией ужесточения экологических требований к продуктам и товарам сельского хозяйства при разработке новых регуляторов роста растений все больше внимания уделяют природным биологически активным веществам, например, фенилпропаноидам и полисахаридам. Представителями первой группы являются гидроксикоричные кислоты, играющие определенную роль в регуляции прорастания семян, роста и развития проростков, формирования устойчивости растений к действию стрессоров. Кофейная кислота (**КК**) является ранним промежуточным звеном метаболизма фенилпропаноидов и предшественником многих вторичных соединений, регулирующих защитные реакции растений [1], и в зависимости от концентрации может стимулировать или замедлять рост растений [2].

Потенциал применения **КК** существенно ограничивается ее низкой растворимостью в воде [3]. Одним из способов изменения биодоступности **КК** и перспективным методом разработки новых препаративных форм с заданными свойствами

является ее связывание с полимерной матрицей-носителем. Одним из перспективных биополимеров является хитозан, представляющий собой продукт реакции деацетилирования природного полимера — хитина, важнейшего компонента клеточной стенки грибов и экзоскелета артропод [4, 5].

Хитозан оказывает стимулирующее действие на многие физиологические процессы растений [4, 6–8] и способствует повышению их устойчивости к неблагоприятным факторам среды различной природы за счет активизации комплекса защитных реакций [9, 10].

Хитозан не токсичен для живых организмов [11], биосовместим [12], полностью разлагается хитиназами микроорганизмов [13, 14], а многочисленные amino- и гидроксильные группы в его полимерной цепи обеспечивают широкие возможности для получения химически модифицированных производных, обладающих рядом новых свойств.

В настоящее время активно ведется синтез и исследование свойств соединений на основе хитозана

и фенольных соединений (например, феруловой, галловой и кофейной кислот). В работах [15, 16] производные хитозана с оксикоричными кислотами демонстрировали усиление антиоксидантной (АО) активности по сравнению с немодифицированным хитозаном, стимулировали накопление внутриклеточных антиоксидантных ферментов и проявляли антимикробную активность. Ковалентное связывание низкомолекулярных фенольных соединений с полимерной цепью хитозана обеспечивает повышение стабильности антиоксиданта, улучшение биодоступности и усиление его биологической активности [13].

Несмотря на большое количество работ, посвященных исследованию биологической активности химически модифицированного хитозана, данные о способности таких производных стимулировать процессы роста и развития растений немногочисленны. Так, обработка семян огурца [17] и пшеницы [18] увеличивала всхожесть, усиливала ростовую активность и способствовала снижению интенсивности окислительных процессов, а обработка семян редиса повышала содержание витамина С и снижала количество нитратов в корнеплодах [19].

Цель работы — исследование влияния конъюгата на основе хитозана и кофейной кислоты на ростовые процессы и содержание пролина в микроклонах картофеля в культуре *in vitro* в оптимальных условиях и в условиях осмотического стресса.

МЕТОДИКА

Объект исследования — растения-регенеранты картофеля (*Solanum tuberosum* L.) среднераннего сорта Бриз из коллекции Научно-практического центра Национальной академии наук Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству.

Оздоровленные методом апикальных меристем материнские растения клонировали в стерильных условиях ламинар-бокса “Белаквилон” (Беларусь) на питательную среду Мурасиге—Скуга (МС-среда). Полученные в результате клонального микроразмножения микрочеренки выращивали в течение 4 нед. при температуре 23–25°C в условиях искусственного освещения интенсивностью 3 тыс. люкс и при 16-часовом фотопериоде, после чего проводили измерение морфометрических параметров и замену МС-среды на модифицированные, содержащие конъюгат хитозан-кофейная кислота (Хит-КК, 0.025 мг/мл), отдельные соединения (хитозан, 0.025 мг/мл, КК, 0.025 мг/мл) и механическую смесь хитозана и КК (Хит + КК) в соотношении 1 : 1 с обязательной регулировкой pH ~ 5.7.

На модифицированных МС-средах микроклоны выращивали в течение 2 нед., после чего про-

водили повторное измерение морфометрических параметров. Часть микроклонов использовали для определения содержания пролина в стеблях, у оставшихся — проводили замену модифицированных МС-сред на стандартную. На 7 сут измеряли морфометрические параметры микроклонов и определяли содержание пролина в стеблях.

Конъюгат хитозана с КК получали карбодиймидным методом по методике, описанной в работе [17]. Для синтеза конъюгатов использовали хитозан с молекулярной массой (ММ) ~30 кДа, степенью деацетилирования 98.3% и степенью полимеризации ~186 (“Glentham Life Sciences”, Великобритания), КК (ММ = 180.16 г/моль, “Sigma-Aldrich”, США) и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиймид гидрохлорид (EDC, “Sigma-Aldrich”). Синтез конъюгата проводили при соотношении Хит : КК = 5 : 1 по массе, EDC брали в трехкратном мольном избытке по отношению к КК. Содержание КК в синтезированном конъюгате определяли спектрофотометрически, для чего снимали спектр поглощения конъюгата в области 200–400 нм и рассчитывали содержание КК по предварительно построенному калибровочному графику. Степень пришивки кофейной кислоты к хитозану составила $5.0 \pm 0.6\%$ или 53.8 ± 7.2 мкг/мг хитозана. Исследования молекулярной массы хитозана после введения КК не проводилось.

Осмотический стресс создавали добавлением в МС-среду высокомолекулярного полиэтиленгликоля (ПЭГ) с ММ ~ 6000 в концентрации 5%.

Содержание пролина определяли согласно методу, описанному в работе [20]. Навеску растительного материала (50 мг) растирали в 3%-ной сульфосалициловой кислоте и центрифугировали в течение 20 мин при 12000 г. К аликвоте супернатанта приливали ледяную уксусную кислоту и реактив на основе нингидрина в соотношении 1 : 1 : 1, нагревали в течение 60 мин при 90°C в термощейкере при постоянном перемешивании (300 об./мин). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре “Jasko V-630” (“Jasko”, Япония) при длине волны 515 нм.

Длину стебля и корней измеряли с помощью линейки, массу — взвешиванием на аналитических весах. Относительную скорость роста рассчитывали по формуле: $v_{\text{рост}} = (a_2 - a_1)/a_1 \times 100\%$, где $v_{\text{рост}}$ — относительная скорость роста, %; a_1 — длина при первом измерении, см; a_2 — длина при втором измерении, см.

Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи программы Statistics 22. Для определения характера распределения использовали критерий Колмогорова—Смирнова. Оценку различий между группами выполняли при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим проведением

Таблица 1. Морфометрические показатели микроклонов картофеля, культивируемых на МС-средах с добавлением соединений хитозана и КК, и последующей их замене на стандартную МС-среду

Показатель		Вариант					НСР _{0.05}
		контроль	хитозан	КК	Хит + КК	Хит-КК	
Модифицированные МС-среды	Длина стебля, см	11.5 ± 0.15 ^a	9.8 ± 0.22 ^b	11.6 ± 0.13 ^a	10.8 ± 0.14 ^c	14.2 ± 0.20 ^d	0.26
	Число междоузлий, шт.	10.1 ± 0.12 ^a	9.5 ± 0.12 ^b	9.9 ± 0.12 ^a	10.3 ± 0.12 ^a	12.4 ± 0.20 ^c	0.20
	Сырая масса стебля, мг	116.1 ± 0.17 ^a	114.7 ± 0.76 ^b	124.7 ± 0.53 ^c	96.0 ± 0.56 ^d	151.9 ± 0.71 ^e	0.86
	Сухая масса стебля, мг	14.7 ± 0.02 ^a	12.9 ± 0.09 ^b	13.1 ± 0.06 ^c	11.6 ± 0.07 ^d	15.3 ± 0.07 ^c	0.16
	Длина корней, см	2.9 ± 0.09 ^a	2.6 ± 0.10 ^b	3.2 ± 0.05 ^c	3.0 ± 0.12 ^{ac}	3.9 ± 0.12 ^d	0.17
	Число корней, шт.	13.2 ± 0.20 ^a	10.3 ± 0.12 ^b	14.1 ± 0.12 ^c	11.7 ± 0.12 ^d	15.7 ± 0.12 ^e	0.20
	Сырая масса корней, мг	24.5 ± 0.59 ^a	30.5 ± 0.79 ^b	36.4 ± 0.65 ^c	34.3 ± 0.60 ^d	62.8 ± 0.43 ^e	0.90
	Сухая масса корней, мг	2.5 ± 0.06 ^a	3.0 ± 0.08 ^b	3.2 ± 0.06 ^c	3.7 ± 0.07 ^d	5.5 ± 0.04 ^e	0.08
Стандартная МС-среда	Длина стебля, см	12.5 ± 0.19 ^a	10.0 ± 0.12 ^b	13.4 ± 0.24 ^c	11.2 ± 0.25 ^d	15.0 ± 0.29 ^e	0.32
	Число междоузлий, шт.	11.0 ± 0.20 ^a	10.3 ± 0.12 ^b	11.7 ± 0.23 ^c	10.5 ± 0.12 ^b	13.6 ± 0.20 ^d	0.27
	Сырая масса стебля, мг	175.3 ± 0.64 ^a	118.7 ± 0.65 ^b	166.1 ± 0.38 ^c	118.3 ± 0.50 ^b	201.1 ± 0.99 ^d	0.96
	Сухая масса стебля, мг	13.5 ± 0.05 ^a	11.5 ± 0.06 ^b	13.4 ± 0.03 ^a	10.8 ± 0.05 ^c	16.2 ± 0.08 ^d	0.08
	Длина корней, см	3.6 ± 0.06 ^a	2.7 ± 0.14 ^c	3.4 ± 0.17 ^{ab}	3.2 ± 0.12 ^b	4.0 ± 0.12 ^d	0.20
	Число корней, шт.	16.3 ± 0.12 ^a	10.4 ± 0.20 ^b	14.4 ± 0.20 ^c	11.8 ± 0.20 ^d	16.6 ± 0.20 ^a	0.28
	Сырая масса корней, мг	65.0 ± 0.83 ^a	37.3 ± 0.30 ^b	43.6 ± 0.87 ^c	43.6 ± 0.73 ^c	73.6 ± 0.47 ^d	1.03
	Сухая масса корней, мг	5.7 ± 0.07 ^a	3.4 ± 0.03 ^b	4.1 ± 0.08 ^c	3.2 ± 0.05 ^d	6.9 ± 0.04 ^e	0.09

Примечание. Разные буквы латинского алфавита (a, b, c, d) обозначают наличие достоверной разницы между вариантами.

апостериорного теста (НСР – наименьшая значимая разность). Результаты представлены в виде $M \pm Sd$ (где M – это среднее арифметическое значение, Sd – стандартное отклонение) 3 биологических повторностей. В качестве критического уровня значимости использовали $p < 0.05$. Разные буквы латинского алфавита (a, b, c, d) использовали для обозначения достоверной разницы между вариантами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для пересадки на модифицированные МС-среды проводили отбор микроклонов со стандартными параметрами: длина стебля (8.6 ± 0.07 см), длина корней (2.3 ± 0.07 см), число междоузлий (8.2 ± 0.07 шт.), число корней (10.3 ± 0.07 шт.).

