

2020, Т. 16, № 1

ВЕСТНИК БИОТЕХНОЛОГИИ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ ИМЕНИ Ю.А. ОВЧИННИКОВА

Научно-практический журнал

Основан в 2005 году

Главный редактор

Р.Г. Василов

Редакционная коллегия

В.С. Воробьев, Т.Н. Гаева, С.И. Матаев, А.А. Назаренко

Редакционный совет

В.Г. Дебабов (Москва), В.Т. Иванов (Москва), М.П. Кирпичников (Москва),
Э.И. Коломиец (Минск, Республика Беларусь), А.И. Мирошников (Москва),
Т.В. Овчинникова (Москва), В.О. Попов (Москва),
Э.М. Раманкулов (Астана, Республика Казахстан), А.Н. Решетилов (Пушино),
Э.К. Хуснутдинова (Уфа), Н.К. Янковский (Москва)

Журнал зарегистрирован в Росохранкультуре
Рег. ПИ № ФС77-19745 от 11 апреля 2005 г.

Зав. редакцией О.В. Коломбет

Адрес: 123060, г. Москва, а/я 3

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: vestnik@biorosinfo.ru, vorobyev095@yandex.ru

Учредитель и издатель:

АНО «Информационно-аналитический центр

медико-социальных проблем»

Адрес: 127581 Москва, Керамический проезд, 53, кор. 1

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: raifvasilov@mail.ru

Издается при поддержке

Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

ISSN 1996-4741

© Информационно-аналитический центр
медико-социальных проблем, 2020

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

К читателям. *Р.Г. Василов* 4

Оригинальные статьи

Влияние сверхпродукции транскрипционных факторов Ace1 и Gal4l на активность промоторов генов *ScSUP1* и *PpGAP* у дрожжей *Pichia pastoris*.
М.А. Цыганков, М.В. Падкина 5

Полициклические ароматические углеводороды в донных отложениях Баренцева и Карского морей.
И.С. Халиков 13

Выявление генов, кодирующих лигнолитические ферменты, у природных изолятов микромицетов.
Е.А. Бессолицына, Т.А. Скуднова 20

Современные методы выделения и очистки ферментов. Разделение трипсиногена и химотрипсиногена.
Е.Р. Заболоцкая, Д.О. Виноходов 27

Влияние кислотности и количества растворенного кислорода в среде на накопление эфирного масла при глубинном культивировании штаммов рода *Eremothecium*.
Е.Ф. Семенова, А.В. Кураков, А.А. Князькова, В.С. Преснякова 35

Обзоры

Применение сорбентов в подготовке образцов для масс-спектрометрического анализа (обзор).
И.В. Жарникова, С.А. Курчева, Т.В. Жарникова, Е.А. Котенёва, А.С. Геогджаян, О.А. Гнусарева, А.В. Калинин, О.И. Цыганкова, А.Г. Кошкидько 40

Современные технологии и подходы в разработке систем жизнеобеспечения обитаемых космических аппаратов. Часть 2.
Д.В. Сухинов, П.М. Готовцев, Я.Э. Сергеева, К.В. Горин, Р.Г. Василов 51

Страницы истории. Юбилейные и знаменательные даты 2020 года 58

Правила для авторов 61

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. *R.G. Vasilov* 4

Original articles

The effect of overproduction of transcription factors *Ace1* and *Gal4l* on the activity of promoters of the *ScCUP1* and *P_ρGAP* genes in *Pichia pastoris* yeast.

M.A. Tsygankov, M.V. Padkina 5

Polycyclic aromatic hydrocarbons in the bottom sediments of Barents and Kara seas.

I.S. Khalikov 13

Identification of genes encoding lignolytic enzymes in natural isolates of micromycetes.

E.A. Bessolitsyna, T.A. Skudnova 20

Modern methods of isolation and purification of enzymes. Separation of trypsinogen and chymotrypsinogen.

Ye.R. Zabolotskaya, D.O. Vinokhodov 27

The effect of acidity and the amount of dissolved oxygen in the medium on the accumulation of essential oil during the deep cultivation of strains of the genus *Eremothecium*.

E.F. Semenova, A.V. Kurakov, A.A. Knyazkova, V.S. Presnyakova 35

Reviews

Application of sorbents in preparation of samples for mass-spectrometric analysis (review).

I.V. Zharnikova, S.A. Kurcheva, T.V. Zharnikova, E.A. Koteneva, A.S. Geogjayan,

O.A. Gnusareva, A.V. Kalinin, O.I. Tsygankova, A.G. Koshkidko 40

Modern technologies and approaches in the life support systems development for inhabited spacecraft. Part 2.

D.V. Sukhinov, P.M. Gotovtsev, Ya.E. Sergeeva, K.V. Gorin, R.G. Vasilov 51

Pages of history. Anniversary and significant dates 2020 58

Rules for authors 61

К читателям

В номере 1 за 2020 год помещены следующие работы. В статье Цыганкова М.А., Падкиной М.В. из Санкт-Петербургского государственного университета показано, что транскрипционный фактор Ace1 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* сохраняет функциональность в дрожжах *P. pastoris*, а сверхэкспрессия генов транскрипционных факторов Ace1 и Gal41 вне зависимости от силы контролирующих их промоторов приводила к значительному росту активности промоторов *PCUP1* и *PGAP*.

В работе Халикова И.С. (Научно-производственное объединение «Тайфун» из Обнинска) приводятся результаты 2016 года по определению содержания бенз(а)пирена и полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) в донных отложениях лицензионных участков Баренцева и Карского морей. Среднее содержание бенз(а)пирена в районах Баренцева моря в 10 раз выше, чем в Карском. Уровни загрязнения ПАУ в этих местах невысоки и указывают на более значительную антропогенную нагрузку на Баренцево море, чем на Карское.

Статья Бессолицыной Е.А., Скудновой Т.А. (Вятский государственный университет) посвящена изучению 26 природных изолятов микромицетов, выделенных на территории Кировской области, кодирующих лигнолитические ферменты.

В исследовании Заболоцкой Е.Р., Виноходова Д.О. (Санкт-Петербургский государственный технологический институт) обсуждаются основные хроматографические и нехроматографические методы выделения и очистки ферментов, а также разделения трипсиногена и химотрипсиногена.

Группа авторов (Семенова Е.Ф. и др.) из разных учреждений (Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, Пензенский государственный университет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова) изучила влияние кислотности и количества растворенного кислорода в среде на накопление эрмотецевого масла при глубинном культивировании штаммов рода *Eremotecium*.

В обзоре Жарниковой И.В. с коллегами (Ставропольский противочумный институт) представлены современные сведения по проблеме применения различных видов сорбентов в подготовке образцов для масс-спектрометрического анализа.

В обзорной статье Сухинова Д.В. и др. (НИЦ «Курчатовский институт») дано продолжение (часть 2) первой публикации этих же авторов в предыдущем номере журнала (№ 4 за 2019 год) по теме, связанной с современными технологиями и подходами в разработке систем жизнеобеспечения обитаемых космических аппаратов.

В заключение в первом номере традиционно приводятся юбилейные и знаменательные даты текущего года.

Главный редактор,
президент Общества биотехнологов России,
профессор Р.Г. ВАСИЛОВ

ВЛИЯНИЕ СВЕРХПРОДУКЦИИ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ Ace1 И Gal4I НА АКТИВНОСТЬ ПРОМОТОРОВ ГЕНОВ *SCCUP1* И *PPGAP* У ДРОЖЖЕЙ *PICHELIA PASTORIS*

М.А. ЦЫГАНКОВ*, М.В. ПАДКИНА

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

Получены штаммы дрожжей *Pichia pastoris* со сверхэкспрессией генов позитивных транскрипционных факторов Ace1 и Gal4I под контролем промоторов *PAOX1*, *PCUP1* и *PGAP*. Показано, что транскрипционный фактор Ace1 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* сохраняет функциональность в дрожжах *P. pastoris*. Сверхэкспрессия генов транскрипционных факторов Ace1 и Gal4I вне зависимости от силы контролируемых их промоторов приводила к значительному росту активности промоторов *PCUP1* и *PGAP*.

Ключевые слова: дрожжи *P. pastoris*, регуляция промоторов, транскрипционные факторы, Ace1, Gal4, *PGAP*, *PCUP1*.

Введение

Дрожжи *Pichia pastoris* успешно используют для экспрессии гетерологичных генов, с их помощью получены различные соединения, уровень продукции которых выше, чем во многих других микробных системах [18]. Список гетерологичных белков, синтезированных в *P. pastoris*, постоянно увеличивается, более 70 продуктов на основе этих белков находятся на поздней стадии разработки [15].

В процессе создания системы экспрессии гетерологичного гена первоочередным является вопрос о выборе промотора. Промотор целевого гена — один из ключевых факторов продуктивности системы экспрессии [25]. Наиболее часто применяемыми промоторами *P. pastoris* являются сильный индуцируемый промотор гена алкогольоксидазы-1 (*PAOX1*) и конститутивный промотор гена глицероальдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*PGAP*) [4]. В связи с опасностью использования на производстве такого ядовитого и опасного индуктора, как метанол, идет работа по получению вариантов промотора, которые будут работать без применения метанола при сохранении высокой активности [20]. Так, был получен штамм со сверхпродукцией активатора транскрипции *Mit1p*, у которого активность *PAOX1* на среде с

глицерином составляла 77% его активности на среде с метанолом [21]. Сверхэкспрессия гена другого транскрипционного фактора (ТФ) *Mxr1* под контролем промотора *PAOX2* приводила к повышению выхода целевого продукта на 98 и 269% соответственно при росте на метаноле и в условиях лимитирующих концентраций глицерина [8]. Аналогичный подход со сверхпродукцией активаторов транскрипции показал эффективность и при работе с конститутивным промотором *PGAP*. Сверхпродукцией ТФ при дубликации в промоторе его сайтов связывания достигалось увеличение активности промотора на 200% и более [5]. Одновременно с модификациями хорошо известных промоторов [20] идет поиск альтернативных промоторов и подходов к увеличению их активности для высокоэффективной экспрессии гетерологичных генов.

У дрожжей *S. cerevisiae* существует ген *CRS5* и 2 копии гена *CUP1* (*CUP1-1*, *CUP-2*), которые кодируют металлотионеины. Металлотионеины — цистеин-богатые консервативные белки, представленные у всех эукариот, одна из основных функций которых заключается в защите клетки от тяжелых металлов — меди, кадмия [10]. В дрожжах *S. cerevisiae* Ace1 является транскрипционным активатором промотора гена *CUP1* (*PCUP1*) [12]. Потенциальные сайты связывания ТФ Ace1 обнаружены в промоторах 31 гена [24]. Ранее было показано, что промотор *PCUP1* *S. cerevisiae* сохраняет свою функциональность в *P. pastoris* [13]. Данных об использовании и функционировании ТФ Ace1 *S. cerevisiae* в дрожжах *P. pastoris* в литературе не найдено.

В *P. pastoris* ген *PpGAP* кодирует глицероальдегид-3-фосфатдегидрогеназу (*GAP*), ключевой фермент гликолиза,

© 2020 г. Цыганков М.А., Падкина М.В.

* Автор для переписки:

Цыганков Михаил Александрович
инженер-исследователь, СПбГУ, Биологический факультет, кафедра генетики и биотехнологии, лаборатория биохимической генетики
E-mail: mial.tsygankov@yandex.ru

имеющий значительное сходство аминокислотной последовательности с ферментами GAP других микроорганизмов [22]. Промотор гена *PpGAP* (*PGAP*) конститутивен, при смене источника углерода транскрипция гена *PpGAP* изменяется незначительно. В промоторе этого гена обнаружены сайты связывания разных ТФ, в том числе ТФ Gal4l. Сверхпродукция Gal4l в дрожжах *P. pastoris*, как показал Ата Ö. [6], приводит к нескольким эффектам — помимо интересующего нас повышения активности промотора *PGAP*, наблюдалось повышение скорости утилизации глюкозы и выхода этанола. Иными словами, при сверхпродукции Gal4l «Крэбтри-негативные» дрожжи *P. pastoris* проявляли «Крэбтри-позитивный» фенотип. В дрожжах *S. cerevisiae* продукт гена *GAL4* участвует в регуляции метаболизма галактозы, не являясь при этом жизненно необходимым.

Дрожжи *P. pastoris* не могут утилизировать галактозу, и в данном случае можно предположить, что ТФ Gal4l участвует в регуляции других метаболических путей. В пользу этого предположения говорят описанные выше эффекты от сверхпродукции указанного ТФ в дрожжах *P. pastoris* и данные о том, что предполагаемые сайты связывания для Gal4l были обнаружены не только в промоторе *PGAP*, но и в промоторах других генов гликолиза [5]. Первой задачей настоящего исследования было подтвердить функциональность ТФ Ace1 из *S. cerevisiae* в дрожжах *P. pastoris*. После этого нашей целью было оценить влияние сверхпродукции ТФ Ace1 на активность промотора *PCUP1* в зависимости от силы промотора, контролирующего экспрессию его гена *ACE1*. Для этого использовали следующие промоторы — сильный промотор *PAOX1*, конститутивный *PGAP* и индуцируемый ионами меди *PCUP1*. При клонировании ТФ Ace1 под контролем промотора *PCUP1* мы ожидали, что при этом образуется положительная обратная связь (рис. 1), которая могла бы значительно увеличить активность изучаемого промотора.

В природе известен случай подобной положительной обратной связи — ген перепелки *Rax-6*, который играет важную роль в развитии глаз и, возможно, в других процессах развития, кодирует фактор транскрипции, способный связывать и активировать свой собственный промотор [16]. Подобный подход был использован в работе Чанга [8], когда позитивный ТФ гена *AOX1* был под контролем также индуцируемого метанолом, но более слабого промотора гена *AOX2*.

Второй нашей задачей было оценить эффект от подобной схемы регуляции промотора *PGAP* с участием его ТФ Gal4l при росте на различных источниках углерода.

В качестве репортерного гена, позволяющего оценить активность промотора, использовали структурный

ген репрессибельной кислой фосфатазы *PHO5* дрожжей *S. cerevisiae* [17].

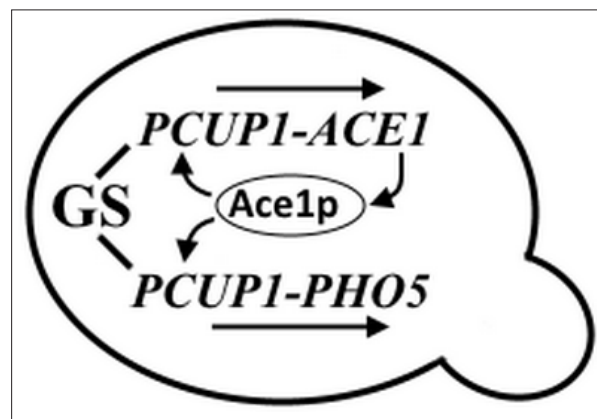


Рис 1. Схема возможного участия ТФ Ace1 в регуляции экспрессии собственного структурного гена *ACE1* и репортерного гена *PHO5*, находящихся под контролем промотора *PCUP1*

Материалы и методы

Плазмиды. Для создания генетических конструкций использовали плазмиды *pPICZαA* (Thermo Fisher Scientific) и *pPIC9-PHO5*, в которой структурный ген кислой фосфатазы *PHO5* находится под контролем промотора гена *AOX1* [17].

Штаммы. На этапе конструирования плазмид и их амплификации использовали штамм DH5α *Escherichia coli*. Для получения дрожжевых штаммов нужного генотипа использовали штамм *P. pastoris* GS115 (*his4*) (Thermo Fisher Scientific) (*his4* — мутация, приводящая к потребности в гистидине).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Для амплификации промотора *PGAP* и гена *PpGAL4L* использовали хромосомную ДНК дрожжей *P. pastoris* (штамм GS115), а для амплификации гена *ScACE1* и промотора *PCUP1* — хромосомную ДНК дрожжей *S. cerevisiae* (штамм S288C).

Полимеразную цепную реакцию проводили в приборе T100 ThermalCycler (BIO-RAD) по следующей программе: плавление цепей ДНК при 95 °C в течение 45 с, отжиг праймеров в течение 90 с при температуре 55 °C (для амплификации генов *ScACE1* и *PpGAL4L*), 50 °C (для амплификации промоторов генов *ScCUP1* и *PpGAP*), полимеразная реакция при 72 °C в течение 120 с. После окончания ПЦР пробу инкубировали при 72 °C в течение 5 мин. Всего 35 циклов. Перечень праймеров приведен в таблице 1.

Праймеры, использованные в работе

Вставка/вектор	Сайты рестрикции	Последовательность (5'-3')
<i>PCUP1/ ρPIC9-ρHO5</i>	5'-AatII BamHI-3'	FW TAGTTAGACGTCCTACCGACATTTGGGCGC RW GCCTGGGGATCCTTTATGTGATGATTGATTG
<i>PGAP/ ρPIC9-ρHO5</i>	5'-AatII BamHI-3'	FW TCAATCGACGTCTTTTGTAGAAATGTCTTG RW AGTAGCGGATCCATAGTTGTTCAATTGATTG
<i>PCUP1/ ρPICZαA</i>	5'-BglII HindIII-3'	FW CTCATTAGATCTTACCGACATTTGGGCGC RW GCCTGGAAGCTTTTATGTGATGATTGATTG
<i>PGAP/ ρPICZαA</i>	5'-BglII BstBI-3'	FW GCTCAGATCTTTTGTAGAAATGTCTTG RW GTGAGTTCGAAATAGTTGTTCAATTGATTG
<i>ScACE1/ ρZαPCUP1 ρZαPGAP</i>	5'-BstBI XhoI-3'	FW AACTGTTTTCGAATAATGGTTCGTAATTAACGGGG RW GCGCCCTCGAGTTATTGTGAATGTGAGTTATG
<i>ρρGAL4L/ ρZαPGAP</i>	5'-PvuII NotI-3'	FW GATACAGCTGATGCATCATAAAGAAAGACTCATAG RW TTATGCGGCCGCTTAATCCATTATAGTGTC

Выделение ДНК. Выделение плазмидной ДНК и фрагментов ДНК из агарозных гелей проводили с помощью наборов реактивов CleanupStandard/PlasmidMiniprep (Евроген) по методикам, рекомендованными производителем. Выделение хромосомной ДНК из клеток дрожжей проводили разрушением клеток на ворткексе стеклянными шариками со смесью фенол : хлороформ : изоамиловый спирт (в соотношении 8:5:1) в течение 10 минут, с последующим отделением клеточных стенок и неразрушенных клеток и осаждением ДНК из надосадочной жидкости 96% этанолом.

Трансформация и культивирование. Трансформацию дрожжей плазмидными векторами проводили методом электропорации по описанной ранее методике [23]. Трансформацию бактерий проводили по стандартной методике [2].

Бактериальные штаммы культивировали в среде Луриа — Бертани [2]. Для отбора трансформантов, устойчивых к ампициллину, в среду добавляли антибиотик в концентрации 50 мг/л, для отбора трансформантов, устойчивых к зеоцину, в среду добавляли антибиотик в концентрации 25 мг/л. Выращивание штаммов *E. coli* проводили при 37 °С.

Для отбора дрожжевых трансформантов, устойчивых к антибиотику зеоцину, использовали среду, содержащую на 1 литр: дрожжевой экстракт — 10 г, пептон — 20 г, глюкозу — 10 г (среда YPD), 150 мг антибиотика. Для отбора дрожжевых трансформантов, прототрофных по гистидину, использовали минимальную

среду, содержащую 10 г/л глюкозы и 6.8 г/л смесь витаминов, микроэлементов и источника азота (Y0626, Sigma-Aldrich). При работе на чашках Петри во все среды добавляли 20 г агара на 1 л среды.

При культивировании штаммов, содержащих репортерный ген *ρHO5* под контролем *ρAOX1*, клетки дрожжей с твердой среды ресуспендировали в стерильной воде и засекали в 20 мл среды, содержащей дрожжевой экстракт — 10 г, пептон — 20 г, метанол — 20 мл на литр и 0,1 М калий фосфатный буфер pH=6,0. При выращивании штаммов с репортерным геном, клонированным с промотором *ρGAP*, вместо метанола в качестве источника углерода добавляли в 1 л среды 10 г глюкозы или 10 г глицерина. Для индукции промотора *ρCUP1* в среду добавляли сульфат меди (II) до конечной концентрации ионов меди 10 mM. Культивирование проводили 72 или, при необходимости, 96 часа при 20 °С, измерения проводили каждые 12 часов. Культивирование во всех случаях осуществляли на качалке при 150 об/мин.

Определение активности кислой фосфатазы (КФ). Определение активности кислой фосфатазы проводили по ранее разработанной методике [3]. Удельную активность определяли как отношение оптической плотности при 410 нм к плотности клеточной суспензии при 600 нм.

Биоинформатические методы. Статистическую обработку данных проводили с использованием программ Excel (Microsoft) и GraphPad Prizm 6. Межгрупповые различия оценивали с помощью U-критерия Манна — Уитни.