Стабильное развитие растений в культуре *in vitro* характеризовалось такими показателями, как высота стебля микроклонов и число сформированных метамеров (междоузлий). Микроклоны картофеля, культивируемые в течение 2 нед. на модифицированной МС-среде с Хит-КК, характеризовались активным ростом и накоплением биомассы по сравнению с контролем и другими опытными вариантами. Положительный эффект конъюгата Хит-КК выявлен и после замены МС-среды на стандартную – все исследуемые морфометрические

параметры были выше контрольных значений, что могло свидетельствовать о пролонгированном действии конъюгата.

Внесение в МС-среду КК усиливало рост корней, способствовало формированию их большего количества и накоплению биомассы по сравнению с контролем, однако, оказанный эффект, был слабее, чем конъюгата Хит-КК. После недельного выращивания на стандартной МС-среде длина стебля и число междоузлий микроклонов (вариант КК) превышали контрольные значения на 7.2 и 6.4% соответственно, но наблюдалось замедление накопления биомассы и дальнейший рост корневой системы относительно контроля (табл. 1).

Хитозан негативно воздействовал на развитие микроклонов картофеля, о чем свидетельствовало снижение по сравнению с контролем всех исследуемых параметров роста. При этом механическая смесь хитозана и кофейной кислоты оказывала неоднозначное действие, замедляя рост стебля, но усиливая рост и накопление биомассы корней микроклонов. Результаты, полученные после замены модифицированных МС-сред на стандартную, показали, что микроклоны из вариантов Хитозан и Хит + КК характеризовались замедленным ростом по сравнению с и с контролем и опытными вариантами (табл. 1).

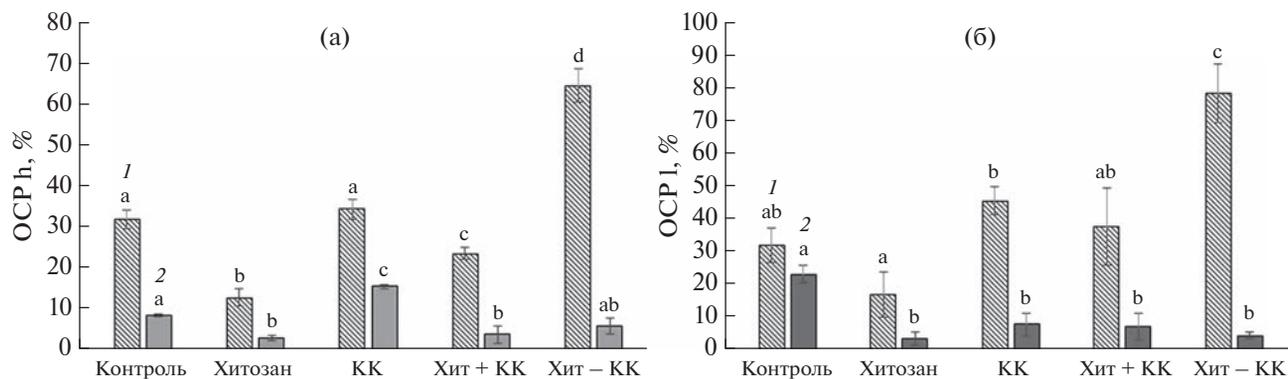


Рис. 1. Относительная скорость роста стебля ((а), $OSР_h$) и – относительная скорость роста корневой системы микроклонов ((б), $OSР_r$) в течение 2-недельного выращивания на модифицированных МС-средах (1) и недельного выращивания на стандартной МС-среде (2).

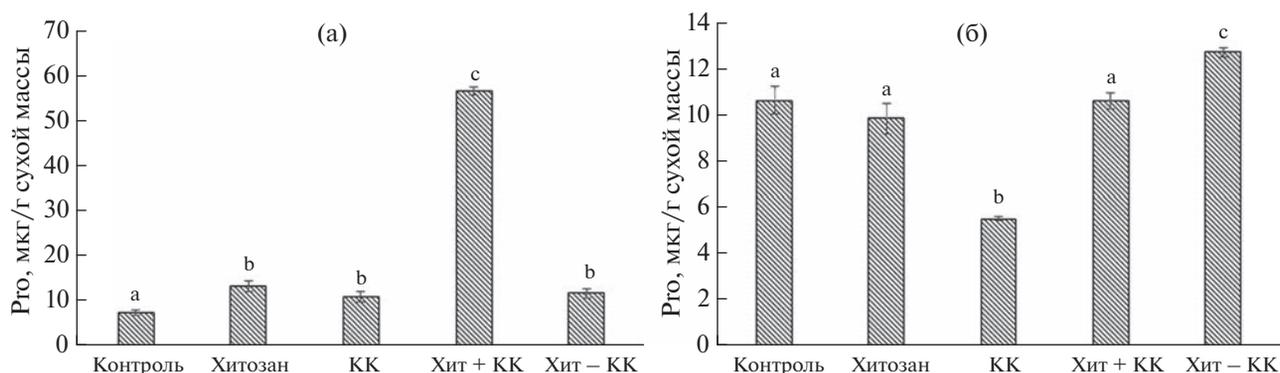


Рис. 2. Содержание пролина (Pro) в стеблях микроклонов картофеля после 2-недельного выращивания на модифицированных МС-средах (а) и недельного выдерживания на стандартной МС-среде (б).

Для понимания характера воздействия добавок, КК на развитие микроклональных растений принимали во внимание не только абсолютные, но и относительные значения величин. Относительная скорость роста ($OSР$) характеризовала изменение выбранного параметра (например, высоты стебля, длины корневой системы, биомассы) за определенный промежуток времени (в классическом представлении – прирост на единицу биомассы). Относительная скорость линейного роста стебля микроклонов ($OSР_h$) после 2-недельного выращивания на модифицированных МС-средах увеличивалась в 2 раза под влиянием Хит-КК (рис. 1а). Расчет относительной скорости роста корневой системы микроклонов ($OSР_r$) показал увеличение в 1.4 и 1.2 раза по сравнению с контролем под действием КК и Хит-КК соответственно (рис. 1б).

Содержание пролина в стеблях микроклонов после 2-недельного выращивания на модифицированных МС-средах повышалось во всех опытных вариантах по отношению к контролю, наи-

более значительно 1.8 раза под воздействием смеси Хит + КК (рис. 2а).

Индукция синтеза пролина может происходить не только при действии на растение абиотических стрессоров, но и, так называемых сигнальных посредников [21], например, при обработке растений салициловой кислотой [22], брассиностероидами [23], хитозаном [24]. Выявленное в данном исследовании увеличение содержания пролина в стеблях микроклонов картофеля опытных вариантов, вероятно, связано как с элиситорной природой хитозана, так и с действием КК, оказывающей неоднозначное действие на содержание пролина [25].

После замены модифицированных МС-сред и недельного выдерживания микроклонов на стандартной МС-среде относительная скорость роста в вариантах хитозан и Хит + КК оставалась ниже, чем у контрольных растений, а содержание пролина в стеблях микроклонов картофеля этих вариантов снижалось до уровня контрольных значений (рис. 2б). В то же время в варианте КК активный рост микрорастений сохранялся и в 1.8

раза превышал скорость роста растений в контроле, при этом выявлено самое низкое содержание пролина по сравнению с другими исследуемыми вариантами. В варианте Хит-КК при пересадке и выращивании на стандартной среде микроклубеньки оставались самыми крупными, с хорошо развитой корневой системой, но активность роста микроклубеньков резко снижалась по сравнению с их ростом на модифицированной среде. Показатель $ОСР_h$ оставался на уровне контрольных значений (рис. 1а), а скорость роста корней значительно уменьшалась (рис. 1б). В этом варианте содержание пролина незначительно повысилось после переноса на стандартную среду культивирования. Вероятно, резкое ингибирование роста и вызвало увеличение его содержания как по отношению к значениям, регистрируемым на модифицированной МС-среде, так и ко всем вариантам на стандартной среде (рис. 2б). Относительная скорость роста корневой системы микроклубеньков картофеля также уменьшилась и в других опытных вариантах (рис. 1б). Вероятно, исследуемые добавки оказывали ингибирующее воздействие различной силы на рост и развитие микроклубеньков картофеля. При этом хитозан, а особенно механическая смесь хитозана с КК, проявляли синергетическое действие, вызывая замедление роста и развития, сопровождающееся значительным накоплением пролина. В варианте Хит + КК оно возрастало практически в 6 раз по сравнению с контролем. Ингибирование роста и развития микроклубеньков продолжалось и при замене на стандартную среду, что, вероятно, связано с тем, что хитозан расщеплялся ферментами растений до более мелких фрагментов, обладающих большей проникающей способностью, обеспечивая длительный эффект [26]. Однако отсутствие в среде культивирования соединений, вызывающих замедление роста, способствовало снижению содержания пролина до уровня значений контрольных растений на стандартной среде.

КК и конъюгат Хит-КК, добавленные в среду для культивирования микроклубеньков ускоряли рост и развитие растений, повышая содержания пролина в его тканях на 57.6 и 45.9% относительно контроля. Высокая относительная скорость роста при пересадке на стандартную среду сохранялась также у растений, культивируемых на среде с КК, причем при активном росте содержание пролина снижалось как по отношению к показателям, полученным на модифицированной среде, так и ниже значений в контроле на стандартной среде. При замене модифицированной среды с конъюгатом КК-Хит, на стандартную среду скорость роста микроклубеньков существенно замедлялась до значений у контрольных растений, что вызывало, вероятно, повышение содержания пролина.

При замедлении скорости роста растений содержание пролина в тканях существенно увеличивалось, а при активации роста растений и

эффекте стимуляции в отсутствие активатора, напротив, увеличение его содержания не было столь значительно или могло оставаться на уровне контрольных значений или снижаться.

Известно, что развитие устойчивости растительного организма повышает также и резистентность к сопутствующему повреждающему стрессору (кросс-адаптация), в основе которой лежит функционирование механизмов регуляции водного и окислительного статуса организма.

В связи с этим проведено исследование влияния добавок КК и хитозана на рост и развитие микроклубеньков в условиях абиотического стресса.

После продолжительного осмотического стресса, вызванного действием 5%-ного высокомолекулярного ПЭГ, выявлено замедление развития микроклубеньков картофеля всех опытных вариантов по сравнению с оптимальным контролем без ПЭГ (табл. 2).

Добавленные в МС-среду хитозан и Хит + КК усиливали негативное воздействие ПЭГ на рост и развитие микроклубеньков, о чем свидетельствовало замедление роста побегов и практически полная остановка роста корневой системы как по отношению к оптимальному контролю, так и по отношению к стрессовому контролю (ПЭГ). КК и Хит-КК, в свою очередь, способствовали снижению негативного действия осмотического стресса и повышали устойчивость микроклубеньков, причем эффект наблюдался и после прекращения действия стресс-фактора (табл. 2).

В условиях осмотического стресса относительная скорость линейного роста стеблей микроклубеньков ($ОСР_h$) снижалась во всех опытных вариантах по отношению к оптимальному контролю, однако КК и Хит-КК способствовали поддержанию процессов роста по отношению к стрессовому контролю (рис. 3а).

Рост корневой системы микроклубеньков прекращался при включении в среду культивирования ПЭГ, а также – при совместном действии ПЭГ и хитозана (ПЭГ/Хитозан), в то время как добавленные КК и Хит-КК способствовали усилению скорости роста корневой системы даже по сравнению с оптимальным-контролем (рис. 3б).

После прекращения действия стресс-фактора и переноса микроклубеньков на стандартную среду культивирования относительная скорость роста оставалась низкой в варианте опыта с хитозаном. Активный рост побегов микроклубеньков был отмечен в варианте Хит-КК: по относительной скорости роста растения в этом варианте опыта превосходили микроклубеньки из оптимального контроля. В остальных вариантах скорость роста микроклубеньков достигла уровня значений стрессового контроля.

Рост корневой системы микроклубеньков в репарационный период в вариантах с применением

Таблица 2. Морфометрические показатели микроклонов картофеля, культивируемых в условиях осмотического стресса на модифицированных МС-средах с добавлением соединений хитозана и КК

Показатель	Вариант								НСР _{5%}
	контроль	ПЭГ	ПЭГ/Хитозан	ПЭГ/КК	ПЭГ/Хит + КК	ПЭГ/Хит-КК			
Осмотический стресс	Длина стебля, см	11.5 ± 0.15 ^a	9.1 ± 0.21 ^b	9.0 ± 0.16 ^b	10.1 ± 0.11 ^c	9.0 ± 0.28 ^b	11.1 ± 0.04 ^d		0.34
	Число междоузлий, шт.	10.1 ± 0.12 ^a	9.0 ± 0.20 ^b	8.1 ± 0.12 ^c	9.9 ± 0.12 ^a	8.4 ± 0.20 ^d	9.9 ± 0.12 ^a		0.26
	Сырая масса стебля, мг	116.1 ± 0.17 ^a	76.5 ± 0.45 ^b	61.9 ± 0.52 ^c	84.8 ± 0.73 ^d	62.1 ± 0.49 ^c	82.8 ± 0.14 ^e		0.84
	Сухая масса стебля, мг	14.7 ± 0.02 ^a	9.4 ± 0.06 ^b	8.5 ± 0.07 ^c	12.5 ± 0.11 ^d	8.5 ± 0.07 ^c	10.3 ± 0.02 ^e		0.11
	Длина корней, см	2.9 ± 0.09 ^a	2.3 ± 0.16 ^b	2.3 ± 0.24 ^b	3.6 ± 0.11 ^c	2.5 ± 0.05 ^b	3.3 ± 0.10 ^d		0.24
	Число корней, шт.	13.2 ± 0.20 ^a	10.3 ± 0.12 ^b	10.3 ± 0.12 ^b	11.1 ± 0.12 ^c	10.5 ± 0.12 ^b	12.9 ± 0.12 ^d		0.24
	Сырая масса корней, мг	24.5 ± 0.59 ^a	22.3 ± 0.60 ^b	18.6 ± 0.84 ^c	27.4 ± 0.49 ^d	23.1 ± 0.65 ^b	50.9 ± 0.37 ^e		1.05
	Сухая масса корней, мг	2.5 ± 0.06 ^a	3.0 ± 0.08 ^b	2.5 ± 0.11 ^a	4.3 ± 0.08 ^c	3.4 ± 0.10 ^d	6.1 ± 0.04 ^e		0.16
	Длина стебля, см	12.5 ± 0.19 ^a	9.8 ± 0.12 ^b	9.2 ± 0.18 ^c	11.2 ± 0.16 ^d	9.7 ± 0.09 ^b	13.7 ± 0.21 ^e		0.29
	Число междоузлий, шт.	11.0 ± 0.20 ^a	10.0 ± 0.20 ^b	9.3 ± 0.12 ^c	11.2 ± 0.20 ^a	8.9 ± 0.12 ^d	12.2 ± 0.20 ^e		0.31
Репарационный период	Сырая масса стебля, мг	175.3 ± 0.64 ^a	119.7 ± 0.56 ^b	99.9 ± 0.49 ^c	97.4 ± 0.52 ^d	91.7 ± 0.43 ^e	124.6 ± 0.31 ^f		0.91
	Сухая масса стебля, мг	13.5 ± 0.05 ^a	13.5 ± 0.06 ^a	11.0 ± 0.05 ^b	11.2 ± 0.06 ^c	10.2 ± 0.05 ^d	15.6 ± 0.04 ^e		0.10
	Длина корней, см	3.6 ± 0.06 ^a	2.3 ± 0.16 ^b	2.3 ± 0.24 ^b	3.7 ± 0.17 ^a	2.7 ± 0.22 ^c	3.5 ± 0.12 ^a		0.30
	Число корней, шт.	16.3 ± 0.12 ^a	10.3 ± 0.12 ^b	10.3 ± 0.12 ^b	12.6 ± 0.20 ^c	10.5 ± 0.12 ^b	14.7 ± 0.23 ^d		0.28
	Сырая масса корней, мг	65.0 ± 0.83 ^a	32.6 ± 0.88 ^b	31.2 ± 0.87 ^b	39.2 ± 5.56 ^c	43.8 ± 3.15 ^c	63.8 ± 0.81 ^a		4.82
	Сухая масса корней, мг	5.7 ± 0.07 ^a	3.3 ± 0.09 ^b	3.6 ± 0.10 ^{bc}	4.1 ± 0.58 ^c	3.6 ± 0.26 ^b	5.8 ± 0.07 ^a		0.49

Примечание. Разные буквы латинского алфавита (a, b, c, d) обозначают наличие достоверной разницы между вариантами.

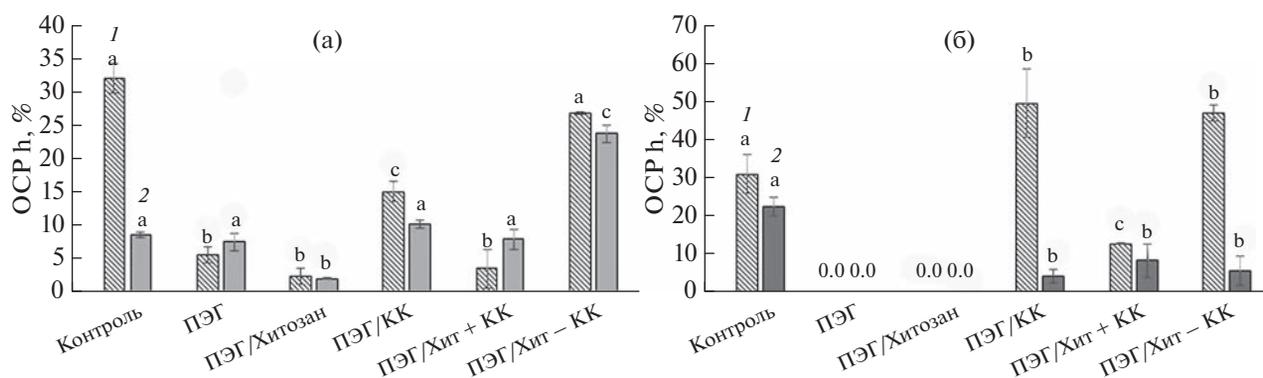


Рис. 3. Относительная скорость роста стебля ((а), OCP_h) и относительная скорость роста их корневой системы ((б), OCP_h) микроклонов картофеля в течение 2-недельного выращивания на модифицированных МС-средах в условиях стресса (1) и в репарационный период (2).

ПЭГ и ПЭГ/Хит не восстанавливался, OCP_h в вариантах КК и Хит-КК значительно замедлялась, а в варианте Хит + КК не изменялась по сравнению со стрессовым периодом, вызванным ПЭГ (рис. 3б).

Одним из надежных биометрических показателей, характеризующим не только онтогенетическое развитие растительного организма, но и уровень его реакции на действие факторов окружающей среды, является отношение длины корней к длине стебля. В условиях осмотического стресса добавленные в среду культивирования КК и конъюгат Хит-КК способствовали увеличению этого показателя как по сравнению с оптимальным, так и стрессовым (с ПЭГ) контролями (рис. 4).

В репарационный период наблюдалось замедление ростовых процессов микроклонов, что приводило к стабилизации исследуемого отношения: не было выявлено достоверных различий опытных вариантов по сравнению с оптимальным и стрессовым (ПЭГ) контролями (рис. 4).

Увеличение отношения длины корней к длине стебля можно рассматривать в качестве типичной реакции проявления устойчивости растений к дефициту влаги и развивающемуся, в связи с этим, осмотическому стрессу, что свидетельствовало о повышении водопоглощающей способности растений [27].

В условиях стресса, вызванного добавлением ПЭГ в среду, содержание пролина увеличивалось во всех опытных вариантах по отношению к оптимальному контролю (рис. 5а). Значительное увеличение пролина наблюдали в вариантах с добавлением КК, причем его максимальное количество отмечено варианте Хит + КК, с самой низкой относительной скоростью роста микроклонов.

После прекращения действия стресс-фактора содержание пролина в опытных вариантах снижалось, однако оставалось выше контроля, не подвергнувшегося осмотическому стрессу, причем в

вариантах Хит + КК и Хит-КК его содержание оставалось выше, чем в стрессовом контроле (рис. 5б).

Известно, что усиление синтеза пролина и активизация его транспорта между компартментами клетки и частями растения является одной из первичных и универсальных реакций растения на стресс-воздействие [27]. Показано, что КК и конъюгат Хит-КК, добавленные в среду культивирования, усиливали синтез пролина в растениях в условиях осмотического стресса. Его повышенное содержание отмечалось и в репарационный период после снятия стрессовой нагрузки, при этом сохранялся активный рост и развитие растений. При добавлении Хит + КК, значительно усиливающих накопление пролина (в 4 раза по сравнению с добавлением ПЭГ), отмечено торможение относительной скорости роста микрокочеренков.

Таким образом, КК и в большей мере конъюгат Хит-КК, вероятно, можно рассматривать как сла-

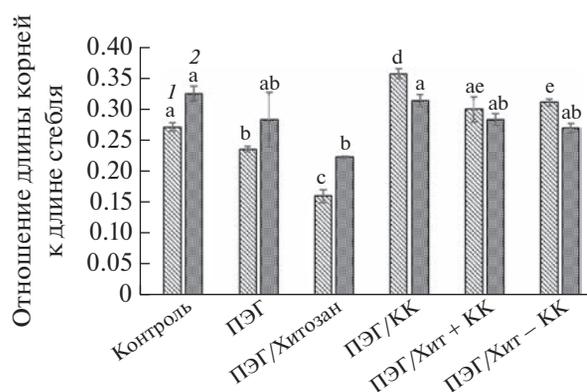


Рис. 4. Отношение длины корней к длине стебля микроклонов картофеля, выращенных в условиях двухнедельного осмотического стресса ((1), 5% ПЭГ) и в репарационный период (2).

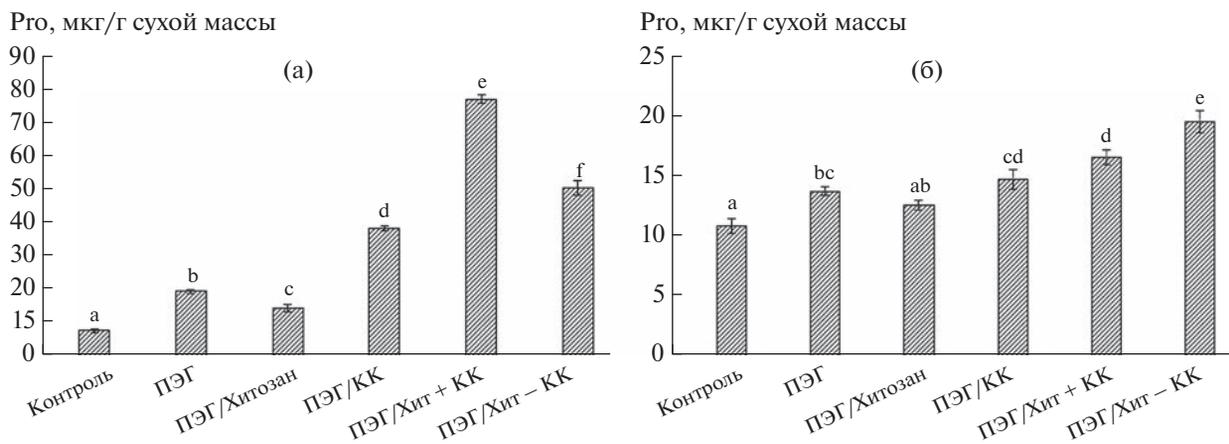


Рис. 5. Содержание пролина (Pro) в стеблях микроклонов картофеля после 2-недельного осмотического стресса (а) и недельного репарационного периода (б).