Результаты и обсуждение

Получение плазмид, содержащих гены *PHO5*, *ScACE1* и *P_ρGAL4L* под контролем промоторов *PCUP1* и *PGAP*

Для создания плазмид, несущих ген *PHO5* под контролем промоторов *PGAP* и *PCUP1*, использовали плазмиду *ρPIC-PHO5* (рис. 2а). Схема получения плазмид *ρ9PCUP1-PHO5* и *ρ9PGAP-PHO5* отражена на рисунке 2-(1,2). Для оценки влияния сверхэкспрессии генов *ScACE1* и *P_ρGAL4L* на активность промоторов *PCUP1* и *PGAP* использовали конструкции на основе плазмиды *ρPICZαA*. Плазмиду *ρZPAOX1-ACE1*, в которой ген *ScACE1* находится под контролем про-

тора *PAOX1*, получали из плазмиды *ρPICZαA*. Схема получения конструкции, где под контролем промоторов *PCUP1* и *PGAP* находятся соответственно гены *ScACE1* и *P_ρGAL4L* (плазмиды *ρZPCUP1-ACE1*, *ρZPGAP-GAL4L* и *ρZPGAP-ACE1*), показана на рисунке 2-(3-6). Их получали из плазмид *ρZαPCUP1* и *ρZαPGAP*, в которых промотор *PAOX1* был предварительно заменен на соответственно *PCUP1* и *PGAP*. Вставки генов в плазмиды на основе *ρPICZαA* проводили с удалением последовательности альфа-фактора, чтобы продукты клонированных генов не секретировались, а оставались внутри клетки. Структуру плазмид и правильность встройки подтверждали при помощи ПЦР и рестрикционного анализа.

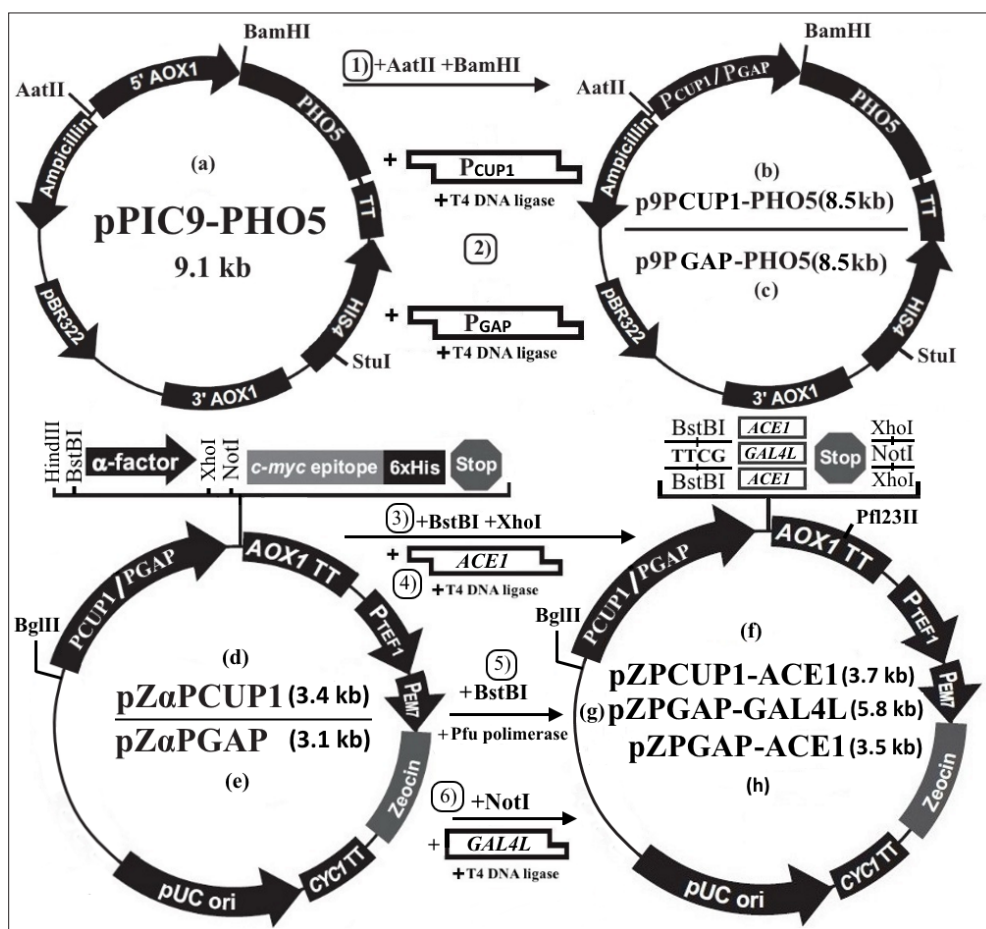


Рис 2. Схема конструирования плазмид

Получение дрожжевых штаммов. Штаммы GS-*PCUP1-PHO5* и GS-*PGAP-PHO5*, в которых репортерный ген *PHO5* находится под контролем промоторов *PCUP1* и *PGAP*, были получены трансформацией штамма GS115 соответственно плазмидами *ρ9PCUP1-PHO5* и *ρ9PGAP-PHO5*. Плазмиды обрабатывали рестриктазой *StuI*, в результате вставка линейаризованной плазмиды происходила в нефункцио-

нальный локус *HIS4*, что приводило к прототрофности штамма по гистидину.

Штамм GS-*PCUP1-PHO5* далее трансформировали плазмидой *ρZPAOX1-ACE1*, линейаризованной по сайту рестрикции *BstBI*, находящемуся в области промотора *PAOX1*. Полученный штамм GS-*PCUP1-PHO5*/*PAOX1-ACE1* содержал, помимо репортерной системы, ген *ScACE1* под управлением промотора *PAOX1*.

Штаммы GS-PCUP1-PHO5/PCUP1-ACE1, GS-PGAP-PHO5/PGAP-ACE1 и GS-PGAP-PHO5/PGAP-GAL4L, где под управлением каждого из двух копий промоторов *PCUP1* или *PGAP* находится ген *PHO5* и гены *ScACE1* или *PpGAL4L* соответственно, получали трансформацией штаммов GS-PCUP1-PHO5 и GS-PGAP-PHO5 плазмидами *pZPCUP1-ACE1*, *pZPGAP-GAL4L* или *pZPGAP-ACE1*. Плазмиды линейаризовали по сайту рестрикции Pfl23II, находящемуся в области терминирования транскрипции гена *AOX1*. Штаммы-трансформанты становились устойчивыми к антибиотику зеоцину. Штамм с геном *PHO5* под контролем промотора *PAOX1* был получен в лаборатории ранее [17]. При трансформации штамма GS115 плазмидами *pZPCUP1-ACE1*, *pZPGAP-GAL4L* и *pZPCUP1-ACE1* получали контрольные штаммы GS-PCUP1-ACE1, GS-PGAP-GAL4L и GS-PGAP-ACE1, у которых отсутствует репортерная система, а гены *ScACE1* и *PpGAL4L* находятся под управлением соответственно промоторов *PCUP1* и *PGAP*.

Как отмечалось выше, промотор *PCUP1* из *S. cerevisiae* функционирует в *P. pastoris* [13]. Учитывая, что ТФ Ace1 имеет функции помимо регуляции экспрессии металлотионеинов, а также то, что в аэробных и анаэробных условиях ТФ Ace1 в *S. cerevisiae* работает по-разному [19], нашей первой задачей было оценить его функциональность в аэробных дрожжах *P. pastoris*. Для этого штамм GS-PCUP1-PHO5/PAOX1-ACE1 выращивали на средах с метанолом и глицерином в качестве основных источников углерода. Для индукции промотора *PCUP1* использовали 10 мМ Cu^{2+} . Контрольный штамм GS-PCUP1-PHO5 выращивали в этих же условиях. На среде с метанолом активность КФ у штамма GS-PCUP1-PHO5/PAOX1-ACE1 была повышена в два и более раз, начиная уже с первых суток культивирования (рис. 3). На среде с глицерином — в условиях репрессии промотора *PAOX1* — отличия в активности КФ у двух штаммов выявлено не было; следовательно, повышение активности КФ у штамма GS-PCUP1-PHO5/PAOX1-ACE1 обусловлено экспрессией гена *ACE1* под контролем промотора *PAOX1* и появлением белка Ace1p в клетке. Эти данные позволяют сделать вывод о сохранении ТФ Ace1 своей роли позитивного регулятора для промотора *PCUP1* дрожжей *S. cerevisiae* в клетках дрожжей *P. pastoris*.

Следующей нашей задачей было оценить влияние силы промотора, который контролирует ген позитивного ТФ, на эффект от сверхпродукции данного ТФ. В нашей работе ген *ACE1* контролировался сильным

индуцируемым промотором *PAOX1*, слабым индуцируемым ионами меди промотором *PCUP1* (см. рис. 1) и конститутивным промотором *PGAP*. Штаммы GS-PCUP1-PHO5/PAOX1-ACE1, GS-PCUP1-PHO5/PCUP1-ACE1 и контрольные штаммы GS-PCUP1-PHO5 и GS-PAOX1-PHO5 выращивали на среде с метанолом — для индукции *PAOX1* и 10 мМ Cu^{2+} для индукции промотора *PCUP1*. Значения активности КФ у исследованных штаммов на среде с метанолом и 10 мМ Cu^{2+} см. на рисунке 3.

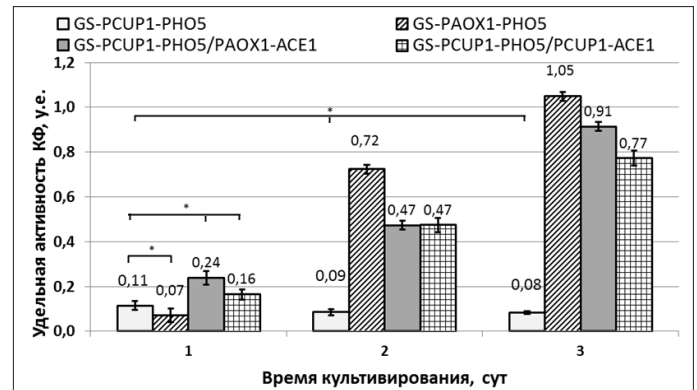


Рис 3. Удельная активность КФ штаммов GS-PCUP1-PHO5, GS-PCUP1-PHO5/PCUP1-ACE1 и PCUP1-PHO5/PAOX1-ACE1 при росте на среде с метанолом и 10 мМ Cu^{2+} . * — $p > 0,05$

Как видно из рисунка 3, имеет место значительное повышение активности промотора *PCUP1* во всех штаммах со сверхэкспрессией гена *ACE1*. Следует отметить, что быстрее эффект от сверхпродукции ТФ Ace1 достигался, когда его ген *ACE1* находился под контролем промотора *PAOX1* — в два раза уже на первые сутки культивирования. На вторые сутки активность КФ штамма GS-PCUP1-PHO5/PCUP1-ACE1 по сравнению с GS-PCUP1-PHO5 в среде возрастала примерно в 5 раз и была сравнима с активностью КФ штамма GS-PCUP1-PHO5/PAOX1-ACE1, где позитивный ТФ экспрессируется под сильным промотором *PAOX1*. На рисунке 4 показана активность КФ штаммов GS-PCUP1-PHO5/PGAP-ACE1, GS-PGAP-PHO5 и исходного штамма GS-PCUP1-PHO5 на среде с глицерином и 10 мМ Cu^{2+} .

Видно здесь, что даже при слабой в данных условиях активности промотора *PGAP* сверхэкспрессия под его контролем гена *ACE1* приводит к повышению активности промотора *PCUP1* в 18 раз. Это превышает 11-кратное увеличение при экспрессии *ACE1* под промотором *PAOX1*. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что значительного увеличения активности

промотора *PCUP1* можно достичь сверхэкспрессией гена его позитивного ТФ — *Ace1* даже под управлением слабого промотора, а также при использовании схемы с обратной положительной связью.

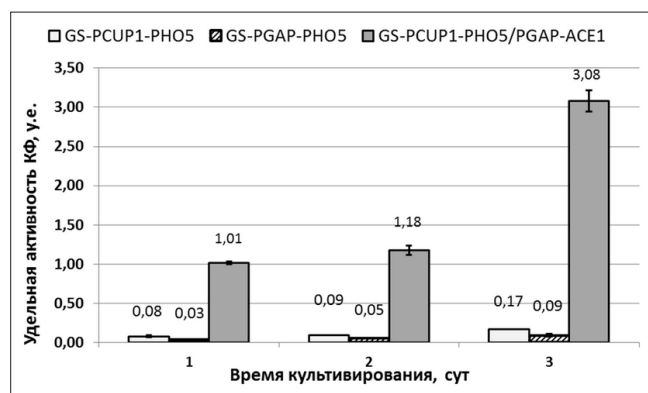


Рис 4. Удельная активность КФ штаммов GS-PCUP1-PHO5, GS-PCUP1-PHO5/PCUP1-ACE1 и PCUP1-PHO5/PAOX1-ACE1 при росте на среде с глицерином и 10 мМ Cu^{2+}

Чтобы оценить влияние сверхэкспрессии гена *ACE1* на промотор, не имеющий сайтов связывания ТФ *Ace1* (*PGAP*), мы измерили активность КФ штамма GS-PGAP-PHO5/PGAP-ACE1 на третьи сутки культивирования на среде с глицерином. Активность штамма оказалась на 60% выше, чем у контрольного. Известно взаимодействие *Ace1* у дрожжей *S. cerevisiae*, по крайней мере с восемью белками, среди которых *Alg5* — белок, участвующий в гликозилировании, *Yra1* — РНК-связывающий белок, участвующий в процессах метаболизма пре-мРНК и экспорте мРНК, *Rpb10* — субъединица РНК-полимеразы I, II, III [14]. Возможно, что при его сверхпродукции *Ace1* взаимодействует с ортологами этих белков в *P. pastoris*, что приводит к изменениям в метаболизме клетки, которые могут позитивно влиять на синтез целевого белка.

Чтобы ответить на вопрос, может ли подход с потенциальной положительной обратной связью (см. рис. 1) быть применим для конститутивного промотора, в частности, *PGAP*, мы использовали штаммы GS-PGAP-PHO5 и GS-PGAP-PHO5/PGAP-GAL4L. Ранее *Ata Ö. et al.* [5] показали, что сверхпродукция фактора Gal4I позитивно влияет на активность промотора *PGAP*. В литературе можно найти примеры, когда продуктивность системы на основе промотора *PGAP* максимальна на глицерине [9], на глюкозе [11], а также существенно не зависит от источника углерода (глицерина или глюкозы) при его избытке [5]. Поэтому чтобы оценить и влияние источника углерода, мы выращивали дрожжи на средах

с глицерином, глюкозой и метанолом. Полученные значения активности КФ штаммов GS-PGAP-PHO5 и GS-PGAP-PHO5/PGAP-GAL4L представлены на рисунке 5.

Видно, что в штамме со сверхэкспрессией гена *PpGAL4L* под контролем промотора *PGAP* активность КФ возросла в 3,4 раза на среде с глицерином, в 2,4 раза — на среде с глюкозой и в 2,2 раза — на среде с метанолом. При этом на среде с глицерином эффект оказался большим, чем от сверхэкспрессии ТФ Gal4I при дупликации сайтов связывания в промоторе *PGAP*, при котором увеличение активности промотора достигало 2,4 раз [5].

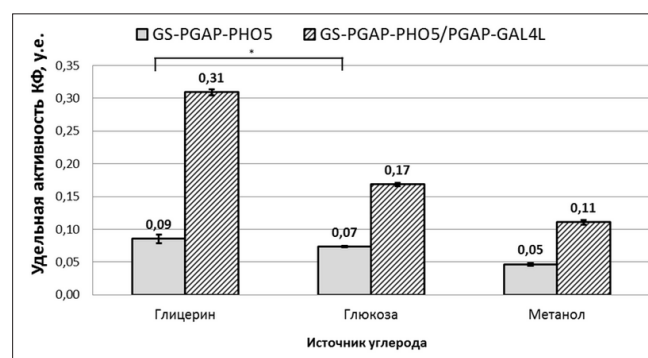


Рис 5. Удельная активность КФ штаммов GS-PGAP-PHO5 и GS-PGAP-PHO5/PGAP-GAL4L при росте на средах с разными источниками углерода (на третьи сутки культивирования). * — $p > 0,05$

Данные о том, что активность промотора *PGAP* при сверхпродукции Gal4I выше на среде с глицерином, позволяют говорить об участии этого ТФ у дрожжей *P. pastoris* не только в регуляции гликолиза, но и в регуляции катаболизма глицерина.

Заключение

В ходе настоящей работы мы показали, что транскрипционный фактор *Ace1* дрожжей *S. cerevisiae* сохраняет функциональность в дрожжах *P. pastoris*. Сверхэкспрессия его структурного гена *ACE1* даже под относительно слабым в данных условиях промотором *PGAP* увеличивает активность промотора *PCUP1* в 15 и более раз. Сверхпродукция *Ace1* также повышала активность промотора *PGAP*, который не содержит сайты его связывания, что еще раз свидетельствует о широких функциях данного ТФ в клетке дрожжей *P. pastoris*.

ТФ Gal4I, структурный ген которого клонирован под контролем относительно слабого в данных условиях промотора, при использовании схемы с потенциальной

положительной обратной связью увеличивал активность промотора *PCAP* в 3,4 раза. Это превышает значения, полученные в работе Ata Ö. et al, (2017) с введением дополнительных сайтов связывания ТФ в *PCAP* [5].

Как в случае индуцируемого промотора *PCUP1*, так и конститутивного *PCAP*, сверхэкспрессия структурных генов их позитивных ТФ увеличивает активность промоторов, однако степень проявления такого эффекта может быть различна вследствие зависимости от состава среды культивирования. Силу промотора *PCAP* в случае сверхэкспрессии его позитивного ТФ можно более тонко регулировать источником углерода в среде.

Увеличение продукции гетерологичного белка за счет повышения активности промотора, контролирующего экспрессию его структурного гена, кажется предпочтительнее по сравнению с повышением числа копий структурного гена. В последнем случае, во-первых, нужно добиться множественной встройки вектора, а во-вторых, при длительном культивировании продуцентов часть копий клонированных генов может теряться. При наличии хорошо изученных промоторов и их известных положительных ТФ представленный подход может в разы увеличить активность промотора и внести весомый вклад в итоговую продукцию гетерологичного белка.

Литература

1. Градобоева А.Е., Падкина М.В. Изучение влияния продукции гетерологичного белка на физиологическое состояние дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris* // Вестник СПбГУ. — 2008. — Т. 3(2). — С. 58–63.
2. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Ред. А.А. Баев, К.Г. Скрыбин. Пер с англ. изд. 1982. — М.: Мир, 1984. — 480 с.
3. Падкина М.В., Краснопецева Н.Г., Петрашень М.Г., и др. Генетико-биохимическое изучение кислых фосфатаз дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Характеристика кислых фосфатаз разных штаммов // Генетика. — 1974. — Т. X. — № 10. — С. 100–110.
4. Ahmad M., Hirz M., Pichler H., et al. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2014. — Vol. 98(12). — P. 5301–5317. doi: 10.1007/s00253-014-5732-5.
5. Ata Ö., Prielhofer R., Casser B., et al. Transcriptional engineering of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter for improved heterologous protein production in *Pichia pastoris* // Biotechnol. Bioeng. — 2017. — Vol. 114(10). — P. 2319–2327. doi: 10.1002/bit.26363.
6. Ata Ö., Rebnegger C., Tatto N.E., et al. A single Gal4-like transcription factor activates the Crabtree effect in *Komagataella phaffii* // Nature Communications. — 2018. — Vol. 9. — Article number: 4911. doi: 10.1038/s41467-018-07430-4.
7. Butt T.R., Sternberg E.J., Gorman J.A., et al. Copper metallothionein of yeast, structure of the gene, and regulation of expression // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1984. — Vol. 81(11). — P. 3332–3336. doi: 10.1073/pnas.81.11.3332.
8. Chang C.H., Hsiung H.A., Hong K.L., Huang C.T. Enhancing the efficiency of the *Pichia pastoris* AOX1 promoter via the synthetic positive feedback circuit of transcription factor Mxr1 // BMC Biotechnol. — 2018. — Vol. 18(1). — P. 81. doi: 10.1186/s12896-018-0492-4.
9. Chen Q., Zhou Y., Yu J., et al. An efficient constitutive expression system for Anti-CEACAM5 nanobody production in the yeast *Pichia pastoris* // Protein Expr. Purif. — 2019. — Vol. 155. — P. 43–47. doi: 10.1016/j.pep.2018.11.001.
10. Coyle P., Philcox J.C., Carey L.C., Rofe A.M. Metallothionein: the multipurpose protein // Cell Mol. Life Sci. — 2002. — Vol. 59(4). — P. 627–647. doi: 10.1007/s00018-002-8454-2.
11. Faridi S., Satyanarayana T. Thermo-alkali-stable α -carbonic anhydrase of *Bacillus halodurans*: heterologous expression in *Pichia pastoris* and applicability in carbon sequestration // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. — 2018. — Vol. 25(7). — P. 6838–6849. doi: 10.1007/s11356-017-0820-6.
12. Hottiger T., Fürst P., Pohlig G., Heim J. Physiological characterization of the yeast metallothionein (CUP1) promoter, and consequences of overexpressing its transcriptional activator, ACE1 // Yeast. — 1994. — Vol. 10(3). — P. 283–296. doi: 10.1002/yea.320100302.
13. Koller A., Valesco S., Subramani S. The CUP1 promoter of *Saccharomyces cerevisiae* is inducible by copper in *Pichia pastoris* // Yeast. — 2000. — Vol. 16(7). — P. 651–656. doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(200005)16:7<651::AID-YEA580>3.0.CO;2-F.
14. mint.bio.uniroma2.it/index.php/results-interactions/?id=P15315.
15. Pichia Technology from RCT. Available from www.pichia.com/science-center/commercialized-products.
16. Plaza S., Dozier C., Saule S. Quail Pax-6 (Pax-QNR) encodes a transcription factor able to bind and trans-activate its own promoter // Cell Growth Differ. — 1993. — Vol. 4(12). — P. 1041–1050.
17. Rumjantsev A.M., Padkina M.V., Sambuk E.V. Effect of nitrogen source on gene expression of first steps of methanol utilization pathway in *Pichia pastoris* // Russ. J. Genet. — 2013. — Vol. 49(4). — P. 394–400. doi: 10.1134/S102279541304011X.
18. Schwarzhans J.P., Luttermann T., Geier M., et al. Towards systems metabolic engineering in *Pichia pastoris* //

- Biotechnol. Adv. — 2017. — Vol. 35(6). — P. 681–710. doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.07.009.
19. Strain J., Culotta V.C. Copper ions and the regulation of *Saccharomyces cerevisiae* metallothionein genes under aerobic and anaerobic conditions // Mol. Gen. Genet. — 1996. — Vol. 251(2). — P. 139–145.
 20. Vogl T., Sturmberger L., Fauland P.C., et al. Methanol independent induction in *Pichia pastoris* by simple derepressed overexpression of single transcription factors // Biotechnol. Bioeng. — 2018. — Vol. 115(4). — P. 1037–1050. doi: 10.1002/bit.26529.
 21. Wang J., Wang X., Shi L. et al. Methanol-independent protein expression by AOX1 promoter with trans-acting elements engineering and glucose-glycerol-shift induction in *Pichia pastoris* // Sci. Rep. — 2017. — Vol. 7. — Article number: 41850. doi: 10.1038/srep41850.
 22. Waterham H.R., Digan M.E., Koutz P.J., et al. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter // Gene. — 1997. — Vol. 186(1). — P. 37–44. doi: 10.1016/s0378-1119(96)00675-0.
 23. Wu S., Letchworth G.J. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol // BioTechniques. — 2004. — Vol. 36(1). — P. 152–154. doi: 10.1186/1472-6750-7-15.
 24. www.yeastgenome.org/locus/S000003134/regulation#overview.
 25. Zahrl R., Peña D., Mattanovich D., et al. Systems biotechnology for protein production in *Pichia pastoris* // FEMS Yeast Res. — 2017. — Vol. 17(7). doi: 10.1093/femsyr/fox068.