бывшие стрессоры, запускающие активацию адаптационных процессов в растениях с пролонгирующим эффектом к последующим абиотическим стрессовым воздействиям, в результате чего рост и развитие растений активировались и поддерживались в неблагоприятных условиях культивирования. При этом добавка КК стимулировала синтез пролина в растительной ткани, который еще в большей мере усиливается в условиях абиотического стресса и сохраняется в репарационный период. Механическая смесь Хит + КК, вероятно, также являлась сильным стрессовым фактором, вызывающим торможение или даже остановку роста микроклонов, значительное накопление пролина, что усугублялось при действии осмотического стресса.

Известно, что оксикоричные кислоты обладают ярко выраженными антиоксидантными свойствами [29], снижая образование активных форм кислорода за счет хелатирования металлов с переменной валентностью, нейтрализации свободных радикалов [30] и активации антиоксидантных ферментов [29]. Внесенная в МС-среду смесь КК и ее производных достоверно усиливала ростовые процессы микроклональных растений картофеля и стевии (*Stevia rebaudiana* Bertoni) [31, 32]. Под воздействием стрессовых факторов разной природы КК может включаться в фенилпропаноидный путь, изменяя направление синтеза собственных производных, усиливая образование фенольных соединений в целом [33].

Несмотря на то, что хитозан активно исследуют в качестве потенциального рост- и иммуностимулирующего соединения [34, 35], оказываемый им эффект неоднозначен и во многом определяется его молекулярной массой, степенью полимеризации и дезацетилирования, концентрацией, условиями окружающей среды, а также видом и возрастом растения [4, 9, 10, 36].

Выявленная реакция микроклонов картофеля на хитозан, вероятно, связана с его элиситорной активностью, приводящей к замедлению роста, а наложение второго негативного фактора — абиотического стресса, вызванного ПЭГ, практически полностью подавляло рост растений.

В свою очередь, ковалентное связывание хитозана с фенольными соединениями способствует снижению элиситорных свойств хитозана за счет уменьшения свободных аминогрупп и увеличению антиоксидантных свойств фенольных соединений за счет их стабилизации [13], что, по-видимому, и приводит к стимуляции развития микроклонов картофеля и повышению их устойчивости, поддерживая активный рост в условиях осмотического стресса и в репарационный период.

Ранее было показано [19], что ковалентное связывание хитозана с КК позволяет значительно повысить антирадикальную активность по сравнению с исходным полимером и КК (на 30%) с учетом степени модификации и в пересчете на ее массу. Кроме того, КК в составе конъюгата устойчива к воздействию окисляющих факторов окружающей среды в отличие от нативной кислоты, деградация которой может достигать 40–50% [37]. Таким образом, механизм синергетического действия конъюгата Хит-КК на ростовые процессы растений картофеля и формирование устойчивости к недостатку влаги обусловлен составом (полимер-антиоксидант) и структурой самого конъюгата. Благодаря полимерной матрице, вероятно, обеспечивается пролонгированное воздействие КК на функциональное состояние растительной клетки.

Кроме того, в результате конъюгирования хитозана с КК происходили изменение конформации полимерной цепи полисахарида, формирование новой системы водородных связей и увеличение гидродинамического диаметра и электрокине-

ческого потенциала [37], что стало причиной иного по сравнению с исходным полимером характера взаимодействия Хит-КК с растительным организмом.

Конъюгат Хит-КК может рассматриваться как экобезопасный регулятор роста и иммуномодулятор, ускоряющий рост и развитие эксплантов картофеля и способствующий повышению устойчивости растений и поддержанию их активного роста в стрессовых условиях и в постстрессовый период.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант Б22М-037).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Batish D.R., Singh H.P., Kaur Sh., Kohli R.K., Yadav S.S.* // J. Plant Physiol. 2008. V. 165. № 3. P. 297–305.
2. *Li H.H., Inoue M., Nishimura H., Mizutani J., Tsuzuki E.* // J. Chem. Ecol. 1993. V. 19. № 8. P. 1775–1787.
3. *Agatemor Ch., Ibsen K.N., Tanner E.E.L., Mitrugotry S.* // Bioeng. Trans. Med. 2018. V. 3. № 1. P. 7–25.
4. *Asghari-Zakaria R., Maleki-Zanjani B., Sedghi E.* // Plant Soil Environ. 2009. V. 55. № 6. P. 252–256.
5. *Khayrova A., Khayrova A., Lopatin S., Varlamov V.* // Int. J. Sci. 2019. V. 8. P. 81–86.
6. *Thamilarasan V., Sethuraman V., Gopinath K., Balal-akshmi C., Govindarajan M., Mothana R.A. et al* // J. Clust. Sci. 2018. V. 29. P. 375–384.
7. *Salachna P., Byczyńska A., Jeziorska I., Udycz E.* // World Sci. News. 2017. V. 62. P. 111–123.
8. *Faqir Y., Ma J., Chai Y.* // Plant Soil Environ. 2021. V. 12. P. 679–699.
9. *Chirkov S.N.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2002. V. 38. № 1. P. 1–8.
10. *El Hadrami A., Adam L.R., El Hadrami I., Daayf F.* // Mar. Drugs. 2010. V. 4. № 4. P. 968–987.
11. *Zayed M., Elkafafi S., Zedan A., Dawoud S.* // J. Plant Prod. 2017. V. 8. № 5. P. 577–585.
12. *Hassan F.A.S., Ali E., Gaber A., Fetouh M.I., Mazrou R.* // Plant Physiol. Biochem. 2021. V. 162. P. 291–300.
13. *Варламов В.П., Ильина А.В., Шагдарова Б.Ц., Луньков А.П., Мысякина И.С.* // Успехи биологической химии. 2020. Т. 60. С. 317–368.
14. *Ullah N., Basit A., Ahmad I., Ullah I., Shah S.T., Mohamed H.I. et al* // Bull Natl Res Cent. 2020. V. 44. № 1. <https://doi.org/10.1186/s42269-020-00435-4>
15. *Sun Y., Ji X., Cui J., Mi Y., Zhang J., Guo Zh.* // Mar. Drugs. 2022. V. 20. № 8. P. 489. <https://doi.org/10.3390/md20080489>
16. *Nagy V., Sahariah P., Hjalmarsdottir M.A., Masson M.* // Carbohydr. Polym. 2022. V. 277. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118896>
17. *Недведь Е.Л., Калацкая Ж.Н., Овчинников И.А., Рыбинская Е.И., Красковский А.Н., Николайчук В.В. и др.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2022. Т. 58. № 1. С. 74–82.
18. *Kraskouski A., Nikalaichuk V., Kulikouskaya V., Hileuskaya K., Kalatskaja J., Nedved H. et al* // Soft Mater. 2021. V. 19. № 4. P. 495–502.
19. *Гилевская А.Е., Николайчук В.В., Красковский А.Н., Гилевская К.С., Куликовская В.И., Калацкая Ж.Н. и др.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2022. Т. 58. № 2. С. 195–205.
20. *Шихалева Г.Н., Будняк А.К., Шихалеев И.И., Иващенко О.Л.* // Вестник ХНУ. Сер. Биология. 2014. Т. 21. № 1112. С. 168–172.
21. *Колупаев Ю.Е., Вайнер А.А., Ястреб Т.О.* // Вестник ХНУ. Серия Биология. 2014. Вып. 2. № 32. С. 6–22.
22. *Mishra S., Dubey R.S.* // J. Plant Physiol. 2006. V. 163. P. 927–936.
23. *Ozdemir F., Bor M., Demiral T., Turkan I.* // Plant Growth Regul. 2004. V. 42. P. 203–211.
24. *Muley A.B., Shingote P.R., Patil A.P., Dalvi S.G., Suprasanna P.* // Carbohydr. Polym. 2019. V. 210. P. 289–301.
25. *Пузина Т.И., Макеева И.Ю.* // Агрехимия. 2015. № 6. С. 53–58.
26. *Попова Э.В., Домнина Н.С., Коваленко Н.М., Борисова Е.А., Колесников Л.Е., Тютерев С.Л.* // Вестник защиты растений. 2017. Т. 3. № 93. С. 28–33.
27. *Acosta-Motos J.R., Ortuno M.F., Bernal-Vicente A., Diaz-Vivancos P., Sanchez-Blanco M.J., Hernandez J.A.* // Agronomy. 2017. V. 7. 18 p.
28. *Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В., Кабашикова Л.Ф.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2019. Т. 55. № 5. С. 419–440.
29. *Rivero R.M., Ruiz J.M., Garcia P.C., Lopez-Lcfebre L.R., Sanchez E., Romero L.* // Plant Sci. 2001. V. 160. P. 315–321.
30. *Siquet C., Paiva-Martins F., Lima J.L., Reis S., Borges F.* // Free Radic. Res. 2006. V. 40. P. 433–442.
31. *Булдаков С.А., Шегорец О.В.* // Картофель и овощи. 2014. № 2. С. 25–27.
32. *Шульгина А.А., Калашикова Е.А.* // Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. 2017. Т. 20. № 6. С. 46–50.
33. *Budna G.A., Lima R.B., Zanardo D.Y., dos Santos W.D., Ferrarese M., Ferrarese-Filho O.* // J. Plant Physiol. 2011. V. 168. № 14. P. 1627–1633.
34. *Riseh R.S., Hassanisaadi M., Vatankhah M., Babaki S.A., Barka E.A.* // Int. J. Biol. Macromol. 2022. V. 220. P. 998–1009.
35. *Chakraborty M., Hasamezzaman M., Rahman M., Khan M.A.R., Bhowmik P., Mahmud N.U. et al.* // Agriculture. 2020. V. 10. № 12. 624. <https://doi.org/10.3390/agriculture10120624>
36. *Тютерев С.Л.* // Вестник защиты растений. 2015. № 1. Вып. 83. С. 3–13.
37. *Nikalaichuk V., Hileuskaya K., Kraskouski A., Kulikouskaya V., Nedved H., Kalatskaja J. et al.* // J. Appl. Polym. 2021. V. 139. № 14. <https://doi.org/10.1002/app.51884>

Caffeic Acid in Various Formulations as a Growth and Resistance Regulator of Potato Microclones in *in vitro* Culture

N. A. Yalousskaya^{a, *}, J. N. Kalatskaja^a, N. A. Laman^a, V. V. Nikalaichuk^b,
A. N. Kraskouski^b, and K. S. Hileuskaya^b

^a*Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, 220072 Republic of Belarus*

^b*Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220141 Republic of Belarus
e-mail: yalousskaya92@mail.ru

The article discusses the influence of caffeic acid (CA), its mix with chitosan (ЧТ + СА) and chitosan-based conjugate (ЧТ-СА) on growth and proline content of microclone potato plants (*Solanum tuberosum* L.) in *in vitro* culture under optimal conditions and under prolonged osmotic stress caused by polyethylene glycol. Under optimal conditions ЧТ-СА and СА, acting as moderate strength stressors, accelerate the growth and development of potato microclones and increase the proline accumulation in the stems. Under osmotic stress СА and ЧТ-СА promote the resistance of potato microclones and maintain their active growth. And such effect persists during the reparation period. The mechanical mix ЧТ + СА causes inhibition of microclonal plants' growth and development accompanied by a significant accumulation of proline which is aggravated under stress.