THE EFFECT OF OVERPRODUCTION OF TRANSCRIPTION FACTORS Ace1 AND Gal4I ON THE ACTIVITY OF PROMOTERS OF THE *SCCUP1* AND *PPGAP* GENES IN *PICHIA PASTORIS* YEAST

M.A. TSYGANKOV, M.V. PADKINA

St. Petersburg State University, St. Petersburg

Pichia pastoris yeast strains were obtained with overexpression of the genes for positive transcription factors Ace1 and Gal4I under the control of the *PAOX1*, *PCUP1*, and *PGAP* promoters. It was shown that the transcription factor Ace1 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* retains functionality in *P. pastoris* yeast. Overexpression of the Ace1 and Gal4I transcription factor genes, regardless of the strength of their controlling promoters, led to a significant increase in the activity of *PCUP1* and *PGAP* promoters.

Keywords: *P. pastoris* yeast, regulation of promoters, transcription factors, Ace1, Gal4, *PGAP*, *PCUP1*.

ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИЕ АРОМАТИЧЕСКИЕ УГЛЕВОДОРОДЫ В ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЯХ БАРЕНЦЕВА И КАРСКОГО МОРЕЙ

И.С. ХАЛИКОВ*

ФГБУ «Научно-производственное объединение «Тайфун», Обнинск Калужской области

Приводятся результаты 2016 года по определению содержания бенз(а)пирена и полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) в донных отложениях лицензионных участков Баренцева и Карского морей с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии. При использовании метода пробоподготовки QuEChERS степень извлечения ПАУ из донных отложений составила 80–95%. Для оценки применимости предложенного метода определения ПАУ проанализированы 122 пробы донных отложений арктических морей. Среднее содержание бенз(а)пирена в обследованных районах Баренцева моря (8,7 нг/г, n=52) было больше в 10 раз, чем в Карском (0,9 нг/г, n=70). Минимальные концентрации ПАУ определены в песчаных отложениях Карского моря. Выявлены корреляционные зависимости содержания органического углерода и ПАУ. Уровни загрязнения донных отложений ПАУ обследуемых районов арктических морей относительно невысоки и указывают на более высокую антропогенную нагрузку на Баренцево море, по сравнению с Карским морем.

Ключевые слова: ПАУ, донные отложения, ВЭЖХ, Баренцево море, Карское море.

Введение

Исследование Арктики приобрело в настоящее время особую остроту и актуальность в связи с тем, что на российском арктическом шельфе началось освоение нефтегазовых месторождений. Нефтегазовые месторождения шельфа и прибрежной зоны Баренцева и Карского морей являются важнейшим стратегическим ресурсом, во многом определяющим перспективы развития Арктической зоны Российской Федерации в XXI веке [3]. Для условий арктических морей, помимо экономической эффективности, при реализации проектов разработки ресурсов нефти и газа необходимо обеспечить также их экологическую безопасность.

Важнейшую группу органических загрязнителей окружающей среды, в том числе морской среды, составляют полициклические ароматические углеводороды (ПАУ, полиарены), которые состоят из двух или более конденсированных ароматических колец. Они представляют опасность для экосистем с точки зрения их содержания, устойчивости к химической и биологической трансформации, способности к аккумуляции в

объектах природной среды, трансграничного переноса и повсеместного распространения и токсикологических характеристик [8, 11, 17–19, 21, 27].

Источники поступления ПАУ (пирогенные и петрогенные) в объекты природной среды достаточно многочисленны, и этим обусловлено присутствие во всех объектах природной среды [11, 12, 14, 27].

Большая часть высокомолекулярных ПАУ (от 4 до 6 конденсированных колец, молекулярная масса более 200), в отличие от низкомолекулярных ПАУ (2–3 кольца), обладают выраженным канцерогенным, мутагенным и тератогенным действием [11, 19, 18, 27], и поэтому они должны находиться под постоянным контролем. Из сотен ПАУ, обнаруженных в объектах природной среды, в список приоритетных загрязнителей по требованиям ЕС (Европейского сообщества) и US EPA (Агентства по охране окружающей среды, США) включены 16 соединений [18, 19]. Наиболее токсичный бенз(а)пирен (BaP) является общепринятым индикаторным представителем для всего профиля ПАУ [6, 27].

Наблюдения за загрязнением донных отложений являются неотъемлемой частью мониторинга состояния водных сред. Формирование донных отложений происходит в результате взаимодействия разнообразных процессов: механических, гидрологических, климатических, физико-химических и биологических, протекающих как на водосборной площади, так и в самих водных объектах [4, 15]. В результате процессов седиментации и биоседиментации ПАУ аккумулируются в донных осадках, где

© 2020 г. Халиков И.С.

* **Автор для переписки:**

Халиков Ильдус Салихович

Кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-производственное объединение «Тайфун» (ФГБУ «НПО «Тайфун»)

E-mail: Khalikov@rpatyphoon.ru

их содержание на порядки больше, чем в водной среде. В отличие от воды донные отложения отражают не текущее, а накопленное за длительный период загрязнение.

Длительность существования ПАУ в донных отложениях зависит как от интенсивности их поступления, физико-химических свойств, так и характеристики самих донных отложений, характера дна, содержания питательных веществ и температуры [2, 10]. Самоочищение донных отложений может происходить за счет естественных биотических и абиотических процессов, таких как окисление, гидролиз и биodeградация. В аэробных условиях активизируется трансформация ПАУ, в анаэробных условиях они более устойчивы, при этом высокомолекулярные соединения меньше подвержены разложению.

Контроль ПАУ в донных отложениях из-за присутствия в них липидов, углеводов, пигментов, лигнина, гуминовых и фульвокислот, а также большого числа других соединений представляется довольно сложной задачей. Для определения ПАУ чаще всего используются современные методы аналитической химии с высокой селективностью и чувствительностью, такие как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с флуориметрическим детектированием и газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС) [1, 5, 9, 23].

Традиционные методы пробоподготовки, включая жидкостную и твердофазную экстракцию, могут занимать много времени, трудоемки и требуют больших количеств растворителей. Одним из альтернативных и универсальных методов подготовки проб, позволяющим извлечь разные классы органических загрязнителей из матриц, служит метод QuEChERS [20], сокращение от достоинств метода (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe – Быстрый, Простой, Дешевый, Эффективный, Надежный, Безопасный). В общем случае пробоподготовка QuEChERS включает в себя два этапа: экстракцию гомогенизированной пробы ацетонитрилом в присутствии высаливателей и буферирующих смесей (сульфата магния, хлорида натрия, цитратов и ацетата натрия) и очистку экстракта от соэкстрагируемых веществ – жиров, белков, сахаров, кислот, пигментов, лигнина и других примесей, методом дисперсионной твердофазной экстракции с помощью различных сорбентов, например, гидрофобного силикагеля с октадецильной фазой (C₁₈), PSA (Primary Secondary Amine) с привитой этилендиамин-N-пропильной группой, GCB (активированного угля) и других [16]. В последнее время область применения этого метода пробоподготовки продолжает

расширяться, поскольку метод можно оптимизировать для определения разных соединений [13, 22, 25].

Целью настоящей работы являлась оценка уровней содержания бенз(а)пирена и других ПАУ в донных отложениях лицензионных участков Баренцева и Карского морей с использованием метода ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием.

Материалы и методы

Материалом для исследований являлись пробы донных отложений Баренцева (52 пробы, глубины > 100 м) и Карского (70 проб) морей, которые были отобраны в июне-октябре 2016 г. во время экспедиционных работ ММБИ КНЦ РАН и ФГБНУ «ПИНРО» (г. Мурманск). Отбор проб проводили на лицензионных участках (ЛУ) Баренцева моря: Демидовского – n (количество проб) = 6, Ферсмановского (n=15), Медвежьего (n=10), Лудловского (n=15), Ледового (n=6) и ЛУ Карского моря – Северо-Харасавэйского (n=43) и Шарাপовского (n=27). Расположение лицензионных участков месторождений углеводородов и мест отбора проб приведено на рисунке 1.



Рис. 1. Картограмма расположения мест отбора донных отложений в Баренцевом и Карском морях, 2016 г.; 1 – Демидовский ЛУ, 2 – Ферсмановский ЛУ, 3 – Медвежий ЛУ, 4 – Лудловский ЛУ, 5 – Ледовый ЛУ, 6 – Северо-Харасавэйский ЛУ, 7 – Шарাপовский ЛУ

Пробы донных отложений были взяты с помощью дночерпателя «Ван Вина» с ненарушенного поверхностного слоя осадков (0–2 см), высушены при температуре не более 40 °С, растерты в ступе до гомогенного порошка и просеяны через сито диаметром 1 мм.

Пробоподготовка для ВЭЖХ. Оптимизированы основные параметры подготовки проб донных отложений с применением QuEChERS: выбраны масса образца, экстрагент и его объем, время извлечения, природа и количества сорбентов. При определении ПАУ в холостых пробах выявлено мешающее влияние различных добавок (высаливателей, буферов и сорбентов) на его содержание. Выделение ПАУ из донных отложений (1–2 г) проводили с использованием 10 мл ацетонитрила под действием ультразвука (5 мин; 25 °С). Экстракт (4 мл) центрифугировали (5 мин; 5000 об/мин), затем в 3 мл раствора добавляли 300 мг безводного сульфата магния и около 50 мг слабоосновного сорбента PSA и встряхивали 2 мин, далее экстракт снова центрифугировали (5 мин; 5000 об/мин) и аликвоту вводили в хроматографическую систему для разделения компонентов.

Оборудование. Для идентификации и количественного определения ПАУ использовали метод ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием (детектор «RF-20A»). Измерения проводили на хроматографе «LC-20 Prominence» (Shimadzu), состоящего из вакуумного дегазатора DGU-20A₃, насоса LC-20AD, автосамплера SIL-20A и термостата СТО-20А, с колонкой Envirosep RP (125×3,2 мм, 5 мкм) и защитным картриджем C18 (4×2 мм) производства фирмы Phenomenex в условиях градиентного элюирования смесью ацетонитрила и воды от 70 до 90%, при скорости потока 0,75 мл/мин и температуре колонки 40 °С. Объем ввода аликвоты – 10 мкл. С помощью программного обеспечения «LC Solution» устанавливали оптимальные длины волн возбуждения и эмиссии. В качестве градуировочных стандартов применяли стандартные растворы индивидуальных ПАУ и их смесей производства фирмы «Supelco» и «Dr.

Ehrenstorfer GmbH». В качестве аналитического сигнала использовали площадь пика.

Степень извлечения ПАУ по методу «введено-найденно» составляла от 80 до 95%, значительных матричных эффектов не наблюдалось. Интервал определения массовой концентрации ПАУ в донных отложениях составлял от 0,01 до 100 нг/г для разных соединений. Методика обеспечивала выполнение измерений с погрешностью, не превышающей 40%, при доверительной вероятности 0,95.

Гранулометрический анализ донных отложений выполняли методом лазерной дифракции с помощью анализатора размера частиц SALD-2300 (Shimadzu). Органический углерод определяли методом сухого сжигания с использованием анализатора углерода TOC-L CSN и приставки SSM-5000A (Shimadzu).

Результаты и обсуждение

Анализ гранулометрического состава показал преобладание алевритовых фракций (0,01–0,10 мм) над пелитовыми (размер частиц <0,01 мм) в донных отложениях обследуемых районов Карского и Баренцева морей. Среднее содержание алевритовых фракций на ЛУ для двух морей составляло около 60%, а пелитовых фракций – 21%.

Одна из существенных характеристик донных отложений заключается в содержании органического вещества, которое оценивали по количеству общего органического углерода ($C_{орг}$).

Результаты по среднему содержанию органического углерода ($C_{орг}$), бенз(а)пирена и суммы ПАУ, а также интервалам их значений в донных отложениях обследованных лицензионных участков Баренцева и Карского морей в 2016 г. приведены в таблице 1.

Таблица 1

Содержание бенз(а)пирена и суммы ПАУ в донных отложениях лицензионных участков Баренцева и Карского морей, 2016 г.

Лицензионный участок, количество проб (n)	Среднее содержание $C_{орг}$, интервал, %	Среднее содержание ВаР, интервал, нг/г	Среднее содержание ПАУ, интервал, нг/г
	Баренцево море		
Демидовский ЛУ, n=6	1,70 (1,29–1,84)	8,5 (6,0–10,9)	131 (97,5–155)
Ферсмановский ЛУ, n=15	1,35 (0,69–2,55)	10,3 (4,0–17,3)	163 (66,2–259)
Медвежий ЛУ, n=10	2,43 (1,66–3,19)	8,8 (6,1–12,1)	161 (114–218)
Лудловский ЛУ, n=15	1,86 (0,40–2,93)	7,1 (2,0–13,4)	132 (36,2–239)
Ледовый ЛУ, n=6	2,42 (1,60–3,23)	8,3 (4,5–12,0)	155 (89,3–212)
Среднее, n=52	1,87 (0,40–3,23)	8,7 (2,0–17,3)	149 (36,2–260)
Карское море			
Северо-Харасавэйский ЛУ, >50 м, n=29	0,81 (0,46–1,04)	1,4 (0,7–2,5)	45,1 (20,0–65,1)
Шараповский ЛУ, >50 м, n=9	0,58 (0,33–0,97)	1,8 (0,6–4,1)	41,5 (15,2–97,4)
Северо-Харасавэйский ЛУ, <50 м, n=14	0,17 (0,06–0,34)	0,12 (0,01–0,5)	4,5 (1,4–11,1)
Шараповский ЛУ, <50 м, n=18	0,10 (0,03–0,26)	0,08 (0,02–0,3)	3,4 (0,9–9,5)
Среднее, >50 м, n=38	0,75 (0,33–1,04)	1,5 (0,6–4,1)	44,3 (15,2–97,4)
Среднее, <50 м, n=32	0,13 (0,03–0,34)	0,10 (0,01–0,5)	3,9 (0,9–11,1)

Среднее содержание $C_{\text{орг}}$ на лицензионных участках в Баренцевом море было в 2,5 раза больше, чем в Карском море, с глубинами >50 м и больше чем на порядок — с глубинами <50 м. Содержание $C_{\text{орг}}$ увеличивалось в более глубоководных местах с преобладанием мелкодисперсных фракций в условиях ослабления гидродинамической активности. Минимальные величины $C_{\text{орг}}$ зафиксированы в песках Карского моря с преобладанием фракции ($d > 0,1$ мм). Содержание $C_{\text{орг}}$ в донных отложениях обследуемых ЛУ Баренцева и Карского морей было тесно связано с их гранулометрическим составом.

В пробах донных отложений были идентифицированы и количественно определены в порядке выхода на хроматограммах следующие ПАУ: сумма аценафтена (ACNF) и флуорена (FL), фенантрен (PHEN), антрацен (ANTR), флуорантен (FLT), пирен (PYR), бенз(а)антрацен (BaA), хризен (CHR), бенз(е)пирен (BeP), бенз(б)флуорантен (BbF), бенз(к)флуорантен (BkF), бенз(а)пирен (BaP), дибенз(а,һ)антрацен (DBahA), бенз(ɡ,һ,і)перилен (BPL), инден[1,2,3-с,д]пирен (INP). Суммарная концентрация ПАУ в работе представлена как сумма 15 полиаренов (от 3 до 6 конденсированных колец).

На рисунке 2 приведены профили среднего содержания ПАУ в донных отложениях ЛУ Баренцева и Карского морей. Показаны более высокие концентрации полиаренов в Баренцевом море по сравнению с Карским морем. Было выявлено, что в донных отложениях Баренцева моря значительную роль играют высокомолекулярные ПАУ.

На рисунке 2 приведены профили среднего содержания ПАУ в донных отложениях ЛУ Баренцева и Карского морей. Показаны более высокие концентрации полиаренов в Баренцевом море по сравнению с Карским морем. Было выявлено, что в донных отложениях Баренцева моря значительную роль играют высокомолекулярные ПАУ.

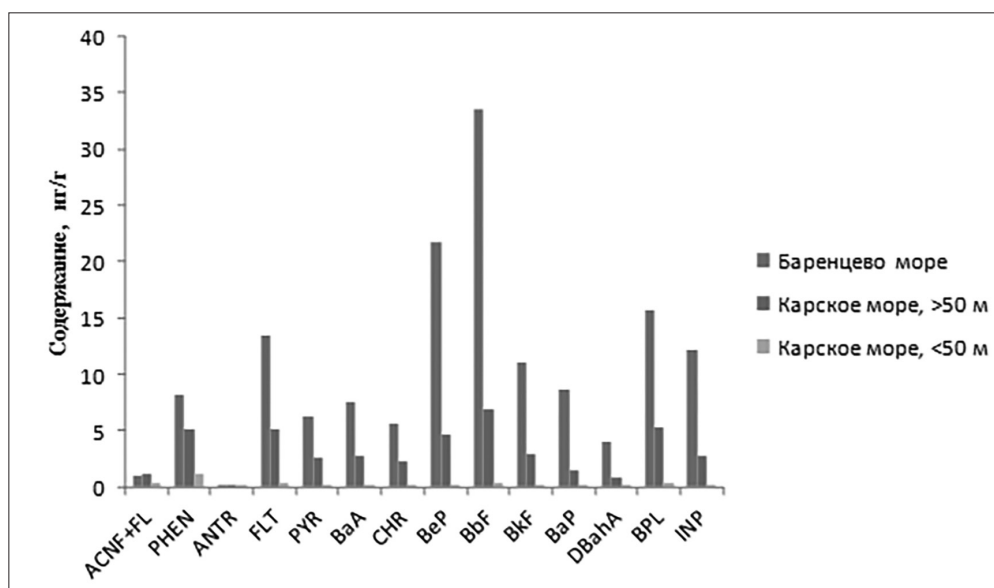


Рис. 2. Среднее содержание ПАУ в донных отложениях Баренцева и Карского морей, 2016 г.

Исследование особенностей профиля среднего содержания ПАУ в донных отложениях ЛУ Баренцева моря (рис. 3) показало, что значения варьируют в определенных пределах, оставаясь примерно на одном уровне. В Карском море наблюдалась такая же картина (рис. 4). Близкое содержание ПАУ в донных отложениях между ЛУ Баренцева моря и участков Карского моря свидетельствует о сходстве условий осадконакопления и преобразования органического вещества.

Согласно общей литогеохимической закономерности, с увеличением содержания пелитовой фракции с глубиной илистые осадки должны содержать ПАУ в большей степени, чем песчаные отложения.

По результатам обследования донных отложений 2016 г., максимальная концентрация бенз(а)пирена (17,3

нг/г) и суммы ПАУ (260 нг/г) были обнаружены в одной из проб ила Ферсмановского ЛУ Баренцева моря. Минимальные концентрации бенз(а)пирена (0,01–0,02 нг/г) определены в пробах песков участков Карского моря с глубинами менее 50 м. По результатам обследования 2016 г., установлено, что среднее содержание BaP в донных отложениях обследуемых участков Баренцева моря было больше в 5,8 раз по сравнению с ЛУ Карского моря с глубинами >50 м и почти на два порядка — с глубинами менее 50 метров.

Полученные нами результаты содержания ПАУ в донных отложениях Баренцева и Карского морей в 2016 г. сопоставимы с данными работы [24], в которой было показано, что в южной и центральной части Баренцева моря содержание ПАУ составляло 20–400 нг/г, в Карском море — от 6 до 90 нг/г.

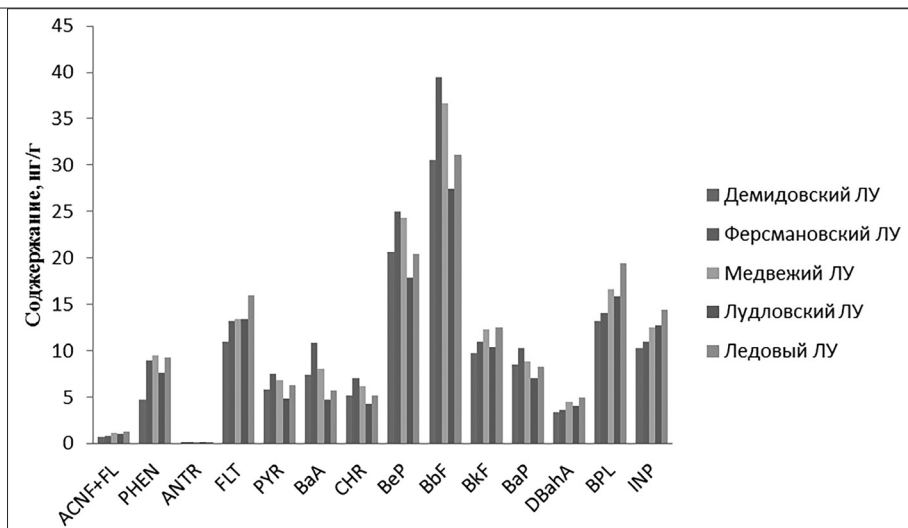


Рис. 3. Среднее содержание ПАУ в донных отложениях Баренцева моря, 2016 г.

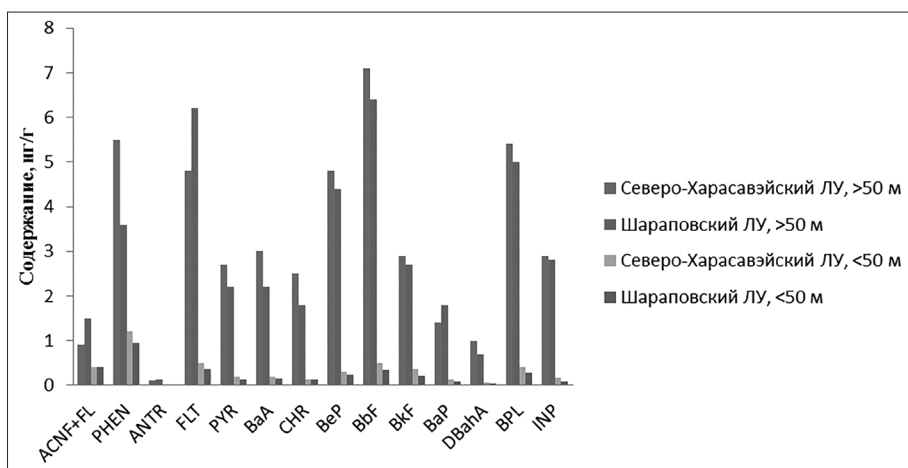


Рис. 4. Среднее содержание ПАУ в донных отложениях ЛУ Карского моря на глубинах больше и меньше 50 м, 2016 г.

Среднее содержание бенз(а)пирена от суммы 15 идентифицируемых ПАУ в донных отложениях Баренцева моря (6,0%) было примерно в два раза выше, чем в Карском море. Среднее содержание высокомолекулярных ПАУ (5–6 колец) на ЛУ Баренцева моря составляло 71,7% ($n=52$) и 54,6% на ЛУ Карского моря. Значительный уровень высокомолекулярных ПАУ, особенно в Баренцевом море, указывает на их техногенную природу.

Выявлены прямые корреляционные зависимости между содержанием ПАУ и органическим углеродом. Коэффициенты корреляции между содержанием $C_{\text{орг}}$ и бенз(а)пирена, а также суммы всех 15 ПАУ составляли соответственно 0,5 и 0,68 в донных отложениях ЛУ Баренцева моря ($n=52$) и 0,84; 0,92 в отложениях Карского моря ($n=70$) соответственно. Органическое вещество играет значимую роль в аккумуляции в донных отложениях ПАУ.

Содержание бенз(а)пирена и других ПАУ в настоящее время в донных отложениях российскими нор-

мативными документами не регламентируется. В связи с отсутствием стандартов качества во многих странах часто используют значения, принятые в международных организациях, например, OSPAR, ICES [20]. Оценка загрязненности приоритетными ПАУ донных отложений обследуемых ЛУ Баренцева и Карского морей проводилась по шведской 5-уровневой классификации загрязненности донных отложений [20]. Согласно этой классификации, значительная часть проб донных отложений, отобранных на ЛУ Баренцева моря, относится к классу № 2 с «низкими» концентрациями ПАУ и несколько проб — к классу № 3 с «умеренными» концентрациями ПАУ. Основной вклад в загрязнение донных осадков по данной системе вносят низкомолекулярные ПАУ — флуорантен, пирен, бенз(а)антрацен, хризен. В обследуемых районах Карского моря все пробы донных отложений входят в класс № 2.

Анализ происхождения ПАУ представляет довольно сложную задачу. В основном, этот анализ сводит-

ся к идентификации источников загрязнения пирогенной или петрогенной природы [14, 24, 26, 28]. Для оценки происхождения использовали профили содержания ПАУ в донных отложениях Баренцева и Карского морей (см. рис. 2–4) и средние значения диагностических молекулярных соотношений, таких как высокомолекулярных ПАУ к низкомолекулярным ПАУ, FLT / (FLT + PYR), BaA / (BaA+CHR), INP / (INP+BPL), (FLT+PYR) / (PHEN+CHR) и (BaP+PYR) / (PHEN+CHR). ПАУ в донных отложениях обследуемых районов имеют чаще всего пирогенную природу, причем значения этих показателей соотношений в Баренцевом море были выше, чем в Карском море.

Заключение

Оптимизирован способ извлечения ПАУ из донных отложений с использованием методологии QuEChERS, исключающей стадию концентрирования, и определения методом ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием. Для модельных смесей по методу «введено-найдено» установлена степень извлечения ПАУ из донных отложений 80–95%. Этот метод пробоподготовки может служить альтернативой более сложным методикам.

Осуществлено количественное определение ПАУ в донных отложениях лицензионных участков Баренцева (52 пробы) и Карского морей (70 проб) методом ВЭЖХ. Минимальные концентрации бенз(а)пирена (0,01 нг/г) и других ПАУ определены в пробах песков лицензионных участков Карского моря с глубиной менее 50 м, а максимальные концентрации полиаренов (BaP – более 10 нг/г) – в более глубоководных илистых осадках Баренцева моря.

Концентрации ПАУ в донных отложениях обусловлены сорбционными свойствами осадков, наиболее высокое содержание отмечалось в мелкодисперсных донных отложениях, обладающих большей активной площадью поверхности и более высоким содержанием органического углерода.

Уровни загрязнения донных отложений ПАУ обследуемых районов арктических морей относительно невысоки и указывают на более высокую антропогенную нагрузку на Баренцево море, по сравнению с Карским морем. Определяющими факторами загрязнения являются трансграничный атмосферный и водный перенос ПАУ.

Необходимо проведение регулярных наблюдений за состоянием и загрязнением экосистем арктических морей и оценка изменений ПАУ, происходящих во времени.

Литература

1. Басова Е.М., Иванов В.М. Современное состояние высокоэффективной жидкостной хроматографии полициклических ароматических углеводородов // Вестник Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. – 2011. – Т. 52. – № 3. – С. 163–174.
2. Геннадиев А.Н., Тарусова О.В. ПАУ и нефтепродукты в донных осадках и почвах // Геохимия ландшафтов дельты Волги. Геология Прикаспия. – 1999. – Т. 3. – С. 123–131.
3. Глухарева Е.К. Перспективы добычи и транспортировки нефтегазовых ресурсов запада российской Арктики // Проблемы прогнозирования. – 2011. – № 5. – С. 65–75.
4. Даувальтер В.А. Геоэкология донных отложений озер. – Мурманск: Изд-во МГТУ, 2012. – 242 с.
5. Другов Ю.С., Родин А.А. Анализ загрязненной воды: практическое руководство. – М: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. – 678 с.
6. Израэль Ю.А., Цыбань А.В. Антропогенная экология океана. – Л.: Гидрометеиздат, 1989. – 528 с.
7. Ильин Г.В., Усягина И.С., Касаткина Н.Е. Геоэкологическое состояние среды морей российского сектора Арктики в условиях современных техногенных нагрузок // Вестник Кольского научного центра РАН. – 2015. – № 21. – С. 82–93.
8. Клар Э. Полициклические углеводороды: Пер. с англ. – М.: Химия, 1971. – 456 с.
9. Майстренко В.Н., Клюев Н.А. Эколого-аналитический мониторинг стойких органических загрязнителей. – М: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. – 328 с.
10. Миронов О.Г. Взаимодействие морских организмов с нефтяными углеводородами. – Л.: Гидрометеиздат, 1985. – 127 с.
11. Ровинский Ф.Я., Теплицкая Т.А., Алексеева Т.А. Фоновый мониторинг полициклических ароматических углеводородов. – Л.: Гидрометеиздат, 1988. – 224 с.
12. Суздорф А.Р., Морозов С.В., Кузубова Л.И., Анищ Н.Н., Анищ А.Г. Полициклические ароматические углеводороды в окружающей среде: источники, профили и маршруты превращения // Химия в интересах устойчивого развития. – 1994. – № 2. – С. 511–540.
13. Халиков И.С., Баранов В.И. Определение фенола в донных отложениях Баренцева и Карского морей с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии и флуориметрического детектора // Системы контроля окружающей среды. – 2018. – №12(32). – С. 65–70.
14. Халиков И.С. Идентификация источников загрязнения объектов природной среды полициклическими ароматическими углеводородами с использованием молекулярных соотношений // Экологическая химия. – 2018. – Т. 27. – № 2. – С. 76–85.
15. Янин Е.П. Техногенные геохимические ассоциации в донных отложениях малых рек (состав, особенности, методы оценки). – М.: ИМГРЭ, 2002. – 52 с.

16. Anastassiades M., Lehotay S.J., Stajnbaher D., Schenck F.J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and «dispersive solid-phase extraction» for the determination of pesticide residues in produce // J. AOAC Int. – 2003. – Vol. 86. – No. 2. – P. 412–431.
17. Bispo A., Jourdain M.J., Jauzein M. Toxicity and genotoxicity of industrial soils polluted by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) // Organic Geochemistry. – 1999. – Vol. 30. – No. 8. – P. 947–952.
18. EPA (Environmental Protection Agency U.S.). Development of a relative potency factor (RPF) approach for polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) mixtures. – Washington, DC, 2010. – 622 p.
19. IARC (International Agency for Research on Cancer). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. – Lyon, France, 2010. – Vol. 92. – 853 p.
20. ICES. Report of the ICES Advisory Committee on the Marine Environment, 2003. ICES Cooperative Research Report, 263. Annex 3: Inventory of sediment quality criteria in ICES member countries, 2003. – 227 p.
21. IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Nomenclature of fused and bridged fused ring systems // Pure and Appl. Chem. – 1998. – Vol. 70. No.1. – P. 143–216.
22. Padilla-Sánchez J.A., Plaza-Bolaños P., Romero-González R., Garrido-Frenich A., Vidal J.L.M. Application of a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe-based method for the simultaneous extraction of chlorophenols, alkylphenols, nitrophenols and cresols in agricultural soils, analyzed by using gas chromatography–triple quadrupole-mass spectrometry/mass spectrometry // Journal of Chromatography A. – 2010. – Vol. 1217. – P. 5724–5731.
23. Pandey S.K., Kim K.H., Brown R.J.C. A review of techniques for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in air // TrAC Trends in Analytical Chemistry. – 2011. – Vol. 30. – No.11. – P. 1716–1739.
24. Ravindra K., Sokhi R., Grieken R.V. Review: Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: source attribution, emissions factors and regulation // Atmospheric Environment. – 2008. – Vol. 42. – P. 2895–2921.
25. Rouviere F., Bulete A., Cren-Olive C., Arnaudguilhem C. Multiresidue analysis of aromatic organochlorines in soil by gas chromatography-mass spectrometry and QuEChERS extraction based on water/dichloromethane partitioning. Comparison with accelerated solvent extraction // Talanta. – 2012. – Vol. 93. – P. 336–344.
26. Tobiszewski M., Namiesnik J. PAH diagnostic ratios for the identification of pollution emission sources // Environmental Pollution. – 2012. – Vol. 162. – P. 110–119.
27. Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. – U.S. Department of Health and Human Services, 1995. – 457 p.
28. Yunker M.B., Macdonald R.W., Vingarzan R., Mitchell R.H., Goyette D., Sylvestre S. PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition // Organic Geochemistry. – 2002. – Vol. 33. – P. 489–515.

POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN THE BOTTOM SEDIMENTS OF BARENTS AND KARA SEAS

I.S. KHALIKOV

Research and Production Association «Typhoon», Obninsk Kaluga region

The results of 2016 on the content of benzo(a)pyrene and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the bottom sediments of licensed areas of the Barents and Kara seas using high-performance liquid chromatography are presented. A method for extracting PAHs from bottom sediments using the QuEChERS methodology is proposed. The degree of extraction of PAHs from bottom sediments was 80–95%. To assess the applicability of the proposed method for the determination of PAHs, 122 samples of bottom sediments of the Arctic seas were analyzed. The average content of benzo(a)pyrene in the surveyed areas of the Barents Sea (8,7 ng/g, n=52) was 10 times higher than in the Kara Sea (0,9 ng/g, n=70). The minimum concentrations of PAHs are determined in the sandy sediments of the Kara Sea. The correlation dependences of the content of organic carbon and PAH are revealed. Pollution levels of PAHs bottom sediments in the surveyed areas of the Arctic seas are relatively low and indicate a higher anthropogenic load on the Barents Sea compared to the Kara Sea.

Keywords: PAH, bottom sediments, HPLC, Barents Sea, Kara Sea.

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ЛИГНОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ, У ПРИРОДНЫХ ИЗОЛЯТОВ МИКРОМИЦЕТОВ

Е.А. БЕССОЛИЦЫНА*, Т.А. СКУДНОВА

Вятский государственный университет, Киров

В настоящей статье исследуются 26 природных изолятов микромицетов, выделенных из природных источников на территории Кировской области, на наличие генов, кодирующих основные ферменты лигнолитического комплекса (лакказы, лигнин-пероксидазы и марганец-пероксидазы), и активность синтезируемых ферментов. Выделенная ДНК образцов исследовалась на наличие генов, кодирующих основные ферменты лигнолитического комплекса, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Обнаружены изоляты, у которых выявлены продукты амплификации генов, кодирующих лигнолитические ферменты. Фрагменты генов лакказы были найдены у 11 изолятов, лигнин-пероксидазы — у 13, марганец-пероксидазы — у 8 изолятов. У 12 изолятов генов лигнолитических ферментов выявлено не было. В результате работы были обнаружены 7 изолятов грибов с генами, кодирующими все три исследуемых лигнолитических фермента: *Mucor* spp. (1), *Trichoderma* spp. (5, 1.2, 18), *Trichoderma viridae* (3.1), *Trichoderma hamatum* (3.2) и *Aspergillus* spp. (6.2); среди них 5 относятся к одному роду (*Trichoderma*). Была проведена их проверка на ферментативную активность путем посева изолятов на индикаторные среды Чапека с добавлением гваякола и танина и с последующим измерением зон затемнения, определяющих степень активности гриба продуцировать ферменты лигнолитического комплекса. В результате исследования были отобраны *Trichoderma viridae* и *Trichoderma hamatum*, несущие генетические детерминанты лигнолитических ферментов и являющиеся наиболее активными на индикаторных средах. Данные изоляты перспективны для дальнейшего изучения как продуценты ферментов лигнолитического комплекса. Гены указанных ферментов впервые обнаружены у *Mucor* spp.

Ключевые слова: лигнин, микромицеты, гены лигнолитического комплекса, лакказа, лигнин-пероксидаза, марганец-зависимая пероксидаза, идентификация, изоляты, индикаторные среды, биodeградация, лигнолитическая ферментативная активность, полимеразная цепная реакция, город Киров, Кировская область.

Введение

Основными материалами клеточных стенок древесины являются целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнин — одни их самых распространенных компонентов органического вещества на Земле. Эти биополимеры распределяются в толще клеточной стенки растений неравномерно, что определяется ее ультратонкой структурой [13].

Химическая структура лигнина отличается сложностью и многообразием мономерного состава и типов связи. Он представляет собой сложный (сетчатый) ароматический природный полимер и в древесине составляет ее негидролизующую часть [7], которую необходимо удалять при очистке целлюлозы. В связи с этим возрос интерес к исследованию пероксидаз, выделение и изучение которых создает новые направления в биотехнологии.

Также толчок к их развитию дало подтверждение способности пероксидаз окислять лигноподобные вещества [1].

К ферментам лигнолитического комплекса относятся: флавинодержащие ферменты (глюкозооксидазы, пиранозо-2-оксидазы, метанолоксидазы, арилалкогольоксидазы) [14], гем-содержащие ферменты (лигнин-пероксидаза и марганец-зависимая пероксидаза) [13] и медьсодержащие ферменты (глиоксальоксидаза, галактооксидаза) [3]. Но основными являются лакказа, Mn^{2+} -зависимая пероксидаза и лигнин-пероксидаза [16].

Лакказа (КФ 1.10.3.2) относится к группе медьсодержащих оксидаз и участвует в реакциях окисления производных фенола. Данные ферменты представляют собой мономерные, димерные или тетрамерные белки, которые содержат по четыре атома меди [22] и имеют молекулярные массы, варьирующие в пределах 40–140 кДа. До сих пор не выяснена ее роль в делигнификации растительных остатков. Но есть предположение, что лакказа окисляет продукты деполимеризации лигнина, а не саму молекулу, что обусловлено ее способностью к окислению низкомолекулярных фенольных компонентов.

© 2020 г. Бессолицына Е.А., Скуднова Т.А.

* Автор для переписки:

Бессолицына Екатерина Андреевна,
канд. биол. наук, доцент кафедры микробиологии Вятского государственного университета
E-mail: bess2000@mail.ru

Лигнин-пероксидаза (КФ 1.11.1.14) молекулярной массой 39–42 кДа относится к группе фенолоксидаз и обладает высокой окислительной способностью, катализирует окисление полифенолов, диаминов, гетероциклических, алициклических соединений [12]. Данный фермент представляет собой гликозилированный односубъединичный белок, содержащий гем. Лигнин-пероксидаза в присутствии пероксида катализирует окисление ароматических нефенольных структур лигнина с образованием радикалов арил-катиона [21].

Еще один представитель лигнолитического комплекса — марганец-пероксидаза (КФ 1.11.1.3). Это односубъединичный, гемсодержащий белок, имеющий молекулярную массу, равную 46 кДа, в присутствии перекиси водорода окисляет фенольные соединения и участвует в деполяризации синтетического лигнина. Активность фермента проявляется в среде с содержанием марганца. В ходе сопряженной реакции распада перекиси водорода осуществляется регенерация марганца [6, 8]. Происходит окисление фенольных и аминоксидных соединений с образованием феноксильных радикалов и аминоксидных радикалов соответственно [20].

Благодаря способности к разложению лигниноподобных соединений ферменты лигнолитического комплекса применяются в биодеструкции биополимеров и ксенобиотиков, разложении отходов сельского хозяйства, очистке сточных вод целлюлозно-бумажного производства, в текстильной промышленности и медицине [17]. Их основными продуцентами являются базидиомицеты родов *Trametes*, *Phanerochaete* [19]. Общеизвестно, что процесс их культивирования продолжителен в связи с низкой скоростью роста биомассы грибов, тогда как скорость роста микромицетов достаточно высокая, поскольку их развитые ферментативные системы позволяют им усваивать различного рода субстраты [10].

В ходе исследований превращения растительного сырья было показано, что использование микромицетов и их ассоциаций в твердофазной ферментации устанавливает значения «общей эффективности» биоконверсии в пределах от 9,3 до 99%. Это означает, что существует потенциал дальнейшего развития и модификации технологического процесса твердофазной ферментации [4]. В связи с этим становится обоснованным поиск микромицетов в качестве эффективных продуцентов ферментов лигнолитического комплекса.

Выделение микромицетов уже проводилось в работах Н.С. Мокрушиной и др. [11] и Дармова И.В., Горшуновой Е.И. и др. [5]. В указанных работах были преимущественно исследованы грибы рода *Aspergillus* и

Fusarium как типичные продуценты лигнинразрушающих ферментов. Также среди микромицетов классическими продуцентами являются грибы рода *Penicillium*, *Alternaria*, *Trichoderma* [15].

Цель работы — выявить гены, кодирующие лигнолитические ферменты, у изолятов микромицетов, выделенных в лесах Кировской области, и оценить ферментативную активность выделенных микромицетов на индикаторных средах.

Материалы и методы

Микромицеты были собраны в период за сентябрь–октябрь 2016 года в Кирово-Чепецком районе, селе Пасегово, Кировской области.

Пробы отбирали с деревянных построек, пней, в сухую погоду. Собранные образцы высевали на плотную питательную среду сусло-агар [15], предварительно обработав 70%-ным этиловым спиртом, и инкубировали в течение 3–4 дней в термостате при температуре 27 ± 1 °С. Для выделения чистой культуры грибов проводили пересев вырезанным кусочком агара на плотную питательную среду, не совершая переворачивания брусочка. Культивирование осуществлялось в термостате при температуре 27 ± 1 °С в течение 4 дней [15].

Вид грибов определяли по микроскопическому строению мицелия, морфологии колоний при помощи определителя микроскопических почвенных грибов Литвинова М.А. [9] и определителя токсинообразующих микромицетов Билай В.И. [2]. Строение микромицета исследовали в фиксированном препарате мицелия, окрашенного метиленовым синим, под световым микроскопом [18].