Keywords: potato (*Solanum tuberosum* L.), osmotic stress, conjugate, chitosan, caffeic acid, morphometric parameters, proline

УДК 579.6

ФАГОВЫЕ АНТИТЕЛА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАНАМИЦИНА

© 2023 г. О. И. Гулий^{1, *}, С. С. Евстигнеева¹, С. А. Староверов^{1, 2}, А. С. Фомин¹, О. А. Караваева¹

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

² Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии
им. Н.И. Вавилова, Саратов, 410012 Россия

*e-mail: gulyi_olga@mail.ru

Поступила в редакцию 07.04.2023 г.

После доработки 21.04.2023 г.

Принята к публикации 28.04.2023 г.

Получены рекомбинантные антитела, специфичные к канамицину, с использованием овечьей дисплейной библиотеки фрагментов scFv (Griffin.1) и показана возможность их применения для определения канамицина методом дот-иммуноанализа. Минимальная определяемая концентрация канамицина составляет 1 мкг/мл (различимое связывание метки, отличное от фонового уровня). Показано, что антиканамициновые фаговые антитела обладали специфичностью в отношении канамицина и не взаимодействовали с другими антибиотиками (неомицином, тетрациклином, ампициллином, гентамицином). Антиканамициновые фаговые антитела являются перспективной альтернативой моноклональным антителам для использования при определении канамицина.

Ключевые слова: фаговый дисплей антител, канамицин, определение, дот-иммуноанализ

DOI: 10.31857/S0555109923050070, **EDN:** NPHVMM

Фаговый дисплей – технология, разработанная американским химиком Джорджем П. Смитом, в основе которой лежит экспонирование чужеродных пептидов или белков на поверхности фаговых частиц в составе одного из химерных белков оболочки [1–3]. Эта технология основана на возможности экспрессии чужеродного белка на поверхности нитчатого бактериофага M13, проведении встройки гена, кодирующего фрагмент эндонуклеазы рестрикции EcoRI, в единую рамку трансляции с минорным белком оболочки рIII нитчатого бактериофага [4]. Метод представления пептида на поверхности бактериофага M13 был изобретен в 1985 г. В 1989 г. были клонированы гены иммуноглобулинов, что позволило обойтись без гибридной технологии для получения антител. Первоначально в бактериях синтезировали Fab или scFv фрагменты антител, создавая библиотеки клонов, и проводили ручную отбор наиболее аффинных клонов с помощью радиоактивно-меченного антигена, что было весьма трудоемко и неэффективно. В 1990 г. впервые использовали дисплейную технологию представления фрагментов антител на поверхности фагов, а в 1991 создали первую библиотеку вариабельных фрагментов. Метод фагового дисплея был использован для экспонирования антигенсвязывающих фрагментов иммуноглобулинов на поверхности бактериофага fd [5]. В результате появился

новый комбинаторный подход к разработке рекомбинантных антител, являющийся альтернативным традиционной гибридной технологии. Технология фагового дисплея основана на простых процедурах манипулирования с ДНК и бактериями [4–6], что значительно сокращает время получения и стоимость стабильных клонов [7, 8]. Общая схема получения комбинаторной фаговой библиотеки включает следующие этапы.

1. Из донорских иммунных или интактных В-лимфоцитов человека, мыши, кролика, цыпленка, свиньи, собаки, обезьяны, овцы, коровы и др. выделяют мРНК и клонируют гены scFv, Fab-фрагментов или др.

2. Данные гены встраивают в фагмиду в единую рамку трансляции с геном, кодирующим белок капсида (обычно р3).

Полученными фагидами заражают клетки *Escherichia coli*, в которых происходит экспрессия фагмидных генов и сборка вирионов, которые в составе капсидных белков будут экспонировать и чужеродный фрагмент антитела. В зависимости от выбранной векторной системы этот этап проходит с использованием желперных фагов или без них. Таким образом, получают популяцию бактериофагов, каждый из которых экспонирует на своей поверхности определенный антигенсвязывающий домен [9, 10]. Схема конструирования фрагмен-

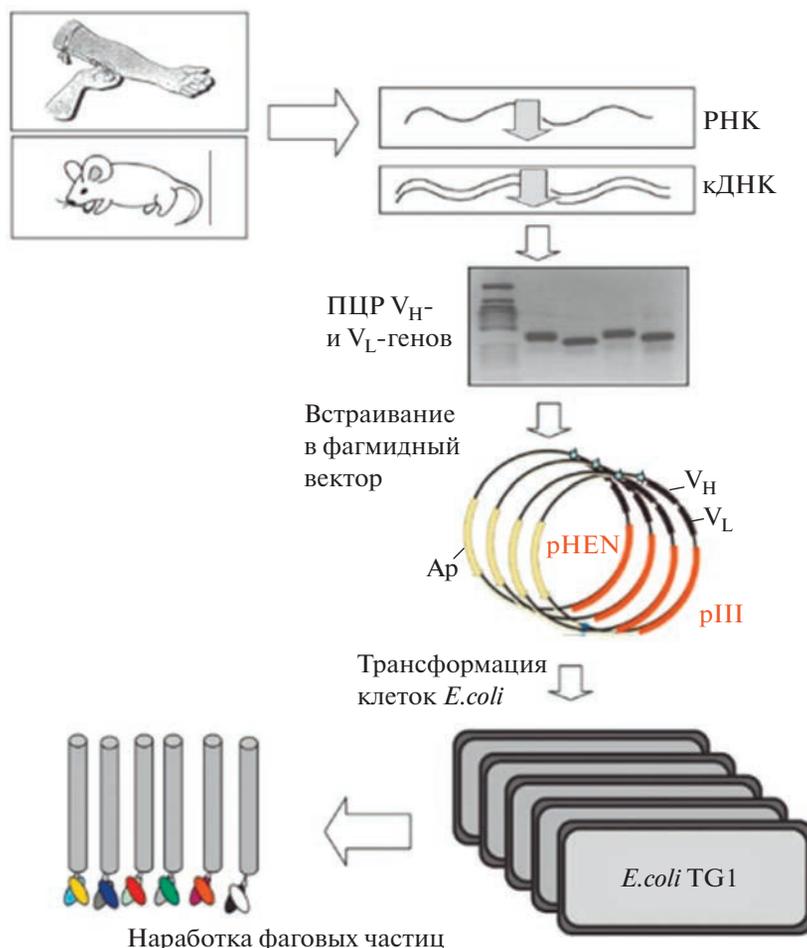


Рис. 1. Схема конструирования фрагментов антител фаговой библиотеки [11].

тов антител фаговой библиотеки представлена на рис. 1 [11].

Фаговый дисплей антител, позволяющий получать антитела к низкомолекулярным антигенам (гаптенам), является перспективной методикой для определения антибактериальных препаратов. С момента получения первых антител на поверхности фагов интерес к применению фагового дисплея неуклонно растет. За последние пять лет количество публикаций, посвященных применению рекомбинантных фаговых антител возросло более чем в два раза: от 70 статей в 2018 г. до 142 статей в 2022 г. [12–16]. Так, например, с применением технологии фагового дисплея получены и апробированы в различных методах иммуноанализа фаговые антитела к ивермектину [17], диминазину [18], ферритину [19], силимарину [20], ампициллину [21]. Одним из антибиотиков, который применяется не только для лечения, но и в качестве стимулятора роста животных и в кормовых добавках для профилактики заболеваний, является канамицин [22]. Неконтролируемое применение

канамицина приводит не только к повышению устойчивости бактерий к нему, но и вызывает накопление остатков канамицина в воде. Канамицин угрожает здоровью человека, поскольку он может накапливаться в организме и характеризуется потенциальной ототоксичностью и нефротоксичностью [23, 24]. Особенную опасность представляет канамицин при попадании в воду, поскольку для его гидролиза необходима температура не ниже 100°C [25], поэтому контроль содержания канамицина в воде и развитие методов для его определения представляет особый интерес.

Наиболее распространенным вариантом получения антител, обладающих специфичностью к конкретному антигену, является иммунизация животных. Возможность использования антиканамициновых антител нефагового происхождения для определения антибиотика описана в работах [26–30]. Альтернативным методом получения специфичных антител, не требующим иммунизации животных, является технология фагового дис-

плея. Поэтому важным моментом при развитии методов определения канамицина является подбор специфичного антитела, в том числе с помощью технологии фагового дисплея.

Цель работы – совершенствование технологии фагового дисплея для получения антиканамициновых антител и оценка возможности их применения для определения канамицина.

МЕТОДИКА

Бактериальная культура и питательные среды. Использованы бактерии *Escherichia coli* штамма TG1, полученные из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (Россия, <http://collection.ibrrm.ru>). Культуры выращивали на жидкой питательной среде 2xTY следующего состава (г/100 мл воды): NaCl – 0.5; триптон (“Veston, Dickinson and Company”, Франция) – 1.6; дрожжевой экстракт – 1.0, при 37°C с перемешиванием при 160 об./мин.

В работе использовали антибиотики: канамицин, ампициллин, тетрациклин, гентамицин, неомицин (“Sigma”, США).

Аффинная селекция миниантител из фаговой библиотеки. В работе использовали фаговую библиотеку антител (At) овцы, любезно предоставленную профессором Университета г. Абердин (Великобритания) У. Харрисом [9]. В работе использовали хелперный бактериофаг M13K07 (“Stratagene”, Швеция).

Синтез белковых конъюгатов канамицина проводили по методике, описанной в работе [30].

Для селекции фагов, несущих антитела к конъюгатам канамицина с бычьим сывороточным альбумином (БСА), в качестве твердой фазы для закрепления антигена использовали мембрану “Wester S”, как описано в [21, 32]. Блокировку незанятого антигеном пространства на стенках планшета проводили 2% раствором сухого обезжиренного молока (“Scharlau”, Испания) в течение 1 ч. Элюцию фаговых частиц проводили триэтиламинол. Элюированные фаговые частицы использовали для инфицирования клеток *E. coli* штамма TG1. Методика получения фаговых антител подробно описана в работе [21].

Отбор фаговых частиц библиотеки или аффинная селекция проводилась следующим образом: клоны библиотеки инкубировали с иммобилизованным антигеном (канамицином); удаляли при помощи отмывки фаговые частицы, не связанные с антибиотиком; элюировали связанные фаговые частицы; заражали отобранными клонами клетки *E. coli* и проводили амплификацию с последующим выделением аффинных клонов, как описано [21].

Концентрацию фаговых частиц определяли спектрофотометрически, как описано в работе

[33] на спектрофотометре UV-VIS Specord BS 250 (“Analytik Jena AG”, Германия) в Центре коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии “Симбиоз” ИБФРМ РАН.

Полученный препарат фаговых частиц использовали для проведения последующих раундов селекции, осуществляемых в аналогичных условиях. Специфичность полученных препаратов фаговых антител определяли методом дот-иммуноанализа. Титр сыровотки определяли с помощью метода твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) по общепринятой методике [34]. Титр фаговых антител составил 1 : 2000.

Наночастицы золота. Наночастицы золота со средним диаметром частиц (15 нм) получали, используя реакцию восстановления золотохлоридоводородной кислоты (“Aldrich”, США) цитратом натрия (“Fluka”, Швейцария) по методу, описанному в работе [35]. Наночастицы контролировали по фотометрической калибровке, с помощью трансмиссионной электронной микроскопии и регистрации динамического рассеяния света, как описано [36] в Центре коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии “Симбиоз” ИБФРМ РАН.

Дот-иммуноанализ. Для дот-иммуноанализа использовали мембрану “Western S” (“Sigma-Aldrich”, США), которую предварительно погружали в раствор метанола на 30 с. Методика проведения подробно описана в работе [21]. Канамицин наносили на мембрану “Western S” в концентрациях 0.5; 1; 2; 4, 6, 12, 25, 50 и 100 мкг/мл. Блокировку мембраны проводили в течение 1 ч 2%-ным сухим молоком, разведенным в фосфатном буферном растворе (pH 7.0). Мембрану погружали в раствор специфичных фагмид, разведенных до концентрации 1×10^{13} в 1 мл 10 мМ фосфатного буфера, и проводили инкубацию в течение ночи при 4°C. Затем мембрану отмывали от неспецифически связанных фаговых антител в фосфатном буфере и погружали в конъюгат коллоидного золота с кроличьими антифаговыми антителами ($A_{520} = 0.5$) при 25°C на ночь. После окрашивания мембрану промывали в фосфатном буфере и высушивали.

Метод твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Для ИФА использовали 96-луночные полистироловые планшеты. Ампициллин, канамицин и тетрациклин растворяли в 10 мМ фосфатном буфере (pH 7.0). Антибиотики титровали (исходная концентрация 1 мг/мл) с помощью двойных последовательных разведений и иммобилизовали в планшетах методом простой адсорбции при комнатной температуре на протяжении ночи. В качестве первичных антител вносили фаговые антиканамициновые антитела (разведе-

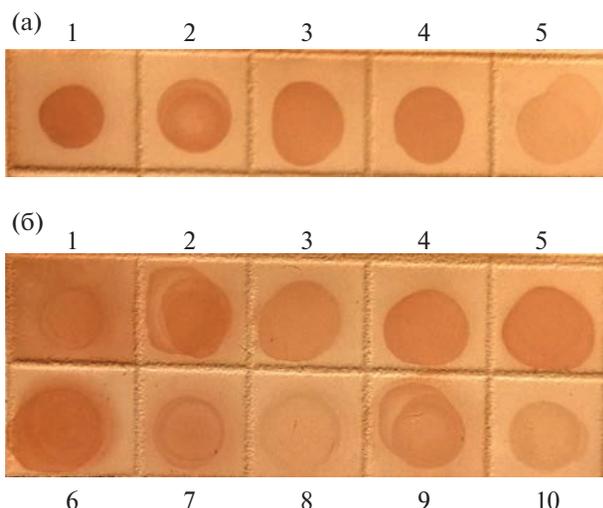


Рис. 2. Дот-иммуноанализ фаговых антител, специфичных к канамицину, полученных с использованием фаговой библиотеки после третьего (а) и четвертого (б) раундов селекции: 1 – 100; 2 – 50; 3 – 25; 4 – 12.5; 5 – 6; 6 – 5; 7 – 4; 8 – 3; 9 – 2; 10 – 1 (мкг/мл).

ние 1 : 10), которые затем взаимодействовали со вторичными кроличьими антифаговыми антителами (разведение 1 : 2). Для ферментативного мечения взаимодействия антиген-антитело была использована пероксидаза хрена, конъюгированная с козьими антикроличьими антителами. В качестве субстрата для пероксидазы использовали *o*-фенилендиамин в присутствии перекиси водорода. Оптическую плотность образцов после проведения ферментативной реакции измеряли с помощью мультипланшетного фотометра Multiskan Ascent (“ThermoLabsystems”, Финляндия) при длине волны 492 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При отработке технологии фагового дисплея для получения антиканамициновых антител, были проведены с первого по четвертый раунды селекции фаговых антител, специфичных к канамицину. Проверку специфичности антиканамициновых фаговых антител после каждого раунда селекции проводили методом дот-иммуноанализа, который заключается в качественном и полуколичественном тестировании антител. Суть метода заключается в визуализации специфического взаимодействия адсорбированного на мембране антигена и меченых (коллоидными или молекулярными метками) антител. В работе использовали стратегию вторичного мечения, которая успешно была ранее апробирована в работе [19]: сначала проводили биоспецифическую реакцию канамицин/фаговые антитела, а затем визуально оценивали реакцию с помощью меченых наночастицами поликлональных кроличьих антифаговых антител.

На рис. 2 представлены данные дот-иммуноанализа для антиканамициновых фаговых антител после 3 и 4 раундов селекции, поскольку специфичность антиканамициновых фаговых антител в отношении канамицина увеличилась после этих раундов селекции. При проведении исследований по определению минимальной концентрации антигена, визуально детектируемого с помощью антиканамициновых фаговых антител методом дот-иммуноанализа показано, что данные антитела позволяют определять канамицин. Так, из результатов, представленных на рис. 2б видно, что фаговые антитела, специфичные к канамицину, позволяли определять канамицин в водных растворах методом дот-иммуноанализа с нижним пределом детекции 1 мкг/мл.

Дополнительно для оценки специфичности антиканамициновых антител проводили ИФА после первого (рис. 3а), второго (рис. 3б), третьего (рис. 3в) и четвертого (рис. 3г) раундов селекции антител. В качестве дополнительного контроля специфичности антиканамициновых фаговых антител, использовали ампициллин и тетрациклин. Данные, полученные методом ИФА (рис. 3), показывают, что фаговые антиканамициновые антитела выявляли канамицин, но не обнаруживали другие антибиотики.

На основании проведенных исследований сделан вывод, что для повышения чувствительности фаговых антител рекомендовано проводить не менее четырех раундов селекции.

Для экспериментов по оценке специфичности фаговых антител к канамицину использовали антибиотики, которые относятся к разным классам:

тетрациклин – представитель тетрациклинов, занимает 1 место по объему продаж среди всех антибиотиков; ампициллин – представитель бета-лактамных антибиотиков вместе с пенициллинами (сведения по бета-лактамным антибиотикам приводятся совместно с пенициллинами) занимают 2 место по объему продаж среди всех антибиотиков [37].

При разработке специфичного рецептора для определения антигена одним из важных моментов является оценка неспецифического взаимодействия с другими анализатами. Поэтому дополнительно проводили анализ возможности неспецифического взаимодействия антиканамициновых антител с другими представителями аминогликозидных антибиотиков. В работе использовали гентамицин и неомидин. Структурные формулы используемых в работе аминогликозидных антибиотиков представлены на рис. 4. Условия проведения анализа для всех антибиотиков были аналогичны тем, которые были и при использовании канамицина. Как видно из данных, представленных на рис. 5, фаговые антиканамициновые антитела взаимодействуют только с канамицином, но не связыва-

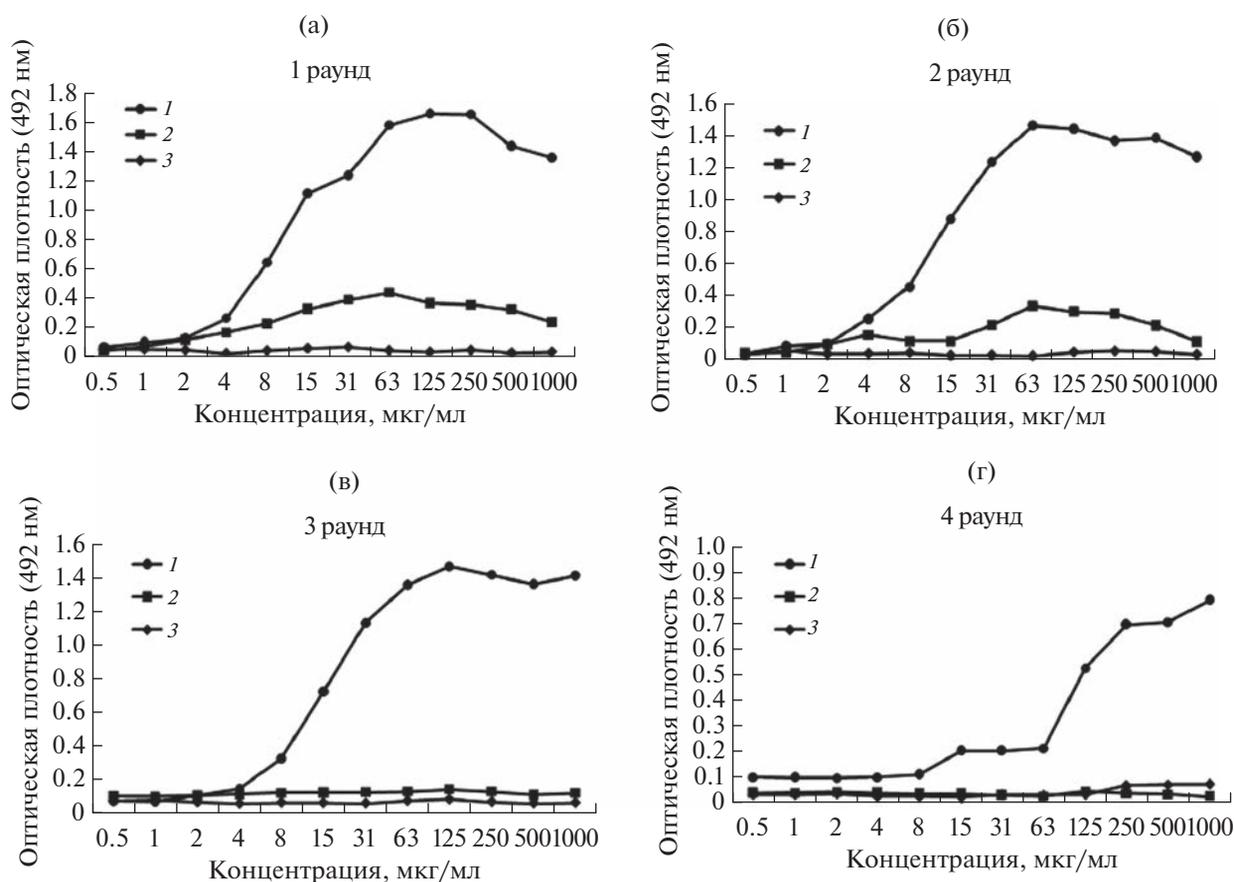


Рис. 3. ИФА фаговых антител, специфичных к канамицину после первого (а), второго (б), третьего (в) и четвертого (г) раундов селекции: 1 – канамицин, 2 – ампициллин, 3 – тетрациклин.

ются с ампициллином, гентамицином, тетрациклином и неомицином.