Выделение ДНК и амплификация искомым ДНК были выполнены по отработанной ранее методике [18]. Были использованы пары праймеров: 1LAC_F/1LAC_R, MnperF/MnperR и Lig-per_F/Lig-per_R, представленные в работе Е.А. Шевченко и Е.А. Бессолицыной [18]. Продукты амплификации фрагментов генов лакказы (праймеры Lac_F/Lac_R) и марганец-пероксидазы разделяли с помощью гель-электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле, фрагменты генов лакказы (праймеры 1LAC_F/1LAC_R) разделяли в 6,0% нативном полиакриламидном геле, результаты визуализировали с использованием бромистого этидия. Размер амплификатов определяли с использованием стандартного набора маркеров «Сибэнзим» (Россия) [18].

Для проверки ферментативной активности изолятов использовали две среды [5]:

1) среда Чапека (на 200 миллилитров среды): глюкоза — 2 г; агар-агар — 4 г; пептон — 0,6 г; K_2HPO_4 — 0,12 г; K_2HPO_4 — 0,12 г; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,0002 г; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,00001 г; MnSO_4 — 0,01 г; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,01 г; CuSO_4 — 0,05 г — для индукции лакказы; CaCl_2 — 0,01 г — для индукции лакказы; гваякол — следы — для индукции лакказы; танин — следы — для индукции лакказы. Пептон добавляли как источник азота для более активного роста микромицетов.

2) среда Чапека, но без добавления пептона.

Микромицеты сеяли на чашки с твердой питательной средой, помещали в термостат при температуре 27 ± 1 °С, затем измеряли и сравнивали зоны затемнения — появления коричневого окрашивания в субстрате вблизи растущего мицелия в ходе реакции лакказы с танином и гваяколом.

Результаты и обсуждение

Всего было выделено 26 природных изолятов микромицетов. Результаты идентификации представлены в таблице 1. Среди изолятов наиболее часто встречался микромицет рода *Trichoderma* (12 изолятов), *Mucor* (4 изолята), *Aspergillus* (2 изолята) и *Verticillium* (2 изолята).

Таблица 1

Результаты видовой идентификации изолятов микромицетов

Видовое название	Номера изолята
<i>Aspergillus</i> spp.	12; 6.2
<i>Curvularia</i> spp.	7.1
<i>Dactylella bembicodes</i>	8
<i>Dendryphiella arenaria</i>	2.3
<i>Monosporium subtile</i>	9
<i>Mucor</i> spp.	1; 10; 13; 14
<i>Trichoderma hamatum</i>	3.2
<i>Trichoderma</i> spp.	2.1; 2.2; 4.1; 4.3; 5; 3.3; 11.2; 15; 17; 18
<i>Trichoderma viridae</i>	3.1
<i>Trichothecium</i> spp.	7.2
<i>Verticillium</i> spp.	11.1; 16.1

После выделения ДНК и амплификации искомого ДНК с помощью гель-электрофореза получили следующие результаты детекции продуктов амплификации, представленные на рисунках 1–3 и в таблице 2.

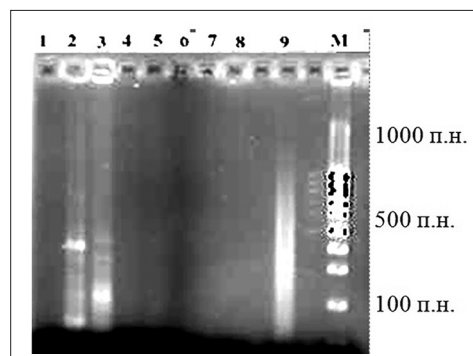


Рис. 1. Гель-электрофорез продуктов амплификации последовательности гена марганец-пероксидазы в 1,5%-ном агарозном геле. Праймеры Mn-perF/Mn-perR. 1 — *Dendryphiella arenaria* (2.3); 2 — *Trichoderma viridae* (3.1); 3 — *Trichoderma hamatum* (3.2); 4 — *Trichoderma* spp. (3.3); 5 — *Mucor* spp. (10); 6 — *Aspergillus* spp. (12); 7, 8 — *Mucor* spp. (13; 14). 9 — отрицательный контроль; М — маркер «СибЭнзим» (п.н. — пар нуклеотидов)

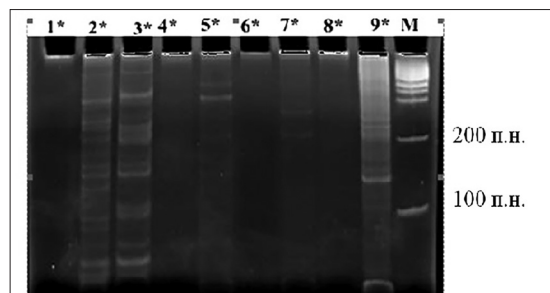


Рис. 2. Гель-электрофорез продуктов амплификации последовательности гена лигнин-пероксидазы в 1,5%-ном агарозном геле. Праймеры Lig-perF/Lig-perR. 1* — *Dendryphiella arenaria* (2.3); 2* — *Trichoderma viridae* (3.1); 3* — *Trichoderma hamatum* (3.2); 4* — *Trichoderma* spp. (3.3); 5* — *Mucor* spp. (10); 6* — *Aspergillus* spp. (12); 7*, 8* — *Mucor* spp. (13; 14); 9* — отрицательный контроль; М — маркер «СибЭнзим»

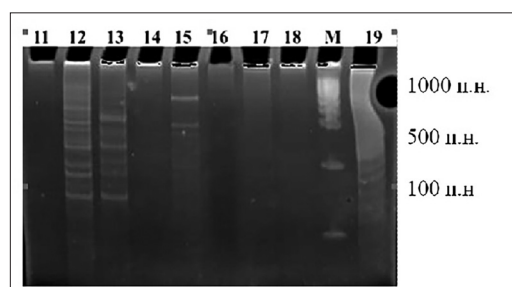


Рис. 3. Гель-электрофорез продуктов амплификации последовательности гена лакказы в 6,0%-ном нативном полиакриламидном геле. Праймеры 1Lac-F/1Lac-R. 11 — *Dendryphiella arenaria* (2.3); 12 — *Trichoderma viridae* (3.1); 13 — *Trichoderma hamatum* (3.2); 14 — *Trichoderma* spp. (3.3); 15 — *Mucor* spp. (10); 16 — *Aspergillus* spp. (12); 17, 18 — *Mucor* spp. (13; 14). 19 — отрицательный контроль; М — маркер «СибЭнзим»

Гены, кодирующие лакказу, были выявлены у 11 изолятов. Размер полученного ПЦР-продукта соответствовал ожидаемому (130 п.н.) у *Trichoderma viridae* (3.1), *Trichoderma hamatum* (3.2), *Trichoderma* spp. (11.2, 16.2, 17, 18). У остальных изолятов амплификаты различались по размерам, а также наличием множественности полос. Это может быть связано с наличием нескольких изоформ или дуплексов фермента и различием длины интронов в гене как у микромицетов, так и у представителей базидиомицетов [18].

Ген лигнин-пероксидазы был найден у 13 изолятов. Размер ожидаемого ПЦР-продукта (207 п.н.) был обнаружен у *Mucor* spp. (1, 10, 13), *Trichoderma* spp. (5), *Dactylella bembicodes* (8), *Monosporium subtile* (9), *Trichoderma viridae* (3.1), *Trichoderma hamatum* (3.2), *Aspergillus* spp. (6.2). У нескольких изолятов ампликоны отличаются по размерам от ожидаемого и между собой, выявлено наличие дополнительных полос, что также может быть объяснено структурными различиями интронов и существованием других изоформ или дуплексов ферментов [18].

Таблица 2

Продукты амплификации последовательностей генов лигнолитических ферментов природных изолятов микромицетов

Видовое название	Изолят	Размер продукта амплификации, п.н.		
		гена Мп-пероксидазы	гена лигнин-пероксидазы	гена лакказы
<i>Aspergillus</i> spp.	12	—	—	—
	6.2	300	100, 150, 180, 207, 350, 370, >500	Множество полос >300
<i>Curvularia</i> spp.	7.1	—	—	—
<i>Dactylella bembicodes</i>	8	—	207, 250	—
<i>Dendryphiella arenaria</i>	2.3	—	—	—
<i>Monosporium subtile</i>	9	—	207, 250	—
<i>Mucor</i> spp.	1	300, 350, ≈1000	207 слабая и множество полос	Множество полос
	10	—	207, 400	300, 500
	13	—	207, 250	—
	14	—	—	—
<i>Trichoderma hamatum</i>	3.2	200, 300, 400	207 слабая и множество полос	130, Множество полос
<i>Trichoderma</i> spp.	2.1	—	—	—
	2.2	—	—	—
	4.1	—	—	—
	4.3	400, 900	—	100, 200
	5	200, 300, 400	207 слабая и множество полос	100, 200
	3.3	—	—	—
	11.2	300	140, 150, 207, 220, >500	130, 180
	15	—	—	—
	16.2	—	Множество полос, 207 нет	130, Множество полос
17	—	300, >500	130, Множество полос	
18	250, 350, 400	400, >500	130, Множество полос	
<i>Trichoderma viridae</i>	3.1	350	207 слабая и множество полос	130, Множество полос
<i>Trichothecium</i> spp.	7.2	—	—	—
<i>Verticillium</i> spp.	11.1	—	—	—
	16.1	—	—	—

Примечание: знак «—» — амплификат не обнаружен

Фрагменты генов, кодирующие марганец-пероксидазу, были обнаружены у 8 изолятов. Размер ПЦР-продукта был близок к ожидаемому (450 п.н.) у изолятов *Trichoderma* spp. (4.3, 5, 18) и *Trichoderma hamatum* (3.2). У изолятов 1 (*Mucor* spp.), 3.1 (*Trichoderma viridae*), 6.2 (*Aspergillus* spp.), 11.2 (*Trichoderma* spp.) определены продукты, отличающиеся по длине друг от друга и от ампликонов ожидаемого размера. Множественности полос не было найдено, что по сравнению с базидиомицетами говорит о более стабильной конструкции гена у микромицетов [18].

У изолятов *Trichoderma* spp. (2.1, 2.2, 4.1, 15, 3.3), *Aspergillus* spp. (12), *Mucor* spp. (14), *Curvularia* spp. (7.1), *Trichothecium* spp. (7.2), *Dendryphiella arenaria* (2.3), *Verticillium* spp. (11.1, 16.1) продукта амплификации выявлено не было. У изолятов 8 (*Dactylella bembicodes*), 9 (*Monosporium subtile*), 13 (*Mucor* spp.) были установлены продукты амплификации по одному из ферментов (лигнин-пероксидаза); у изолятов *Mucor* spp. (10), *Trichoderma* spp. (4.3, 16.2, 17) — по двум ферментам: лигнин-пероксидаза и лакказы.

Фрагменты генов всех трех ферментов были продемонстрированы у 7 изолятов: *Mucor* spp. (1), *Trichoderma* spp. (5, 11.2, 18), *Trichoderma viridae* (3.1), *Trichoderma hamatum* (3.2) и *Aspergillus* spp. (6.2).

Для проверки на ферментативную активность отобрали изоляты, у которых были выявлены гены, кодирующие хотя бы один из трех ферментов. Проверку проводили на

плотной питательной среде Чапека с добавлением гваякола и танина. В одни чашки отдельно добавляли пептон как источник азота для более активного роста микромицета. От размеров зон затемнения зависит оценка степени активности гриба продуцировать ферменты лигнолитического комплекса [11]. Результаты измерения диаметров зон затемнения приведены в таблице 3 и на рисунке 4.

Таблица 3

Результаты проверки грибов на ферментативную активность

Изолят	Видовое название	Диаметр зоны (мм)	
		ЧПА+Т+Г	ЧПА+Т+Г без пептона
1	<i>Mucor</i> spp.	0	0
4.3	<i>Trichoderma</i> spp.	30	0
5	<i>Trichoderma</i> spp.	10	20
8	<i>Dactylella bembicodes</i>	25 (светлая)	0
9	<i>Monosporium subtile</i>	20 (светлая)	20 (светлая)
3.1	<i>Trichoderma viridae</i>	30	50
3.2	<i>Trichoderma hamatum</i>	30	55
10	<i>Mucor</i> spp.	30	0
13	<i>Mucor</i> spp.	0	0
6.2	<i>Aspergillus</i> spp.	25	20
11.2	<i>Trichoderma</i> spp.	30	30
16.2	<i>Trichoderma</i> spp.	22	0
17	<i>Trichoderma</i> spp.	25	0
18	<i>Trichoderma</i> spp.	20	0

Примечание: Т – танин; Г – гваякол; ЧПА – плотная питательная среда Чапека

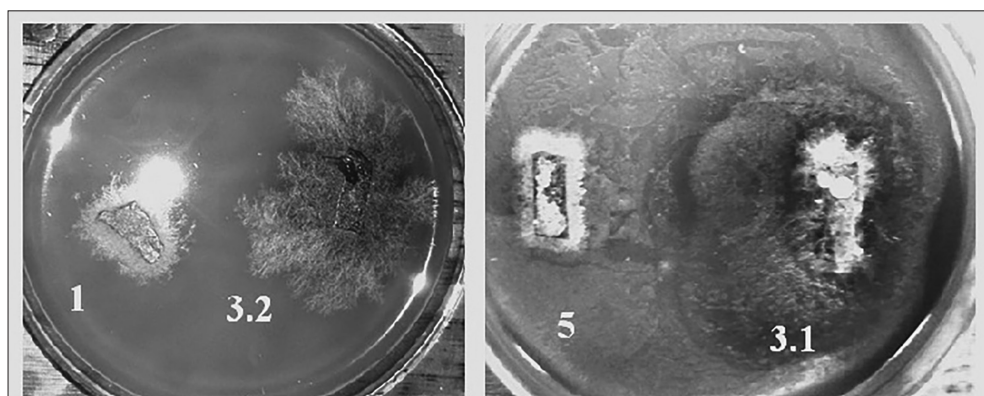


Рис. 4. Зоны затемнения на плотной питательной среде с добавлением гваякола и танина изолятов № 1; 3.2; 5; 3.1

Результаты проверки исследуемых микромицетов на ферментативную активность внесли в таблицу 3 и сравнили с данными таблицы 2. Было обнаружено, что изоляты 3.1 (*Trichoderma viridae*), 3.2 (*Trichoderma hamatum*) и 11.2 (*Trichoderma* spp.), у которых были определены по

длине полосы фрагменты генов, кодирующих одновременно два или три лигнолитических фермента, показали наиболее активный рост на плотной питательной среде Чапека с добавлением гваякола и танина. В то же время изоляты с фрагментами генов, кодирующих только один

из трех ферментов, проявляли малую активность роста. По данным таблицы 2, изоляты под номерами 1 (*Mucor* spp.) и 18 (*Trichoderma* spp.) имеют фрагменты генов, кодирующих все три лигнолитических фермента, но другой длины. Это объясняет переход гена в неактивную форму и отсутствие ферментативной активности микромицетов на среде Чапека с добавлением гваякола и танина.

Исходя из результатов проверки на ферментативную активность, сделали вывод, что по сравнению с другими изолятами наиболее активными продуцентами ферментов лигнолитического комплекса являются изоляты 3.1 (*Trichoderma viridae*) и 3.2 (*Trichoderma hamatum*). Диаметр их зон затемнения составлял 30 мм каждый, а без добавления пептона в среду — 50 и 55 мм соответственно. От размеров зон затемнения зависит оценка степени активности гриба продуцировать ферменты лигнолитического комплекса. Так как диаметры зон затемнения изолятов 3.1 и 3.2 были самыми крупными среди других микромицетов, поэтому они были отобраны для дальнейшего исследования на предмет максимального выхода и активности ферментов лигнолитического комплекса.

В исследованиях Мокрушиной Н.С., Тарасовой Т.С. и др. [11] и Дармова И.В., Горшуновой Е.И. и др. [5] по рассматриваемой теме были изучены как продуценты ферментов лигнолитического комплекса микромицеты рода *Fusarium* и *Aspergillus*. В представленной нами работе у *Mucor* spp. впервые были обнаружены гены указанных ферментов.

Заключение

В результате осуществленной работы были выявлены 7 изолятов грибов с генами, кодирующими три лигнолитических фермента: *Mucor* spp. (1), *Trichoderma* spp. (5, 11.2, 18), *Trichoderma viridae* (3.1), *Trichoderma hamatum* (3.2) и *Aspergillus* spp. (6.2), среди них 5 относятся к одному роду (*Trichoderma*). Была проведена их проверка на ферментативную активность путем посева изолятов на плотные питательные среды Чапека с добавлением гваякола и танина и с последующим измерением зон затемнения. Были отобраны микромицеты, несущие генетические детерминанты всех трех основных лигнолитических ферментов и являющиеся наиболее активными продуцентами ферментов — *Trichoderma viridae* и *Trichoderma hamatum*. В ранних исследованиях микромицетов как продуцентов ферментов лигнолитического комплекса [5, 11] были изучены микромицеты рода *Fusarium* и *Aspergillus*. В настоящей работе впервые гены указанных ферментов были обнаружены у *Mucor*

spp. Изоляты 3.1 и 3.2 перспективны для дальнейшего изучения как продуценты ферментов лигнолитического комплекса.

Литература

1. Айзенштадт М.А., Боголицын К.Г. Пероксидазное окисление лигнина и его модельных соединений // Химия растительного сырья. — 2009. — № 2. — С. 5–18.
2. Билай В.И., Курбацкая З.А. Определитель токсинообразующих микромицетов. — Киев: Наукова думка, 1990. — С. 58–60.
3. Болобова А.В., Аскадский А.А., Кондращенко В.И., Рабинович М.Л. Теоретические основы биотехнологии древесных композитов. — М.: Наука, 2002. — С. 342.
4. Даниляк Н.И., Семичаевский В.Д., Дудченко Л.Г., Трутнева И.А. Ферментные системы высших базидиомицетов. Отв. ред. Сульина Е.Г., Дудка И.А. АН УССР, Ин-т ботаники им. Н.Г. Холодного. — Киев: Наукова думка, 1989. — С. 4–5.
5. Дармов И.В., Горшунова Е.И., Тарасова Т.С. Исследование природных изолятов микромицетов *Fusarium* spp. — продуцентов лигнолитических ферментов // Ученые записки Казанского университета. — 2017. — Т. 159. — № 1. — С. 72–84.
6. Кадималиев Д.А. Фундаментальные и прикладные основы биотехнологии экологически безопасных композиционных материалов. — Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2004. — 190 с.
7. Карманов А.П., Беляев В.Ю., Кочева Л.С. Исследование структуры макромолекул лигнинов // Химия растительного сырья. — 2010. — № 1. — С. 27–34.
8. Куликова Н.А. Использование базидиальных грибов в технологиях переработки и утилизации техногенных отходов: фундаментальные и прикладные аспекты // Прикладная биохимия и микробиология. — 2011. — Т. 47. — № 6. — С. 619–634.
9. Литвинов М.А. Определитель микроскопических почвенных грибов. — Л.: Наука, 1967. — 311 с.
10. Лугаускас А.Ю., Микульскене А.И., Шляужене Д.Ю. Каталог микромицетов — биодеструкторов полимерных материалов. — М.: Наука, 1987. — С. 10–12.
11. Мокрушина Н.С., Тарасова Т.С., Дармов И.В. Выделение микромицетов, перспективных для разработки на их основе биопрепарата для ускоренной переработки древесных отходов в удобрение // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. — 2010. — № 2. — С. 430–434.
12. Никитина В.Е., Купряшина М.А. Влияние условий культивирования на лигнин-пероксидазную активность эндофитного и эпифитного штаммов *Azospirillum brasilense* // Известия Саратовского университета. — 2012. — Т. 12. — № 4. — С. 52–56.

13. Рабинович М.Л., Болобова А.В., Кондращенко В.И. Теоретические основы биотехнологии древесных композитов. — М.: Наука, 2001. — 264 с.
14. Русинова Т.В. Разработка технологий биосинтеза фермента лакказы базидиальными грибами *Trametes*: автореф. дис. канд. технич. наук. — М., 2007. — 20 с.
15. Старкова Е.В., Синцов К.Н., Дурнев Е.А., Береснева И.С., Мартинсон Е.А., Литвинцев С.Г. Выделение микромикетов, способных к деструкции лигнинсодержащего сырья // Иммунопатология, Аллергология, Инфектология. — 2010. — № 1. — С. 267–268.
16. Сушкова В.И., Воробьева Г.И. Безотходная конверсия растительного сырья в биологически активные вещества. — Киров, 2007. — 204 с.
17. Чекушина А.В. Целлюлолитические ферментные препараты на основе грибов *Trichoderma*, *Penicillium* и *Muceliophthora* с увеличенной гидролитической активностью: автореф. дис. канд. хим. наук. — Институт биохимии им. А.Н. Баха. — М., 2013. — 23 с.
18. Шевченко Е.А., Бессолицына Е.А., Дармов И.В. Выявление генов, кодирующих лигнолитические ферменты у природных изолятов базидиомицетов // Прикладная биохимия и микробиология. — 2013. — Т. 49. — № 3. — С. 285–291.
19. Higuchi T. Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation // Wood Set. Technol. — 1990. — Vol. 24. — P. 23–63.
20. Hofrichter M. Review: Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP) // Enzyme Microb. Technol. — 2002. — Vol. 30. — P. 454–466.
21. Vrsanska M., Voberkova S., Langer V., Palovcikova D., Moulick A., Adam V., Kopel P. Induction of laccase, lignin peroxidase and manganese peroxidase activities in white-rot fungi using copper complexes // Molecules. — 2016. — Vol. 21. — No. 11. — pii: E1553.
22. Zimbardi A.L., Camargo P.F., Carli S., Aquino Neto S., Meleiro L.P., Rosa J.C., De Andrade A.R., Jorge J.A., Furriel R.P. A high redox potential laccase from *Pycnoporus sanguineus* RP15: Potential application for dye decolorization // International Journal of Molecular Sciences. — 2016. — Vol. 17. — No. 5. — pii: E672. doi: 10.3390/ijms17050672.