Таким образом, отработана технология получения антиканамициновых антител с помощью фагового дисплея. Методом дот-иммуноанализа при биоспецифичном взаимодействии отобранных фаговых антиканамициновых антител проведено определение канамицина в водных растворах, при минимальной определяемой концентрации 1 мкг/мл (различимое связывание метки, отличное от фонового уровня). Показано, что полученные антиканамициновые антитела специфичны в отношении канамицина и не взаимодействуют с представителями других антибактериальных препаратов: ампициллином, тетрациклином, гентамицином и неомицином.

Перспективность получения и применения моноклональных и поликлональных антител для определения канамицина показаны с помощью конкурентного прямого ИФА и иммунохроматографического анализа [38], метода поляризационного флуоресцентного иммуноанализа [39], а

также с помощью иммуносенсорных технологий [40–43]. В данной работе показана альтернативная возможность получения антител, специфичных к канамицину, с применением технологии фагового дисплея. Технология фагового дисплея обеспечивает быструю и экономичную наработку антител с использованием нитевидного фага. Производство рекомбинантных антител включает несколько этапов, но все они проводятся *in vitro* и отсутствует необходимость проведения экспериментов с привлечением животных. Это основное и важное преимущество данной технологии по сравнению с традиционными методами получения антител. Еще одним преимуществом фагового дисплея является меньшее время, необходимое для продукции антител. Это делает фаговый дисплей эффективным в долгосрочной перспективе. Однако, следует признать, что фаговые антитела имеют низкую аффинность по сравнению с обычными иммуноглобулинами.

Таким образом, рекомбинантные антитела, полученные с помощью фагового дисплея, созда-

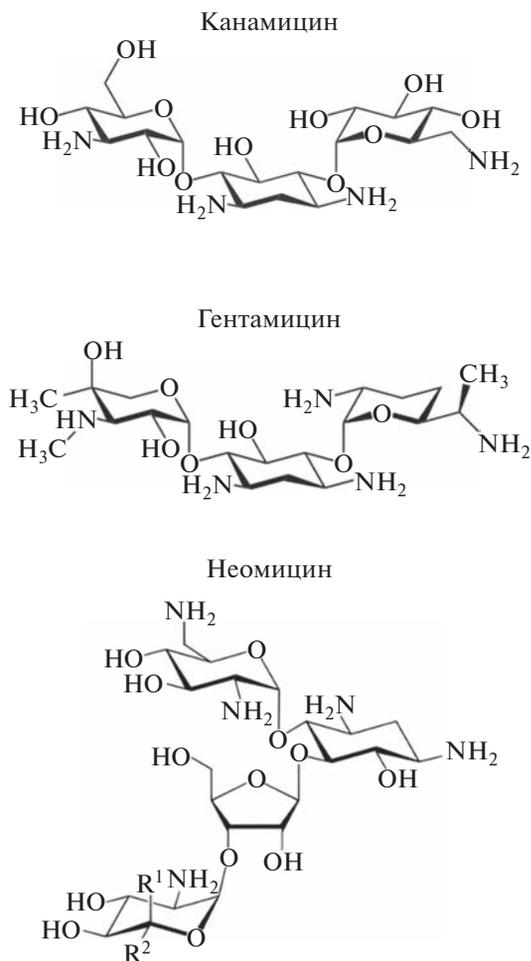


Рис. 4. Структурные формулы канамицина, гентамицина и неомицина.

ют перспективную платформу для определения антибиотиков и могут быть использованы для их анализа.

Исследования проводились с использованием оборудования Центра коллективного пользования “Симбиоз” (ЦКП “Симбиоз”) ИБФРМ РАН (Саратов).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного Фонда проект № 22-24-00417.

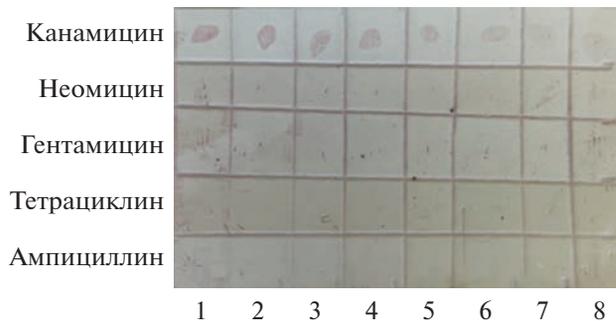


Рис. 5. Анализ взаимодействия фаговых антител, специфичных к канамицину, полученных с использованием фаговой библиотеки после 4 раунда селекции, в отношении канамицина, неомицина, гентамицина, тетрациклина и ампициллина методом дот-иммуноанализа: 1 – 128; 2 – 64; 3 – 32; 4 – 16; 5 – 8.0; 6 – 4.0; 7 – 2; 8 – 1.0 мкг/мл.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Willats W.G.T. // Plant Mol. Biol. 2002. V. 50. P. 837–854. <https://doi.org/10.1023/A:1021215516430>
2. Wang L.-F., Yu M. // Curr. Drug Targets. 2004. V. 5. P. 1–15. <https://doi.org/10.2174/1389450043490668>
3. Кузьмичева Г.А., Белявская В.А. // Биомедицинская химия. 2016. Т. 62. № 5. С. 481–495. Kuzmicheva G.A., Belyavskaya V.A. // Biochem. Moscow Suppl. Ser. B. 2017. V. 11. P. 1–15. <https://doi.org/10.18097/PBMC20166205481>
4. Smith G.P. // Science. 1985. V. 228. P. 1315–1317. <https://doi.org/10.1126/science.4001944>
5. McCafferty J., Griffiths A.D., Winter G., Chiswell D.J. // Nature. 1990. V. 348. P. 552–554. <https://doi.org/10.1038/348552a0>
6. Smith G.P., Petrenko V.A. // Chem. Rev. 1997. V. 97. P. 391–410. <https://doi.org/10.1021/cr960065d>
7. Chassagne S., Laffly E., Drouet E., Hérodin F., Lefranc M.-P., Thullier P. // Mol. Immunol. 2004. V. 41. P. 539–546. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.03.040>
8. Jacobsson K., Rosander A., Bjerketorp J., Frykberg L. // Biol. Proced. Online. 2003. V. 5. P. 123–135. <https://doi.org/10.1251/bpo54>
9. Charlton K.A., Moyle S., Porter A.J.R., Harris W.J. // J. Immunol. 2000 V. 164. P. 6221–6229. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6221>
10. Bashir S., Paeshuyse J. // Antibodies. 2020. V. 9. P. 21. <https://doi.org/10.3390/antib9020021>
11. Тукунова Н.В., Морозова В.В. // Acta Nat. 2009. Т. 1. С. 22–31. doi.org/ Tikunova N.V., Morozova V.V. // Acta Nat. 2009. V. 1. P. 20–28. <https://doi.org/10.32607/20758251-2009-1-3-20-28>
12. Zhao H., Nie D., Hu Y., Chen Z., Hou Z., Li M., Xue X. // Molecules. 2023. V. 28. P. 2621. <https://doi.org/10.3390/molecules28062621>

13. *Guliy O.I., Evstigneeva S.S., Dykman L.A.* // Biosens Bioelectron. 2023. V. 222. P. 114909. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114909>
14. *Tang H., Gao Y., Han J.* // Int J Mol Sci. 2023. V. 24 (4). P. 4176. <https://doi.org/10.3390/ijms24044176>
15. *Mahdavi S.Z.B., Oroojalian F., Eyvazi S., Hejazi M., Baradaran B., Pouladi N. et al.* // Int J Biol Macromol. 2022. V. 208. P. 421–442. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.113>
16. *Li L., Wu S., Si Y., Li H., Yin X., Peng D.* // Compr Rev Food Sci Food Saf. 2022. V. 21. P. 4354–4377. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13018>
17. *Пристенский Д.В., Староверов С.А., Ермилов Д.Н., Щеголев С.Ю., Дыкман Л.А.* // Биомедицинская химия. 2007. Т. 53. С. 57–64. *Pristensky D.V., Staroverov S.A., Ermilov D.N., Shchyogolev S.Y., Dykman L.A.* // Biochem. Moscow Suppl. Ser. B. 2007. V. 1. P. 249–253. <https://doi.org/10.1134/S1990750807030146>
18. *Staroverov S.A., Sidorkin V.A., Fomin A.S., Shchyogolev S.Y., Dykman L.A.* // J. Vet. Sci. 2011. V. 12. P. 303–307. <https://doi.org/10.4142/jvs.2011.12.4.303>
19. *Staroverov S.A., Volkov A.A., Fomin A.S., Laskavuy V.N., Mezhenyuy P.V., Kozlov S.V. et al.* // J. Immunoassay Immunochem. 2015. V. 36. P. 100–110. <https://doi.org/10.1080/15321819.2014.899257>
20. *Staroverov S.A., Kozlov S.V., Fomin A.S., Gabalov K.P., Khanadeev V.A., Soldatov D.A. et al.* // ADMET DMPK. 2021. V. 9. P. 255–266. <https://doi.org/10.5599/admet.1023>
21. *Гулий О.И., Алсовэиди А.К.М., Фомин А.С., Габалов К.П., Староверов С.А., Караваяева О.А.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2022. Т. 58. № 5. С. 513–519. *Guliy O.I., Alsovaidi A.K., Fomin A.S., Gabalov K.P., Staroverov S.S., Karavaeva O.A.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2022. V. 58. № 5. P. 646–651. <https://doi.org/10.1134/S0003683822050088> <https://doi.org/10.31857/S0555109922050087>
22. *Durante-Mangoni E., Grammatikos A., Utili R., Falagas M.E.* // Int. J. Antimicrob. Agents. 2009. V. 33. P. 201–205. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.09.001>
23. *Jiang M., Karasawa T., Steyger P.S.* // Front. Cell Neurosci. 2017. V. 11. P. 308. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00308>
24. *Shavit M., Pokrovskaya V., Belakhov V., Baasov T.* // Bioorg. Med. Chem. 2017. V. 25. P. 2917–2925. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.02.068>
25. *Tang M., Li F., Yang M., Zhang Y.* // J. Environ. Sci. (China). 2020. V. 97. P. 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.04.032>
26. *Jin Y., Jang J.W., Han C.H., Lee M.H.* // J Vet Sci. 2006. V. 7(2). P. 111–117. <https://doi.org/10.4142/jvs.2006.7.2.111>
27. *Pietschmann J., Dittmann D., Spiegel H., Krause H.J., Schröper F.* // Foods. 2020. V. 9. P. 1773. <https://doi.org/10.3390/foods9121773>
28. *Li C., Zhang Y., Eremin S.A., Yakup O., Yao G., Zhang X.* // Food Chem. 2017. V. 227. P. 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.058>
29. *DeCastro A.F., Place J.D., Lam C.T., Patel C.* // Antimicrob Agents Chemother. 1986. V. 29. № 6. P. 961–964. <https://doi.org/10.1128/AAC.29.6.961>
30. *Wei Q., Zhao Y., Du B., Wu D., Li H., Yang M.* // Food Chem. 2012. V. 134. № 3. P. 1601–1606. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.126>
31. *Самсонова Ж.В., Щелокова О.С., Иванова Н.Л., Рубцова М.Ю., Егоров А.М.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 6. С. 668–675. *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>
32. *Charlton K.A., Moyle S., Porter A.J., Harris W.J.* // J. Immunol. 2000. V. 164. P. 6221–6229. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6221>
33. *Smith G.P., Scott J.K.* // Methods Enzymol. 1993. V. 217. P. 228–257. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(93\)17065-D](https://doi.org/10.1016/0076-6879(93)17065-D)
34. *Shah K., Maghsoudlou P.* // Br. J. Hosp. Med. 2016. V. 77. P. 98–101.
35. *Frens G.* // Nat. Phys. Sci. 1973. V. 241. P. 20–22. <https://doi.org/10.1038/physci241020a0>
36. *Guliy O.I., Zaitsev B.D., Burygin G.L., Karavaeva O.A., Fomin A.S., Staroverov S.A., Borodina I.A.* // Ultrasound Med. Biol. 2020. V. 46. P. 1727–1737. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2020.03.014>
37. European Medicines Agency, European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption, 2021. “Sales of Veterinary Antimicrobial Agents in 31 European Countries in 2019 and 2020”. (EMA/58183/2021).
38. *Jin Y., Jang J.-W., Han C.-H., Lee M.-H.* // J. Vet. Sci. 2006. V. 7(2). P. 111–117.
39. *Воронежцева О.В., Еремин С.А., Ермолаева Т.Н.* // Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация. 2009. № 2. С. 11–17.
40. *Zhao Y., Wei Q., Xu C., Li H., Wu D., Cai Y., Mao K., Cui Z., Du B.* // Sens. Actuators B Chem. 2011. V. 155. № 2. P. 618–625. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2011.01.019>
41. *Shinko, E.I., Farafonova, O.V., Ermolaeva, T.N.* // Zavodskaya Laboratoriya. Diagnostika Materialov. 2021. V. 87. № 12. P. 11–16. <https://doi.org/10.26896/1028-6861-2021-87-12-12-17>
42. *Shinko E.I., Farafonova O.V., Shanin I.A., Eremin S.A., Ermolaeva T.N.* // Anal. Lett. 2022. V. 55. № 7. P. 1164–1177. <https://doi.org/10.1080/00032719.2021.1991364>
43. *Bizina E.V., Farafonova O.V., Zolotareva N.I., Grazhulene S.S., Ermolaeva T.N.* // J. Anal. Chem. 2022. V. 77. № 4. P. 458–465. <https://doi.org/10.1134/S1061934822040049>

Phage Antibodies for Kanamycin Detection

O. I. Guliy^{a, *}, S. S. Evstigneeva^a, S. A. Staroverov^{a, b}, A. S. Fomin^a, and O. A. Karavaeva^a

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

^b *Saratov State Vavilov Agrarian University, Saratov 410049 Russia*

**e-mail: guliy_olga@mail.ru*

Recombinant antibodies specific to kanamycin were obtained using a sheep display library of scFv fragments (Griffin.1) and the possibility of their use for the determination of kanamycin by dot-immunoassay was demonstrated. The minimum detectable concentration of kanamycin is 1 µg/mL (distinguishable label binding other than background). It has been shown that anti-kanamycin phage antibodies are specific for kanamycin and do not interact with other antibiotics (neomycin, tetracycline, ampicillin, gentamicin). Anti-kanamycin phage antibodies are a promising alternative to monoclonal antibodies for use in the determination of kanamycin.

Keywords: phage display antibodies, kanamycin, detection, dot-immunoassay

ПОЗДРАВЛЯЕМ ЮБИЛЯРА. АНАТОЛИЮ ГЕОРГИЕВИЧУ ЛОБАНКУ ИСПОЛНЯЕТСЯ 85 ЛЕТ

DOI: 10.31857/S0555109923050215, EDN: UIRNXV



Исполняется 85 лет со дня рождения и 60 лет научно-организационной, педагогической и общественной деятельности Анатолия Георгиевича Лобанка, академика НАН Беларуси, доктора биологических наук, профессора, заслуженного деятеля науки Республики Беларусь.

Академик А.Г. Лобанок – известный ученый в области микробиологии, биотехнологии и энзимологии, основатель и научный руководитель школы по биогенезу микробных ферментов. Основным направлением научной деятельности Анатолия Георгиевича является создание конкурентоспособных штаммов-продуцентов ферментов, установление общих закономерностей и регуляторных механизмов синтеза ферментов у микроорганизмов различных таксономических групп; определение свойств и функциональной значимости ферментных белков.

А.Г. Лобанок родился 18 июня 1938 года в г. Минске. После окончания лечебного факультета Минского медицинского института по рас-

пределению работал главным врачом Деревнянской сельской участковой больницы в Минской области Беларуси (1961–1963 гг.). После поступления в аспирантуру Института биологии АН БССР под руководством члена-корреспондента АН Казахской ССР, профессора Петра Александровича Буланова проводил исследования, которые завершились защитой кандидатской диссертации “Характеристика биологически активного полисахаридного комплекса из *Pullularia prototropha* и его действие на радиорезистентность мышей и клеток опухоли Эрлиха” (1966 г.). Молодой кандидат наук был направлен на стажировку в Имперский колледж Лондонского университета (1971–1972 гг.).

После стажировки Анатолий Георгиевич работал в Отделе микробиологии АН БССР сначала ученым секретарем, а затем младшим, старшим научным сотрудником, заведующим лабораторией и отделом (1966–1975 гг.). По его инициативе был создан Институт микробиологии НАН Беларуси,

который он возглавлял в течение 30 лет (1975–2004 гг.), совмещая обязанности директора и заведующего лабораторией ферментов до 2019 г.

Анатолий Георгиевич инициировал создание и способствовал развитию в Институте таких научных направлений как биоконверсия лигноцеллюлозных субстратов, биологическая защита растений, биоконсервация растительного сырья, микробная деградация ксенобиотиков, биосинтез соединений нуклеиновой природы, конструирование генно-инженерных штаммов-продуцентов ферментов.

Он заложил основы стратегии развития микробиологии и биотехнологии в Республике Беларусь на период до 2005 г., стал координатором теоретических и прикладных исследований, нацеленных на решение актуальных социально-экономических проблем страны. Обосновав концепцию первой в стране государственной научно-технической программы “Промышленная биотехнология” (2001–2005 г.), принял на себя научное руководство ее выполнением. В результате были разработаны первые отечественные импортозамещающие технологии получения и применения биопрепаратов для растениеводства, животноводства, охраны окружающей среды, кормовых и пищевых добавок, ферментных препаратов, субстанций для фармацевтической промышленности, постепенно развивалось их производство. Стратегия объединения исследований по созданию отечественных биотехнологий в рамках государственных программ и сегодня успешно реализуется: появляются новые отечественные биотехнологии и производства импортозамещающей продукции, востребованной в стране и за рубежом.

Принимая во внимание научную значимость и предвидя практическую пользу сохранения генофонда микроорганизмов, Анатолий Георгиевич инициировал создание Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов, впоследствии получившей статус национального достояния и международного депозитария.

Значительным вкладом руководителя и сотрудников лаборатории ферментов в развитие фундаментальных знаний о физиологии, биохимии и генетике микроорганизмов является детальное изучение биогенеза микробных ферментов, установление у про- и эукариот общих закономерностей индуцированного и конститутивного биосинтеза ферментных белков, выявление механизмов регуляции их образования. Среди важных научных результатов обнаружение закономерностей взаимосвязи между ростом микроорганизмов и синтезом ими первичных и вторичных метаболитов; установление роли внешней среды в биогенезе гидролаз, оксидоредуктаз, изомераз; выявление вторичного характера гетерогенности ферментных комплексов; обоснование биологической целесообразности существования различных регуляторных механизмов

образования ферментов; выяснение функциональной нагрузки множественных молекулярных форм ферментных белков.

Среди разрабатываемых в лаборатории под руководством Анатолия Георгиевича проблем – также направленная модификация ферментных белков, создание конъюгатов ферментов с наночастицами благородных металлов и наноструктурированных биокатализаторов с улучшенными и/или уникальными каталитическими свойствами; научное обоснование технологий получения комплексов микробных ферментов и биологически активных метаболитов, а также микробно-ферментативной конверсии возобновляемого сырья растительного и животного происхождения в продукты высокой добавленной стоимости.

Результаты теоретических исследований нашли воплощение в новых штаммах-продуцентах и созданных на их основе способах получения ферментных препаратов и других биологически активных продуктов микробного происхождения для пищевой промышленности, сельского хозяйства, медицинской диагностики.

Полученные результаты составили основу докторской диссертации “Биогенез экзоферментов у микроскопических грибов”, которую Анатолий Георгиевич защитил в 1977 г. в Институте микробиологии АН СССР. Под его руководством учениками выполнены и защищены 4 докторские и 18 кандидатских диссертаций.

Основные результаты теоретических и прикладных исследований, выполненных лично или в соавторстве, опубликованы более чем в 600 научных работах, в числе которых монографии “Микробный синтез на основе целлюлозы”, “Теоретические и прикладные аспекты синтеза ферментов микроорганизмами”, “Микробный синтез белка на целлюлозе”. Свыше 80 изобретений, патентов, полезных моделей, ноу-хау являются подтверждением новизны, практической, экономической и социальной значимости работ в лаборатории под руководством Анатолия Георгиевича.

Признанием достижений в научно-организационной, педагогической и общественной деятельности Анатолия Георгиевича является его избрание сначала членом-корреспондентом в 1984 г., а затем в 1991 г. действительным членом Академии наук Беларуси, присвоение ученого звания профессора (1981 г.) и почетного звания “Заслуженный деятель науки Республики Беларусь” (1998 г.).

Академик А.Г. Лобанок организовал и в течение 30 лет руководил работой Белорусского микробиологического общества (1980–2010 г.), работал в составе Исполнительного совета ЮНЕСКО (1987–1992 гг.), возглавлял Отделение биологических наук НАН Беларуси (1997–2002 гг.), совет по защите докторских диссертаций при Институте микробиологии НАН Беларуси. В настоящее время

мя он член редколлегии журнала “Весті НАН Беларусі” (серия биологических наук), редакционного совета журнала “Прикладная биохимия и микробиология” (Москва, Россия), член научно-го совета по подпрограмме “Микробные биотехнологии-2” ГПНИ “Биотехнологии-2”, ученого совета и совета по защите докторских диссертаций при Институте микробиологии НАН Беларуси.

За большой вклад в становление и развитие НАН Беларуси, укрепление научно-технического потенциала страны, установление международных научных связей, подготовку кадров высшей квалификации Анатолий Георгиевич стал лауреатом премий академий наук Беларуси, Украины и Молдовы (2000 г.), Национальной академии наук Беларуси (2017 г.), призером конкурса “ТОП-10” результатов деятельности ученых НАН Беларуси в области фундаментальных и прикладных исследований (2016 г.). Он — обладатель Серебряной медали ЮНЕСКО (1993 г.), Золотой медали НАН Беларуси “За большой вклад в развитие науки” (2018 г.), медали в честь 90-летия со дня основа-

ния НАН Беларуси (2018 г.), специального знака “Дзень Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі” (2022 г.). Отмечен благодарностью Председателя Президиума НАН Беларуси (2004 г.), награжден Почетными грамотами Президиума Верховного Совета БССР (1988 г.), Совета Министров Беларуси (2005 г.), НАН Беларуси (2008, 2013 гг.), концерта “Белбиофарм” (2003, 2006 гг.), Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (2008 г.), Государственного комитета по науке и технологиям при Совете Министров Республики Беларусь (2013 г.), Министерства здравоохранения Республики Беларусь (2018 г.), а также других министерств и ведомств.

Редколлегия журнала сердечно поздравляет Анатолия Георгиевича с юбилеем и желает ему крепкого здоровья, новых творческих планов и сил на их воплощение.

*Редколлегия журнала
“Прикладная биохимия и микробиология”*