IDENTIFICATION OF GENES ENCODING LIGNOLYTIC ENZYMES IN NATURAL ISOLATES OF MICROMYCETES

E.A. BESSOLITSYNA, T.A. SKUDNOVA

Vyatka State University, Kirov

This article examines 26 natural isolates of micromycetes isolated from natural sources in the Kirov region, for the presence of genes encoding the main enzymes of the lignolytic complex (laccases, lignin peroxidase and manganese peroxidase), and the activity of the synthesized enzymes. The extracted DNA of the samples was examined for the presence of genes encoding the main enzymes of the lignolytic complex by polymerase chain reaction (PCR). Isolates were discovered in which amplification products of genes encoding lignolytic enzymes were detected. Fragments of laccase genes were found in 11 isolates, lignin peroxidase in 13, manganese peroxidase in 8 isolates. In 12 isolates of lignolytic enzyme genes were not detected. As a result of the work, 7 fungal isolates with genes encoding all three studied lignolytic enzymes were discovered: *Mucor* spp. (1) *Trichoderma* spp. (5, 1, 2, 18), *Trichoderma viridae* (3.1), *Trichoderma hamatum* (3.2), and *Aspergillus* spp. (6.2); among them 5 belong to the same genus (*Trichoderma*). They were tested for enzymatic activity by plating isolates on Chapek indicator media with the addition of guaiacol and tannin and then measuring the dimming zones that determine the degree of activity of the fungus to produce lignolytic complex enzymes. As a result of the study, *Trichoderma viridae* and *Trichoderma hamatum* were selected, carrying the genetic determinants of lignolytic enzymes and being the most active on indicator media. These isolates are promising for further study as producers of lignolytic complex enzymes. The genes of these enzymes were first detected in *Mucor* spp.

Keywords: lignin, micromycetes, ligninolytic complex genes, laccase, lignin peroxidase, manganese-dependent peroxidase, identification, isolates, indicator media, biodegradation, lignolytic enzymatic activity, polymerase chain reaction, Kirov city, Kirov region.

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ФЕРМЕНТОВ. РАЗДЕЛЕНИЕ ТРИПСИНОГЕНА И ХИМОТРИПСИНОГЕНА

Е.Р. ЗАБОЛОЦКАЯ*, Д.О. ВИНОХОДОВ

*Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет),
Санкт-Петербург*

В работе проанализированы современные методы выделения и очистки ферментов из разных видов сырья, а также отделение протеолитических ферментов от нуклеаз в экстракте поджелудочной железы крупного рогатого скота. Полученные результаты определения активностей, высокоэффективной жидкостной хроматографии и электрофореза показали эффективное разделение смеси трипсиногена и химотрипсиногена. Выходы по активности также оказались удовлетворительными, что дает возможность продолжить последующую очистку.

Ключевые слова: хроматография, ферменты, трипсин, химотрипсин.

Введение

Ферменты представляют собой белковые вещества, способные катализировать биохимические реакции в организме. Под их влиянием происходит расщепление сложных органических веществ на более простые [1]. В настоящее время наука о ферментах — энзимология — представляет собой объемную отрасль, тесно связанную со многими другими науками: биохимией, физической химией, микробиологией, генетикой, сельским хозяйством, медициной и химической технологией [3]. Такая обширная связь предполагает и широкое применение ферментов в пищевой и легкой промышленности, косметологии, генной инженерии, в борьбе с вредителями и в качестве медицинских препаратов. Получение ферментов является задачей биотехнологии, которая заключается в поиске оптимального источника фермента и его дальнейших выделения и очистки. Ферментные препараты трудно или невозможно получить химическим синтезом [7].

Общая схема выделения и очистки биофармацевтических белков от примесей до терапевтических степеней чистоты представлена Д.А. Гусаровым [2]. Также интересная комплексная схема очистки рассмотрена на примере рекомбинантного человеческого интерферона альфа 2б, которая включает в себя стадию аффинной хроматографии и двухстадийную ионообменную хроматографию с

последующим диализом, стерилизующей фильтрацией и лиофильной сушкой полученного продукта [13]. В данной работе более подробно рассмотрены способы выделения и очистки получения именно ферментных препаратов.

Получение чистых ферментов позволяет не только использовать их в пищевой промышленности, медицине, ветеринарии и лабораторной практике в качестве лекарственных средств и реактивов, но и дает возможность изучать их свойства, строение и функции. На начальном этапе происходит подбор сырья, богатого нужным ферментом для осуществления экстракции и получения фермента в растворенном виде. Сырьем служат как микроорганизмы природных штаммов, так и генно-модифицированные, растительные и животные ткани и органы. Из животных тканей экстрагировать ферменты легче, чем из микроорганизмов [3]. Для экстракции подбирают разные растворители, в зависимости от свойств фермента и сырья. Самая простая — экстракция водой, водно-солевыми растворами. Также могут использоваться различные органические растворители, а для получения протеолитических ферментов часто применяют кислотную экстракцию. Природа кислот и их концентрация подбираются эмпирически в процессе поиска оптимальных условий для максимального выхода и сохранения биологических свойств исследуемого фермента.

Чтобы использовать ферменты в медицинских целях, необходимо достичь высокой степени их очистки, которая начинается с удаления нерастворимого остатка: дебриса клеток или измельченного сырья. Для этого применяют физические методы: центрифугирование и фильтрацию на различном оборудовании и/или с применением различных фильтрующих материалов. Это могут быть бумажные или тканевые фильтры, волокнистые или

© 2020 г. Заболоцкая Е.Р., Виноходов Д.О.

* **Автор для переписки:**

Заболоцкая Елена Романовна
аспирант кафедры молекулярной биотехнологии СПбГТИ(ТУ),
ассистент преподавателя кафедры ЕГИТ, ЛГУ им. А. С. Пушкина
E-mail: gelios86@mail.ru

гранулированные фильтрующие материалы, пористые стеклянные или керамические фильтры с применением давления или вакуума. Более тонкой очистки от нерастворимых остатков можно добиться использованием химических методов: изменение рН экстракта, добавление осадителей. Способ предварительной очистки экстракта подбирается экспериментально и чаще всего включает в себя последовательное применение перечисленных приемов. Основная задача на данном этапе — получение максимально прозрачного раствора, содержащего удовлетворительное количество искомого биологически активного вещества (БАВ).

В настоящее время существует множество способов проведения дальнейшего фракционирования. Выбор их зависит от желаемой степени чистоты, свойств самого фермента и свойств исходного экстракта. Наименее чувствительный, но вместе с тем простой и недорогой способ — высаливание или фракционирование солями. Метод позволяет фракционировать неограниченно большое количество вещества, использовать простые технологические операции и стандартное лабораторное или промышленное оборудование [1]. Способ основан на гидрофобных свойствах молекул белков. Чаще всего для высаливания применяют сульфат аммония. Он хорошо растворим в воде и на многие ферменты оказывает стабилизирующее действие [3]. В некоторых случаях описанных выше методов уже достаточно для получения БАВ. Так, например, была получена дезоксирибонуклеаза (ДНКаза): кислотной экстракцией 0,25н серной кислотой из измельченной поджелудочной железы крупного рогатого скота (КРС), фильтрацией полученного экстракта, ступенчатым высаливанием сульфатом аммония, растворением осадка фермента в минимальном объеме подкисленной воды, проведением диализа и высушиванием фермента в вакууме [23]. Такой же метод был применен и для получения рибонуклеазы (РНКазы) [20]. Оба фермента, полученные данным способом, обладают невысокой степенью чистоты.

Для получения более чистых продуктов в настоящее время очень широко применяют хроматографическую очистку, которая происходит за счет взаимодействия подвижной и неподвижной фаз [6, 8]. Известен способ очистки рекомбинантной РНКазы из клеток *Bacillus megaterium* методом ионообменной хроматографии [4]. Но чаще всего одним видом хроматографии не ограничиваются, а применяют серию последовательных ступеней очистки. Так, например, химо трипсиноген (ХТС) выделяют из поджелудочной железы морской свинки путем кислотной экстракции, высаливания сульфатом

аммония, осаждением фермента в его изоэлектрической точке изменением рН раствора и ионообменной хроматографией [27]. Для получения очищенной рекомбинантной РНКазы описаны несколько разных схем выделения. В одном случае клетки *Escherichia coli* разрушали ультразвуком, фермент экстрагировали трис-ЭДТА буфером, пропускали раствор через колонку с фосфоцеллюлозой Р-11, уравновешенной ацетатным буфером с мочевиной, элюировали тем же буфером в градиенте хлорида натрия. После этого проводили гель-фильтрацию на Sephadex G-25 и повторяли стадию на Р-11, но без добавления мочевины в буфер. Обессоливание продукта проводили ультрафильтрацией [19]. Во втором случае клетки *Escherichia coli* разрушали под давлением, фермент экстрагировали трис-НСI буфером и наносили на колонку с DEAE-сефарозой, уравновешенной тем же буфером. Элюировали в градиенте хлорида натрия, проводили диализ и полученный раствор белка наносили на колонку с CM-сефарозой, уравновешенной ацетатным буфером. Элюцию проводили также в градиенте хлорида натрия, обессоливали ультрафильтрацией и пропускали через колонку со SpectraGel AcA 54, уравновешенной фосфатным буфером. Полученный фермент концентрировали ультрафильтрацией, проводили стерилизующую фильтрацию и замораживали [17].

Для выделения и очистки ферментов также широко применяют метод гидрофобной хроматографии (ГХ). Гидрофобные свойства белков впервые описаны в начале 1970-х годов. Первоначально применялась матрица из агарозного геля с остатками алкиламина, а для элюирования использовался агрессивный имидазол-цитратный буфер, изменяющий конформацию белка [18]. Арфман и Шелтил обнаружили, что сорбция белка может быть оптимизирована с помощью растворов с высокой концентрацией соли, например, 1М сульфата аммония, а также тем, что сродство белка к гидрофобной матрице пропорционально длине производной цепи [15]. Для разделения белков методом гидрофобной хроматографии необходимо подобрать и проанализировать целый ряд условий, таких как: природа соли (катион и анион), ее концентрация, различные лиганды неподвижной фазы, состав и природа подвижной фазы, а также собственно условия хроматографирования: температура, рН, скорость подачи потока фазы [24]. Так, например, описан способ очистки фермента гликоген-синтетазы. В качестве неподвижной фазы использовали модифицированную алкилагарозу с короткими цепочками лиганда ($n=2$, $n=3$). Более длинные цепи удерживают фермент так крепко, что элюировать его можно только в денатурированном

виде. Элюцию проводили линейным градиентом хлорида натрия. Очистка гликоген-синтетазы происходит за счет взаимодействия между гидрокарбонатным участком цепи агарозы и гидрофобным «карманом» белка. Для некоторых белков требуются буферы сложного состава, например, β -глицерофосфат-50 мМ меркаптоэтанол-1 мМ ЭДТА [26].

Наибольшей степени чистоты можно достичь посредством аффинной хроматографии, которая также широко применяется для получения ферментов. Аффинная хроматография основана на способности белка связываться с лигандом сорбента и образовывать биоспецифический (аффинный) комплекс [10]. Таким способом из смеси извлекают панкреатические α -химотрипсин и трипсин. На колонке с неподвижной фазой 8-(6-аминогексил)-амино-5'-АМФ-сефарозой оба фермента РНКазы и ДНКазы количественно элюируются. А отделение РНКазы от ДНКазы основано на специфическом удерживании ДНКазы на 8-(6-аминогексил)-амино-2'-АМФ-сефарозе при высокой ионной силе раствора подвижной фазы. ДНКазы десорбируются в этих условиях [22]. Интересный способ очистки трипсина заключается в экстракции фермента из пилорической железы трески водой. Полученный экстракт подвергали аффинной хроматографии на колонке с п-амино-бензамидиносефарозой, уравновешенной трис-буфером. Элюировали трипсин тем же буфером с добавлением хлорида натрия. Дальнейшую очистку осуществляли хроматофокусированием на колонке с анионообменной матрицей РВЕ-94 [16].

Обычно процесс очистки проходит несколько циклов до тех пор, пока фракции, полученные элюцией, не будут содержать массовую долю белка выше или равной 95% [11].

Материалы и методы

Материалы. Химические стаканы, пробирки стеклянные, пробирки центрифужные, колбы мерные разных объемов, цилиндры мерные разных объемов, пробирки пластиковые, концентраты центрифужные Amicon Ultra-4, Merk, Millipore (мембраны с различным размером отсечения), якорьки для магнитной мешалки, пипетки мерные на 0,1–10 мл стеклянные, пипетки автоматические переменного объема «Ленпипет», кюветы спектрофотометрические из кварцевого стекла, сорбент Phenyl 650M (фирма TOYOPEARL), колонки Econo-Column разных размеров и адаптеры к ним Econo-Column (производитель Bio-Rad), колонка для высо-

коэффициентной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) Jupiter C18, 300 Å, 150x4,6 мм (фирма Phenomenex).

Реактивы. Лимонная кислота моногидрат и безводная ч.д.а. ГОСТ 3652-69, серная кислота ч.д.а. ГОСТ 4204-77, натрий лимоннокислый 5,5-водный, ч.д.а. ГОСТ 22280-76, натрий хлористый, ч.д.а. ГОСТ 4233-77, натрия гидроксид ч.д.а. ГОСТ 4328-77, кислота ортофосфорная ч.д.а. ГОСТ 6552-80, вода дистиллированная ГОСТ Р 58144-2018, трис(гидроксиметил)аминометан 99,80% для биохимии (Acros, «Нева-Реактив» Cas № 77-86-1), медь (II) сернокислая 5-водная ч.д.а. ГОСТ 4165-78, натрий-калий виннокислый 4-водный ч.д.а. ГОСТ 5845-79, калия йодистый ч.д.а. ГОСТ 4232-74, магний сернокислый 7-водный ч.д.а. ГОСТ 4523-77, кислота хлорная х.ч. ГОСТ 6552-80, кислота соляная ос.ч. ГОСТ 14261-77, натрий уксуснокислый 3-водный, ч.д.а. ГОСТ 199-78, барий хлорнокислый, ч.д.а., спирт изопропиловый абс. ГОСТ 9805-84, спирт этиловый 1 с. ГОСТ 5962-2013, кальция хлорид 6-водный ч.д.а. ГОСТ Р 55973-2014, диметилсульфоксид (ДМСО) х.ч. ТУ 6-09-3818-89, ледяная уксусная кислота ос.ч. ГОСТ 18270-72, п-нитроанилин ч.д.а., магний хлористый 6-водный ч.д.а. ГОСТ 4209-77, натрий додецил сульфат ч.д.а. ТУ 6-09-10-1405-79, трихлоруксусная кислота (ТХУ) ч. ТУ 6-09-1926-77, акриламид ч., бисакриламид ч., ацетонитрил для хроматографии, сорт 1 ос.ч. (Криохром) ГОСТ 11097-86, N,N,N',N'-тетраметилендиамин (ТЕМЕД) ч.д.а., кислота аминуксусная (глицин), ч.д.а. ГОСТ 5860-75, аммоний надсернокислый (персульфат аммония) ч.д.а., Кумасси G-250/Brilliant Blue G-250 («Диа-М» кат.№ 6104-58-1ф), Low-Range SDS-PAGE Standards (BioRad, кат.№ 1610304), 2x Laemmli Sample Buffer (BioRad, кат.№ 1610737), Ribonucleic acid from torula yeast – РНК (Sigma, Cas № 63231-63-0), Deoxyribonucleic acid sodium salt from salmon testes – ДНК (Sigma, Cas № 438545-06-3), N α -Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride – БАПНА (Sigma, Cas № 911-77-3), N-Benzoyl-L-tyrosine ethyl ester – БТЭЭ (Sigma, Cas № 3483-82-7), Ribonuclease A from bovine pancreas (Sigma, Cas № 9001-99-4), Deoxyribonuclease I from bovine pancreas (Sigma, Cas № 9003-98-9), Trypsin from bovine pancreas (Sigma, Cas № 9002-07-7), α -Chymotrypsin from bovine pancreas (Sigma, Cas № 9004-07-3), кизельгур марки Super (Pall).

Методы. Для определения концентраций белка в пробах применяли биуретовый метод и спектрофотометрические методы [5].

Для определения ферментативной активности в образцах применяли модифицированные методы [1, 9, 12, 14, 25].

Молекулярные массы белков (свыше 10 кДа) в исследуемых образцах определяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия по Лэммли (SDSPAGE) [21] с использованием маркеров Low-Range SDS-PAGE Standards, фирмы BioRad. По данным электрофореза идентифицируют наличие или отсутствие ферментов в соответствии с их молекулярными массами, определенными по стандартным веществам.

Анализ белка в образцах проводили путем обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке Jupiter C18, 300 Å, 150×4,6 мм, фирмы Phenomenex. Наличие определяемых ферментов в полупродукте возможно идентифицировать по времени выхода вещества, определенного в сравнении со стандартными образцами. В качестве подвижной фазы используется смесь ацетонитрила и воды, подкисленной ортофосфорной кислотой до $\text{pH}=3,0\pm 0,5$. Анализ проводили в градиенте ацетонитрила от 16 до 55% в течение 30 мин. Для определения времени выхода каждого фермента был проведен анализ стандартных образцов ферментов фирмы Sigma. Результаты представлены

в таблице 1 и на рисунке 1. При увеличении электропроводности раствора время выхода продуктов может смещаться на несколько минут.

Таблица 1

Время выхода ферментов из колонки Jupiter C18

№ п/п	Фермент	Время выхода, мин
1	ТС	15,9–16,5
2	ХТС	22,1–23,8

В результате проведенных многочисленных экспериментов для разделения трипсиногена (ТС) от химотрипсиногена (ХТС) во фракции, полученной методом ионообменной хроматографии (ИОХ), был подобран сорбент Phenyl 650M (фирма TOYOPEARL) — современный сертифицированный и стандартизированный сорбент со средней степенью гидрофобности, содержащий фенильные группы. Матрица этого сорбента обладает высокой емкостью, химической стабильностью и разрешающей способностью. Высокая ионная сила увеличивает гидрофобное взаимодействие между белками и смолой и, следовательно, адсорбцию.

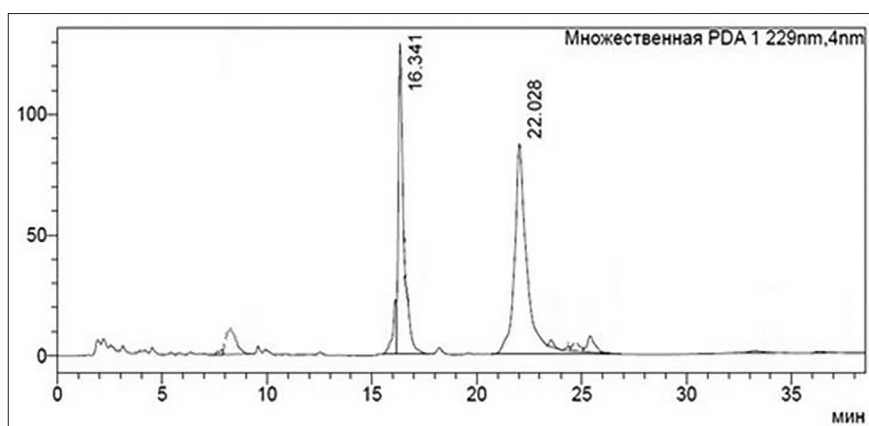


Рис. 1. ВЭЖХ стандартных образцов: ТС (Sigma BRP), ХТС (Sigma BRP)

Стартовый буфер. Для увеличения ионной силы в 0,02M цитратный буфер $\text{pH}=3,0\pm 0,5$ добавляли хлорид натрия при непрерывном перемешивании и контроле электропроводности на кондуктометре «Эксперт» до значения 230 ± 5 мСм/см ($M \approx 4,5$ моль/л).

Элюирующий буфер. 0,02 M цитратный буфер $\text{pH}=3,0\pm 0,5$.

Результаты

Подготовка образца, разделение и очистка. Для подготовки фракцию, содержащую ТС и ХТС, подводили pH до значения $5,0\pm 0,2$ добавлением в него по каплям при

постоянном перемешивании и контроле на pH -метре раствора 0,5M NaOH. Для увеличения электропроводности к образцу при постоянном перемешивании присыпали NaCl до достижения электропроводности 230–232 мСм/см.

Колонку Econo-Column ($D=1$ см, $L=10$ см, $S=0,79$ кв. см, $V_{\text{макс}}=8$ мл) с адаптером заполняли 7,5 мл сорбента Phenyl 650M и подключали в систему хроматографа. Насыщали колонку пропуская 5 колоночных объемов стартового буфера. В процессе сорбции пропускали около 3–5 колоночных объема заранее подготовленной фракции. Затем колонку промывали 5 колоночными объемами стартового буфера. Далее проводили процесс элюции с помощью ступени в 57% элюирующего буфера в количестве 10–12 колоночных

объемов с одновременным сбором фракций пика 1 (ТС). Пик 2 (ХТС) снимали ступенью в 85% элюирующего буфера около 7 колоночных объемов. Выход белковых фракций контролировали спектрофотометрически. В первом пике выходит трипсиноген, во втором пике выходит химотрипсиноген, что подтверждается данными ВЭЖХ (рис. 3, 4) и

электрофореза по Лэммли (рис. 5), а также материальным балансом по ферментативной активности. По окончании элюции проводили регенерацию сорбента. На рисунке 2 показан профиль сорбции-элюции образца, содержащего ТС и ХТС, а в таблице 2 приведены данные по ферментативной активности и концентрации белка в каждой фракции.

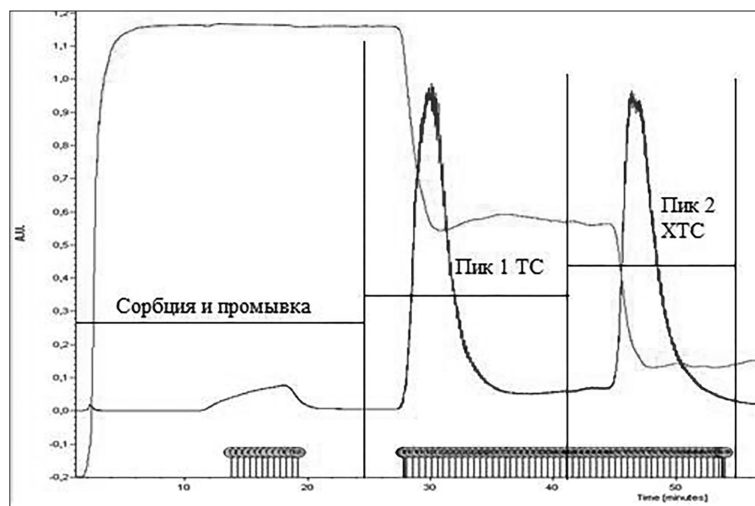


Рис. 2. Профиль разделения ТС и ХТС

Таблица 2

Материальный баланс стадии разделения ТС и ХТС методом ГХ

Фракция, содержащая ТС-ХТС			
Концентрация белка:	6,4 мг/мл	Кол-во белка:	1536,00 мг
Объем:	240 мл		
Активность на 1 мл:		Активность на 1 мг белка:	
Трипсин	0,950 ПЕ/мл	Трипсин	0,1484 ПЕ/мг б.
ХТС	202,40 БТЕ/мл	ХТС	31,63 БТЕ/мг б.
Концентрация белка:		Тотальная активность:	
Трипсин	6,40 мг/мл	Трипсин	228,00 ПЕ
ХТС	6,40 мг/мл	ХТС	48576,00 БТЕ
Пик 1 ТС		Пик 2 ХТС	
Объем пика	96,00 мл	Объем пика	72,00 мл
Активность на 1 мл:			
Трипсин	0,59 ПЕ/мл		-
ХТС	-		250,00 БТЕ/мл
Концентрация белка:			
Трипсин	3,50 мг/мл		-
ХТС	-		3,80 мг/мл
Активность на 1 мг белка:			
Трипсин	0,17 ПЕ/мг б.		-
ХТС	-		65,79 БТЕ/мг б.
Тотальная активность:			
Трипсин	57 ПЕ		-
ХТС	-		17973 БТЕ
Выход на стадии:			
Трипсин	25,0%		-
ХТС	-		37,0%

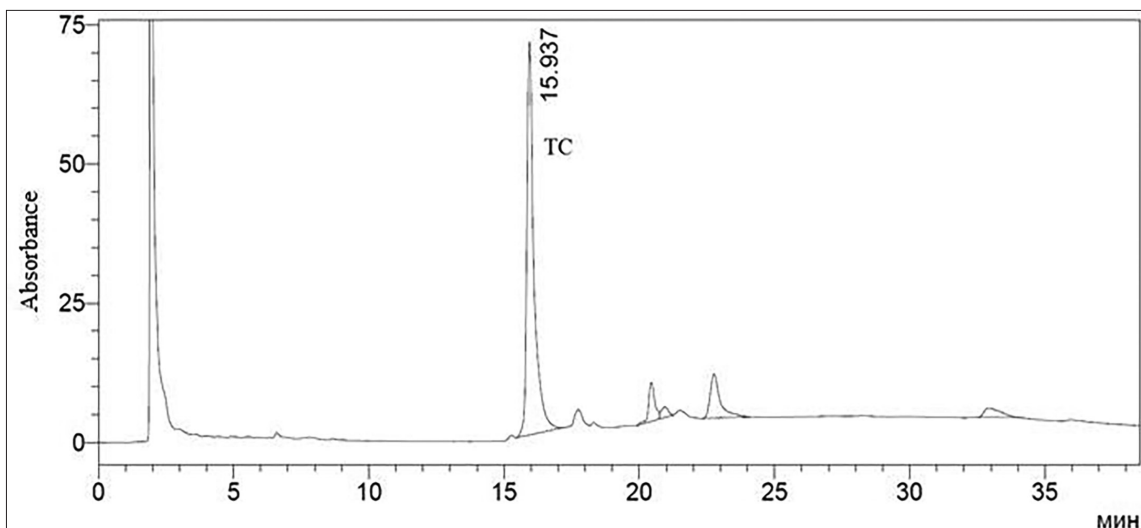


Рис. 3. Хроматограмма ВЭЖХ пика 1 ТС со стадии ГХ

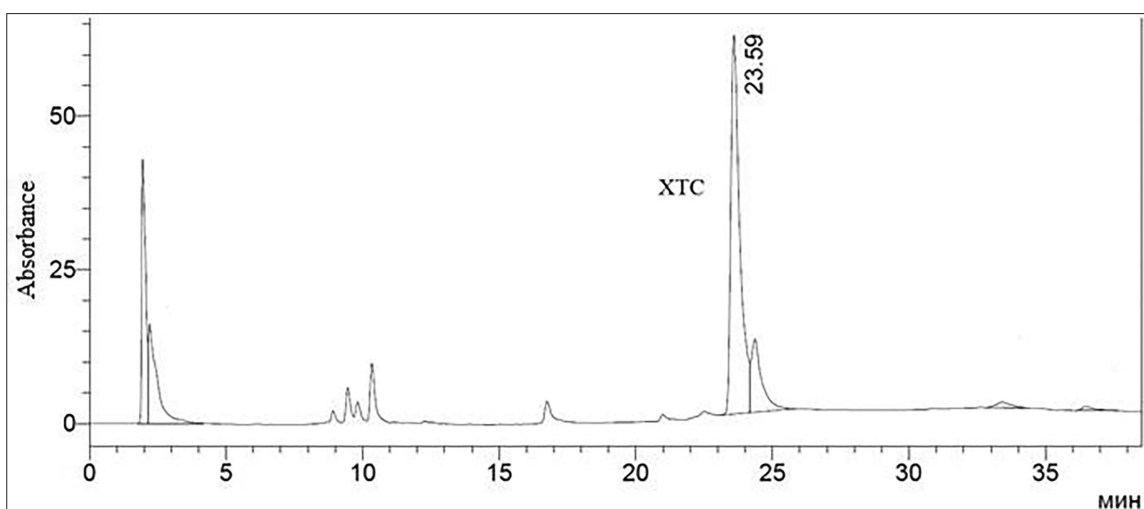


Рис. 4. Хроматограмма ВЭЖХ пика 2 XTC со стадии ГХ

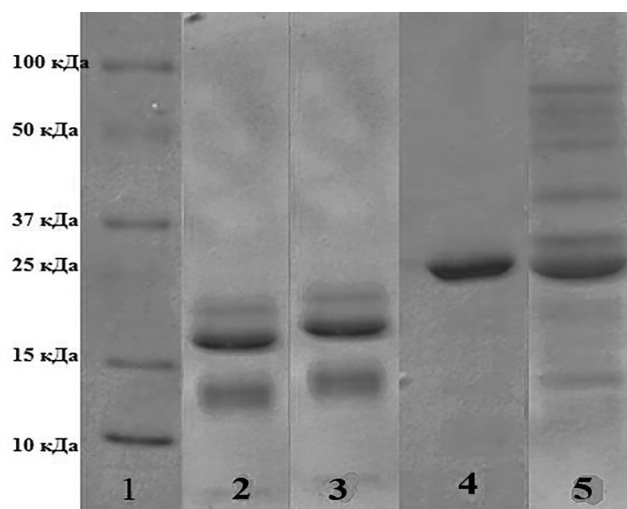


Рис. 5. Электрофорез фракций ГХ в сравнении со стандартами ферментов: 1 – Маркер Bio-Rad; 2 – ТС стандарт (BRP); 3 – Пик 1 ГХ (ТС); 4 – Пик 2 ГХ (XTC); 5 – XTC стандарт (BRP)

Заключение

В данной работе проведен анализ современных методов выделения и очистки ферментов из разных видов сырья, а также отделение протеолитических ферментов от нуклеаз в экстракте поджелудочной железы КРС. В подобранных условиях: буфера, рН, электропроводности, освещения, пробоподготовки и объема экстракта на сорбент Phenyl 650M наблюдалась эффективная сорбция ТС и ХТС. Полученные результаты определения активностей, ВЭЖХ и электрофореза показали эффективное разделение смеси трипсиногена и химотрипсиногена. Выходы по активности также оказались удовлетворительными. Эти данные позволяют продолжить последующую очистку.

Литература

1. Беленький Н.Г., Полонская Л.Б., Чамин Н.Н. Новое в производстве ферментов и ферментных препаратов из животного сырья. — Малоярославец, 1966. — 104 с.
2. Гусаров Д.А. Даунстрим-процесс очистки биофармацевтических белков // Разработка и регистрация лекарственных средств. — 2016. — № 3(16). — С. 88–99.
3. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты / Под ред. А.И. Опарина. — М.: Мир, 1966. — 816 с.
4. Дудкина Е.В., Ульянова В.И. и др. Получение новой секретируемой рибонуклеазы *Vacillus* sp. на основе рекомбинантного штамма *Vacillus megaterium* // Вестник Казанского технологического университета. — 2013. — Т. 16. — № 10. — С. 186–190.
5. Дэвени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды и белки. — М.: Мир, 1976. — 368 с.
6. Ибрагимов А.Н., Бикмуллин А.Г., Сатаева Д.А., Лопухов Л.В. и др. Хроматографические методы анализа белков. — Казань: ФГАОУ ВПО КФУ, 2013. — 48 с.
7. Ковалева Т.А., Сливкин А.И., Беленова А.С., Суслина С.Н. Биотехнология: учеб. пособие. Ч. 1. Микробная биотехнология. Химическая энзимология. — Воронеж: ИЦП ВГУ, 2011. — 90 с.
8. Конохов В.Ю. Хроматография. — СПб.: Изд-во «Лань», 2012. — 224 с.
9. Нортрон Д., Кунитц М., Херриотт Р. Кристаллические ферменты. Пер. с англ. — М.: Наука, 1950. — 346 с.
10. Османов В.К., Бирюкова О.В., Борисова А.В. Методы выделения и очистки продуктов биотехнологических производств. — Н. Новгород: НижГМА, 2005. — 104 с.
11. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. — М.: Наука, 1985. — 536 с.
12. Черников М. П., Никольская Г. В., Стан Е. Я. Гидролиз казеина и некоторых его компонентов протеиназами желудочно-кишечного тракта // Биохимия. — 1967. — Т. 32. — № 6. — С. 1122–1127.
13. Шуваева Г.П., Сучилин С.С., Усачева Е.В. Современные методы очистки медицинских препаратов, полученных микробным синтезом // Актуальная биотехнология. — 2016. — № 1(16). — С. 41–44.
14. Anson M. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin // J. Gen. Physiol. — 1938. — Vol. 22. — P. 79–83.
15. Arfmann H.A., Shaltiel S. Resolution and purification of histones on homologous series of hydrocarbon-coated agaroses // Eur. J. Biochem. — 1976. — Vol. 70. — P. 269–273.
16. Asgeirsson B., Fox J.W., Bjarnason J.B. Purification and characterization of trypsin from the poikilotherm *Gadus morhua* // Eur. J. Biochem. — 1989. — Vol. 180(1). — P. 85–94.
17. Becerra S.P., Clore G.M. et al. Purification and characterization of the reverse transcriptase expressed in recombinant Rnase H domain of Hiv-L *Escherichia coli* // FEBS Letters. — 1990. — Vol. 270. — No. 1, 2. — P. 76–80.
18. Fausnaugh J.L., Kennedy L.A., Regnier F.E. Comparison of hydrophobic-interaction and reversed phase chromatography of proteins // Journal of Chromatography. — 1984. — Vol. 3(1). — P. 141–155
19. Kanaya S., Itaya M. Expression, purification, and characterization of a recombinant ribonuclease H from *Thermus thermophilus* HB8 // Journal of Biological Chemistry. — 1992. — Vol. 267(14). — P. 10184–10192.
20. Kunitz M. Crystalline ribonuclease // Journal of General Physiology. — 1940. — Vol. 24(1). — P. 15–32.
21. Laemmli K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. — 1972. — Vol. 227(1). — P. 680–685.
22. Lazarus L.H., Lee C.-Y., Wermuth B. Application of general ligand affinity chromatography for the mutual separation of deoxyribonuclease and ribonuclease free of protease contamination // Analytical Biochemistry. — 1976. — Vol. 74(1). — P. 138–144.
23. Mccarty M. Purification and properties of desoxyribonuclease isolated from beef pancreas // Journal of General Physiology. — 1946. — Vol. 29(3). — P. 123–139.
24. Queiroz J.A., Tomaz C.T., Cabral J.M.S. Hydrophobic interaction chromatography of proteins // Journal of Biotechnology. — 2001. — Vol. 87. — P. 143–159.
25. Schwert G.W., Takenaka J. A spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsin // Biochem. Biophys. Acta. — 1955. — Vol. 16(4). — P. 570–575.
26. Shaltiel Sh., Er-El. Z. Hydrophobic chromatography: use for purification of glycogen synthetase // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1973. — Vol. 70(3). — P. 778–781.
27. Siekevitz Ph., Palade G.E. A cytochemical study on the pancreas of the guinea pig V. In vivo incorporation of leucine-L-¹⁴C into the chymotrypsinogen of various cell fractions // J. Biophysic. and Biochem. Cytol. — 1960. — Vol. 7(4). — P. 619–634.

MODERN METHODS OF ISOLATION AND PURIFICATION OF ENZYMES. SEPARATION OF TRYPSINOGEN AND CHYMOTRYPSINOGEN

Ye.R. ZABOLOTSKAYA, D.O. VINOKHODOV

St. Petersburg State Technological Institute (Technical University), St. Petersburg

The paper analyzes modern methods for the isolation and purification of enzymes from different types of raw materials, as well as the separation of proteolytic enzymes from nucleases in the extract of the pancreas of cattle. The results of the determination of activities, high performance liquid chromatography and electrophoresis showed the effective separation of a mixture of trypsinogen and chymotrypsinogen. The activity yields were also satisfactory, which makes it possible to continue the subsequent purification.

Keywords: chromatography, enzymes, trypsin, chymotrypsin.

ВЛИЯНИЕ КИСЛОТНОСТИ И КОЛИЧЕСТВА РАСТВОРЕННОГО КИСЛОРОДА В СРЕДЕ НА НАКОПЛЕНИЕ ЭФИРНОГО МАСЛА ПРИ ГЛУБИННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ШТАММОВ РОДА *EREMOTHECIUM*

Е.Ф. СЕМЕНОВА^{1,2*}, А.В. КУРАКОВ³, А.А. КНЯЗЬКОВА², В.С. ПРЕСНЯКОВА⁴

¹ Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Республика Крым;

² Пензенский государственный университет, Пенза;

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,

⁴ Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва

Исследована динамика и установлены закономерности изменения рН и растворенного кислорода в среде при культивировании *Eremothecium ashbyi* и *E. gossypii*, продуцентов эрмотецевого масла. Содержание кислорода в жидкой питательной среде при выращивании *E. ashbyi* и *E. gossypii* варьировало в зависимости от штамма и продолжительности ферментации в диапазоне 37,5–100,0%, а рН культуральной жидкости — от 4,4 до 8,0. В фазу активного роста штаммов идет падение кислотности среды и содержания в ней кислорода. В период продукции масла, в стационарную стадию и перехода к лизису рН среды смещается в щелочную область и повышается количество кислорода в среде. Проведен корреляционно-регрессионный анализ между этими показателями среды, продолжительностью культивирования в лабораторном биореакторе штаммов *E. ashbyi* и *E. gossypii* и продукцией эрмотецевого масла с целью оптимизации для максимального получения ароматического продукта.

Ключевые слова: факторы внешней среды, глубинное культивирование, корреляционно-регрессионный анализ, эрмотецевое масло, *Eremothecium*.

Введение

В настоящее время из-за ограниченности ресурсов и высокой цены традиционных производств эфирных масел из растительного сырья ищут новые пути синтеза «биотехнологического» розового масла. Одним из них является биотехнология получения эфирного масла на основе микромицетов рода *Eremothecium* [1, 2, 8, 9].

На уровень накопления вторичных метаболитов при культивировании микромицетов существенно влияют физико-химические параметры ферментации — рН и количество растворенного кислорода (DO — dissolved oxygen) в среде [4, 6]. На основании этих показателей возможно прогнозировать выход целевого продукта, а при необходимости провести оптимизацию для увеличения эффективности производства. Для этого нужно изучить динамику изменения указанных параметров среды при получении эрмотецевого масла с применением штаммов-

продуцентов, определить коэффициенты парной корреляции и уравнение регрессии для данных показателей [7].

Целью настоящего исследования было изучение динамики рН и содержания растворенного кислорода в среде при глубинном культивировании *Eremothecium ashbyi* и *E. gossypii* и накопления эрмотецевого масла, установление возможной корреляции и корреляционно-регрессивного уравнения между этими параметрами.

Материалы и методы

Объектами изучения служили штаммы *Eremothecium ashbyi* Guilliermond 1935 ВКПМ F-36, ВКМ F-4565, ВКМ F-4566, ВКПМ F-1320 и *Eremothecium gossypii* (S.F. Ashby et W. Nowell 1926) Kurtzman 1995 (синоним *Ashbya gossypii* (S.F. Ashby et W. Nowell 1926) Guilliermond 1928) ВКПМ F-1321, относящиеся к роду *Eremothecium* семейства *Eremotheciaceae* Kurtzman 1995 подотдела *Saccharomycotina* отдела *Ascomycota* [5].

Материал для инокуляции посевных сред готовили культивированием в течение 72–168 ч при температуре 28 °С на скошенных агаризованных средах: соево-сахарозной (г/л сахароза — 10,0; соевая мука — 40,0; агар-агар — 20,0), агаре Сабуро (г/л: глюкоза — 40,0;

© 2020 г. Семенова Е.Ф., Кураков А.В., Князькова А.А., Преснякова В.С.

* Автор для переписки:

Семенова Елена Федоровна, к.б.н., старший научный сотрудник, доцент Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского, профессор Пензенского государственного университета
E-mail: sef1957@mail.ru

пептон — 10,0; агар-агар — 18,0–20,0) и картофельно-глюкозной (декстрозной) (г/л: картофель — 200,0; глюкоза (декстроза) — 20,0; агар-агар — 30,0; рН 6,0).

Посевной материал выращивали глубинным способом в жидких питательных средах следующего состава: соево-сахарозной (г/л: сахароза — 20,0; соевая мука — 20,0, рН 7,0) и глюкозо-пептонной (г/л: глюкоза — 7,5; пептон — 4,0; натрия сукцинат — 2,0; K_2HPO_4 — 0,5; инозит — 0,14; рН 6,5) при непрерывном встряхивании 150–200 об/мин. в течение 24–72 часов при температуре 28 °С. Объем инокулята — 10% от объема засеваемой среды.

Дальнейшее культивирование проводили в 100-литровом биореакторе с датчиками регистрации рН и DO. Ферментацию осуществляли глубинным способом в соево-сахарозной (г/л сахароза — 10,0; соевая мука — 20,0; рН 7,0) и картофельно-глюкозной (г/л: картофельный экстракт — 6,5; глюкоза — 20,0; рН 5,8) питательных средах в течение 36–72 часов при температуре 28 °С и непрерывном перемешивании 400 об/мин, при уровне аэрации 1:1 (400 л/час).

Эрмотецевое масло извлекали методом экстрагирования в соотношении 1:3. В качестве экстрагента использовали гексан марки «хч» (Корея).

Статистическую обработку результатов исследования выполняли с помощью программы Excel (Microsoft, США) и пакета Statistica 6. О варьировании количественных показателей судили по среднему квадратичному отклонению значений от средней арифметической. Корреляцию рассчитывали с помощью коэффициента Пирсона, определяя наличие линейной связи между параметрами ферментации и оценивая ее тесноту и статистическую значимость [3].

Результаты и обсуждение

Уровень растворенного кислорода DO в среде при культивировании штаммов *Eremotechium* варьирует в диапазоне 37,5–100,0%, а рН культуральной жидкости (КЖ) — от 4,4 до 8,0 (табл. 1, 2; рис. 1, 2). Изменение величины рН и содержания кислорода в жидкой питательной среде при выращивании *E. ashbyi* и *E. gossypii* варьировало в зависимости от штамма и ферментации (см. табл. 1, 2). Вместе с тем выявлены четкие закономерности в динамике этих показателей среды в ходе культивирования и продукции штаммами эрмотецевого масла.

Таблица 1

Показатели кислотности среды при продукции эрмотецевого масла штаммами *Eremotechium*

Продолжительность, ч	$\Delta_{\text{min}} \text{pH}$	Среднеквадратичное отклонение рН	Начальное значение рН	Минимальное рН	Конечное значение рН	Эрмотецевое масло, мг/л
<i>E. ashbyi</i> ВКПМ F-36						
70	2,47	0,76	6,63	5,23	7,70	206,6
<i>E. ashbyi</i> ВКМ F-4565						
66	1,53	0,29	6,25	5,52	7,05	208,9
<i>E. ashbyi</i> ВКМ F-4566 (ферментация №1)						
36	2,58	0,70	6,54	5,36	7,94	206,0
<i>E. ashbyi</i> ВКМ F-4566 (ферментация №2)						
44	3,08	1,02	6,35	4,79	7,87	242,2
<i>E. ashbyi</i> ВКПМ F-1320						
42,5	3,15	0,77	6,22	4,44	7,59	500,0
<i>E. gossypii</i> ВКПМ F-1321						
72	0,96	0,28	5,95	4,99	5,62	566,1

В период активного роста происходило закисление культуральной жидкости до 4,4–4,7, а в стационарную фазу и фазу лизиса регистрировали увеличение рН до 7,8...8,0. То есть, рН ферментации вначале падало от 6,0–6,5 до 4,4–5,5, а затем возрастало до 5,6–8,0 у

разных штаммов. Синтез масла активно проходил с 30–36 часов культивирования продуцента и затем снижался [8]. В целом, этот диапазон рН соответствует оптимальным значениям кислотности для достижения высокого уровня накопления биомассы микроорганизмов [2].

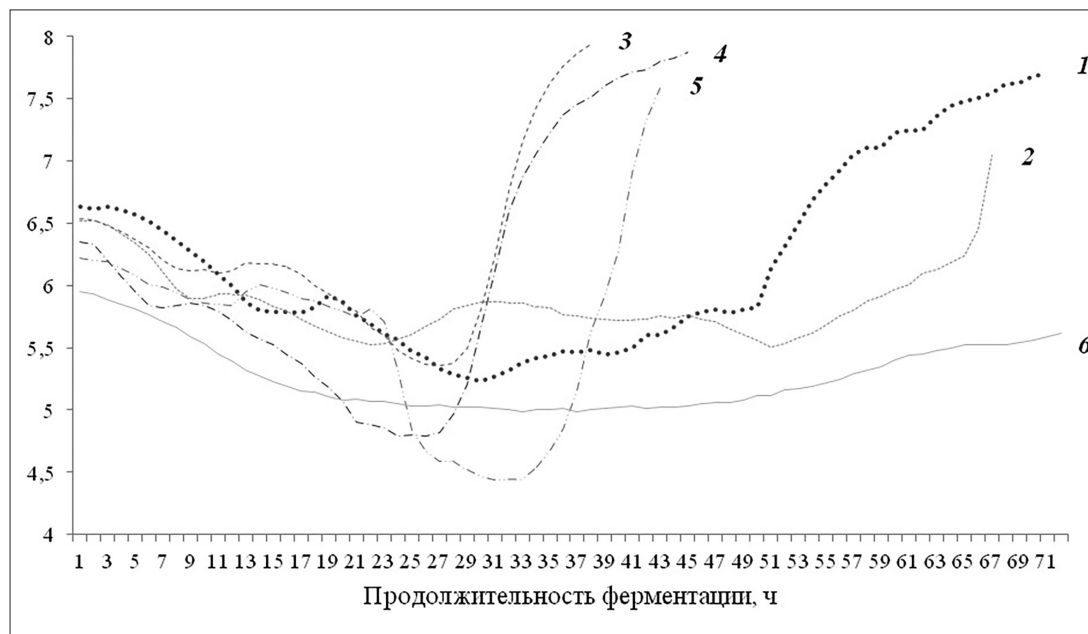


Рис. 1. Динамика рН культуральной жидкости при глубинном культивировании штаммов *E. ashbyi* и *E. gossypii*: ВКПМ F-36 (1), ВКМ F-4565 (2), ВКМ F-4566 (ферментация № 1) (3), ВКМ F-4566 (ферментация № 2) (4), ВКПМ F-1320 (5); ВКПМ F-1321 (6)

Максимальный диапазон изменения количества растворенного кислорода (DO) в жидкой питательной среде при культивировании штаммов *E. ashbyi* и *E. gossypii* 73% — от 37 до 100% у *E. ashbyi* ВКМ F-4566. На стадии активного роста наблюдали, как и в случае с рН среды, сниже-

ние содержания растворенного кислорода до 37,5...53,9%, а затем, в стационарную фазу и фазу лизиса показатель DO постепенно увеличивался, возвращаясь к первоначальным значениям (см. рис. 2). Уменьшение DO в среде четко соответствует периоду активного роста штаммов.

Таблица 2

Показатели растворенного кислорода в среде при продукции эремотецевого масла штаммами *Eremothecium*

Продолжительность, ч	Среднее значение DO не надо, непонятно что оно дает	$\Delta_{lim} DO$	Среднеквадратичное отклонение DO	Начальное значение DO	Конечное значение DO	Минимальное значение DO	Эремотецевое масло, мг/л
<i>E. ashbyi</i> ВКПМ F-36							
70	80	47,0	12,07	100	82,7	53,5	206,6
<i>E. ashbyi</i> ВКМ F-4565							
66	68	62,5	13,80	100	85,8	37,5	208,9
<i>E. ashbyi</i> ВКМ F-4566 (ферментация №1)							
36	87	53,6	14,27	99,8	107,4	53,9	206,0
<i>E. ashbyi</i> ВКМ F-4566 (ферментация №2)							
44	88	30,2	8,30	98,0	93,7	70,7	242,2
<i>E. ashbyi</i> ВКПМ F-1320							
42,5	81	61,0	19,27	100,0	92,6	39,6	500,0
<i>E. gossypii</i> ВКПМ F-1321							
72	96	25,7	7,02	99,1	108,4	86,4	566,1

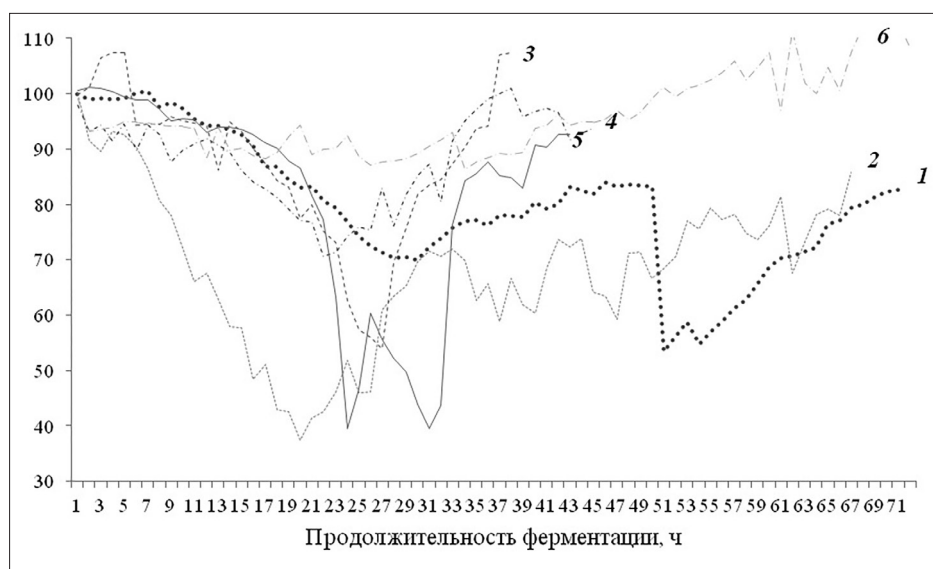


Рис. 2. Динамика растворенного кислорода в среде (DO культуральной жидкости) при глубинном культивировании штаммов *E. ashbyi* и *E. gossypii*: ВКПМ F-36 (1), ВКМ F-4565 (2), ВКМ F-4566 (ферментация № 1) (3), ВКМ F-4566 (ферментация № 2) (4), ВКПМ F-1320 (5); ВКПМ F-1321 (6)

Проведен корреляционный анализ между показателями рН и уровнем растворенного кислорода в средах при выращивании штаммов для получения эремотецевого масла (табл. 3). Между этими показателями у большинства изученных штаммов имеется прямая корреляция, причем коэффициент корреляции довольно высокий: 0,7–0,8.

Таблица 3

Коэффициент корреляции между рН и уровнем растворенного кислорода в средах при продукции эремотецевого масла штаммами *E. ashbyi* и *E. gossypii*

Штамм, номер ферментации	Коэффициент парной корреляции	Доверительный интервал
<i>E. ashbyi</i>		
ВКМ F-4565	0,692	0,542 – 0,799
ВКМ F-4566, №1	0,682	0,238 – 0,719
ВКМ F-4566, №2	0,813	0,682 – 0,893
ВКПМ F-1320	0,710	0,573 – 0,809
<i>E. gossypii</i>		
ВКПМ F-1321	0,454	0,249 – 0,621

Проведение корреляционно-регрессионного анализа позволило обнаружить связь между показателями рН и уровнем растворенного кислорода в средах при выращивании штаммов *E. ashbyi* и *E. gossypii* и содержанием эремотецевого масла в культуральной жидкости. Накопление целевого ароматического продукта *E. ashbyi* и *E. gossypii* связано с

этим параметрами среды и продолжительностью ферментации следующим уравнением регрессии:

$$y = 3214,42 - 251,46x_1 - 6,28x_2 - 8,16x_3,$$

где y — содержание эремотецевого масла, мг/л КЖ,

x_1 — конечное значение рН ферментации,

x_2 — конечное значение DO, %,

x_3 — продолжительность ферментации, ч.

Из этих физико-химических показателей среды более существенным параметром по влиянию на количество продуцируемого грибами эремотецевого масла было значение рН в конце ферментации.

Заключение

Изучение влияния физико-химических условий на накопление биологически активных соединений необходимо для увеличения продуктивности эремотецевого масла селекционированными штаммами грибов *E. ashbyi* и *E. gossypii* [8]. При установлении зависимости между факторами среды и количеством целевого продукта можно создать оптимальные условия для максимального использования ресурсов и синтеза биотехнологического «розового» масла.

Исследовали динамику изменения рН и растворенного кислорода в среде при культивировании продуцентов эремотецевого масла штаммами *E. ashbyi* и *E. gossypii*, которые характеризуются различной продуктивностью и качественным составом ароматических продуктов [9]. Установ-

лено, что в фазу активного роста штаммов идет падение кислотности среды и содержания в ней кислорода; в период продукции масла, в стационарную стадию и перехода культур к лизису рН среды смещается в щелочную область и повышается количество кислорода в среде. Между динамикой показателей рН и DO установлен высокий положительный коэффициент корреляции.

Проведен корреляционно-регрессионный анализ данных по этим условиям среды и продолжительностью культивирования в лабораторном биореакторе штаммов *E. ashbyi* и *E. gossypii* с продукцией эрмотецевого масла. Наибольшая связь с накоплением эрмотецевого масла выявлена для значений рН среды. Уравнение регрессии может быть использовано при оптимизации условий ферментации в биореакторе для получения максимального количества эрмотецевого масла.

Литература

1. Семенова Е.Ф., Шпичка А.И., Преснякова Е.В., Меженная Н.А. К вопросу организации процессов накопления эфирного масла в лепестках *Rosa* (*Rosaceae*) и мицелии *Eremothecium* (*Eremotheciaceae*) // Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада. — 2016. — № 118. — С. 27–37.
2. Семенова Е.Ф., Шпичка А.И., Преснякова Е.В. Накопление ароматического и монотерпеновых спиртов штаммами *Eremothecium ashbyi* с различным уровнем рибофлавиногенеза // Прикладная биохимия и микробиология. — 2017. — Т. 53. — № 3. — С. 333–340.
3. Трухачева Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. — 384 с.
4. Foerster C., Revuelta J.L., Kraemer R. Carrier-mediated transport of riboflavin in *Ashbya gossypii* // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2001. — Vol. 55. — P. 85–89.
5. Kurtzman C.P. Relationships among the genera *Ashbya*, *Eremothecium*, *Holleya* and *Nematospora* determined from rDNA sequence divergence // Journal of Industrial Microbiology. — 1995. — Vol. 14. — P. 523–530.
6. Lim S.H., Ming H., Park E.Y., Choi J.S. Improvement of riboflavin production using mineral support in the culture of *Ashbya gossypii* // Food Technol. Biotechnol. — 2003. — Vol. 41(2). — P. 137–144.
7. Pujari V., Chandra T.S. Statistical optimization of medium components for improved synthesis of riboflavin by *Eremothecium ashbyi* // Bioprocess Engineering. — 2000. — Vol. 23. — P. 303–307.
8. Semenova E.F., Presnyakova E.V., Shpichka A.I., Presnyakova V.S. Chapter 15 *Eremothecium* Oil Biotechnology as a Novel Technology for the Modern Essential Oil Production / Essential Oil Research. S. Malik (ed.). — Springer Nature Switzerland AG, 2019. — P. 401–435.
9. Semenova E.F., Shpichka A.I., Presniakova E.V., Presniakova V.S., Goncharov M.A., Goncharov D.A. Development of a novel biotechnological fragrant product, *Eremothecium* oil // Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research. — 2017. — Vol. 51. — Issue 3 (Special Issue). — P. 136–138.

THE EFFECT OF ACIDITY AND THE AMOUNT OF DISSOLVED OXYGEN IN THE MEDIUM ON THE ACCUMULATION OF ESSENTIAL OIL DURING THE DEEP CULTIVATION OF STRAINS OF THE GENUS *EREMOTHECIUM*

E.F. SEMENOVA^{1,2}, A.V. KURAKOV³, A.A. KNYAZKOVA², V.S. PRESNYAKOVA⁴

¹ V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Republic of Crimea; ² Penza State University, Penza;

³ M.V. Lomonosov Moscow State University, ⁴ Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow

The dynamics is studied and the laws of pH and dissolved oxygen changes in the medium are established during the cultivation of *Eremothecium ashbyi* and *E. gossypii*, producers of eremotse oil. The oxygen content in the liquid nutrient medium during the cultivation of *E. ashbyi* and *E. gossypii* varied depending on the strain and the duration of fermentation in the range of 37.5–100.0%, and the pH of the culture fluid was from 4.4 to 8.0. In the phase of active growth of strains, there is a decrease in the acidity of the medium and the oxygen content in it. During the period of oil production, in the stationary stage and the transition to lysis, the pH of the medium shifts to the alkaline region and the amount of oxygen in the medium increases. A correlation and regression analysis was performed between these environmental parameters, the duration of cultivation of *E. ashbyi* and *E. gossypii* strains in the laboratory bioreactor, and the production of eremotse oil in order to optimize the maximum production of aroma product.

Keywords: environmental factors, deep cultivation, correlation and regression analysis, eremotse oil, *Eremothecium*.

ПРИМЕНЕНИЕ СОРБЕНТОВ В ПОДГОТОВКЕ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА (ОБЗОР)

И.В. ЖАРНИКОВА*, С.А. КУРЧЕВА, Т.В. ЖАРНИКОВА, Е.А. КОТЕНЁВА,
А.С. ГЕОГДЖАЯН, О.А. ГНУСАРЕВА, А.В. КАЛИНИН,
О.И. ЦЫГАНКОВА, А.Г. КОШКИДЬКО

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь

В обзоре представлены современные сведения по проблеме применения сорбентов в подготовке образцов для масс-спектрометрического анализа. Рассмотрены различные виды сорбентов, применяемых исследователями для пробоподготовки к масс-спектрометрии объектов из окружающей среды и клинического материала.

Ключевые слова: сорбент, магнитный сорбент, масс-спектрометрический анализ.

Введение

В настоящее время лабораторная диагностика инфекций базируется как на традиционных (бактериологические, биологические, иммунологические, аллергические), так и современных молекулярно-биологических и физико-химических методах: полимеразная цепная реакция (ПЦР), полногеномное секвенирование (WGS), протеомное профилирование и идентификация патогенов методами масс-спектрометрии (МС). Однако использование трудоемких бактериологических методов для выделения чистой культуры и идентификации возбудителя, как правило, требует нескольких дней, а иммунологические методы эффективны не ранее, чем с 7-го дня болезни. Безусловными преимуществами обладают ПЦР- и МС-анализ. Например, ПЦР позволяет в течение 3 ч определить наличие ДНК возбудителя в анализируемом образце, включая антиген-измененные штаммы. К недостаткам указанных методов можно отнести высокую вероятность микробной контаминации, особенно при работе с тест-системами с электрофоретической детекцией, а также низкую пропускную способ-

ность, то есть отсутствие возможности анализировать одновременно широкий спектр возбудителей в большом количестве проб.

Современная масс-спектрометрия, и в особенности, времяпролетная MALDI масс-спектрометрия (MALDI-TOF MS) является общепризнанным и надежным методом качественного и количественного (в сочетании с высокоэффективной жидкостной хроматографией) анализа многокомпонентных смесей, в том числе бактериальных экстрактов [64]. Метод основан на воздействии импульсами лазерного излучения на матрицу с анализируемым веществом. Основное преимущество MALDI-TOF MS состоит в том, что этот метод дает возможность определять молекулярные массы белков без предварительного расщепления на пептиды. На сегодняшний день MALDI-TOF MS зарекомендовал себя как высокоспецифичный и быстрый метод при идентификации различных микроорганизмов [33, 61]. Ежегодно появляются экспериментальные работы, описывающие применение данной технологии для типирования и идентификации бактерий и бактериальных токсинов, проведения экспресс-тестов на антибиотико-резистентность [26].

Подготовка проб к исследованию (твердофазная экстракция)

Преаналитический этап (подготовка пробы к исследованию) имеет большое значение в обеспечении качества всех лабораторных исследований. Эффективность экстракции исследуемой пробы определяется степенью извлечения аналита и фоновым шумом, вызванным коэк-

© 2020 г. Жарникова И.В., Курчева С.А., Жарникова Т.В., Котенёва Е.А., Геогджаян А.С., Гнусарева О.А., Калинин А.В., Цыганкова О.И., Кошкидько А.Г.

* Автор для переписки:

Жарникова Ирина Викторовна

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора

E-mail: ivj-biotech@yandex.ru

страгируемыми компонентами матрицы. Эти два фактора необходимо оптимизировать таким образом, чтобы обеспечивалось селективное и чувствительное определение аналита. В практике широкое применение нашли методы жидкостной (ЖЭ) и твердофазной экстракции (ТФЭ), характеризующиеся значительным диапазоном концентрирования и способностью избирательно извлекать компоненты интересующих классов. Основным недостатком ЖЭ представляют длительность процедуры, необходимость применения дополнительного оборудования, большого количества особо чистых растворителей и значительные трудозатраты, а также недостаточная селективность разделения и низкие степени извлечения аналита [2].

Для ТФЭ характерны более широкие возможности варьирования типов взаимодействий образца с сорбентом и элюентом, чем для ЖЭ, вследствие чего появляется возможность более селективного и количественного концентрирования и/или извлечения аналитов с участием специфических взаимодействий (ионообменные механизмы, сродство к органической фазе) [16].

При ТФЭ возможно применение сорбентов с различными специфическими характеристиками по отношению к искомым классам соединений. В последнее время все шире подключают сверхсшитые полистирольные сорбенты, отличающиеся лучшими сорбционными качествами по сравнению с традиционными обращенно-фазовыми сорбентами типа С8 и С18, а в некоторых случаях — и по сравнению с аналогичными сорбентами на основе полидивинилбензола. Сверхсшитые полистиролы имеют развитую поверхность, способны выдерживать механическое воздействие и эффективно взаимодействовать с любой органической жидкостью независимо от ее природы без дополнительной пробоподготовки при анализе различных объектов [29]. Катионообменную ТФЭ смешанного типа, сочетающую обращенно-фазовый и ионообменный механизмы удерживания, можно назвать наиболее эффективным вариантом пробоподготовки. Применение этого типа подготовки объектов к анализу позволяет достигать высоких степеней извлечения (>90%) полярных и неполярных соединений при минимальном значении матричного эффекта [32].

Твердофазная экстракция на импринтированном сорбенте включает в себя те же стадии, что и обычная ТФЭ (кондиционирование сорбента, пропускание образца, промывка и элюирование), но имеет ряд особенностей. На стадии сорбции важную роль играет природа растворителя: обычно, если анализируемый образец растворен в малополярном растворителе, сорбция селективна, то есть компоненты матрицы не удерживаются; если

же анализируют водный раствор, то аналит и мешающие компоненты неспецифично удерживаются на сорбенте (в основном за счет водородных связей). Вследствие этого для достижения селективной сорбции перед стадией элюирования необходима промывка органическим растворителем. На этапе элюирования предпочтительно применить как можно меньший объем растворителя, который, тем не менее, должен быть достаточным для извлечения целевых соединений с картриджа. Чаще всего элюирование проводят такими реагентами, как метанол, ацетонитрил, а также элюенты с добавлением гидроксида аммония или муравьиной кислоты в зависимости от исследуемого аналита [49, 50, 59, 67]. Однако взаимодействие аналита с импринтированным сорбентом иногда настолько сильно, что возникает необходимость увеличения объема элюента. Во избежание этого предлагается смесь органических растворителей или органического растворителя с водой, а также такие активные растворители, как уксусная кислота или пиридин [53]. После завершения процедуры извлечения аналита полученный элюат выпаривают досуха и растворяют в подходящем растворителе.

Металл-аффинная хроматография. Значение сорбентов

Некоторые исследователи для фракционирования белков используют сорбенты на основе прочно зафиксированных ионов металлов. Принцип металл-аффинной хроматографии (МАХ) основан на сродстве ионов переходных металлов, таких как Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} и Co^{2+} , к гистидину и цистеину в водных растворах. Реакция образования комплекса иона металла и некоторых функциональных групп (например, фосфатных групп) биологических молекул, как правило, обратима; следовательно, иммобилизованные ионы металлов можно задействовать как сорбент. Известно применение МАХ в диагностике заболеваний при подготовке образцов сыворотки крови, мочи и тканей для выявления биомаркеров с последующим применением методов масс-спектрометрии [39]. Традиционно для МАХ в качестве носителя-подложки служит мягкий гель, например, линейный полисахарид — агароза вследствие значительной биологической совместимости, но с достаточно низкой механической прочностью. Использование сорбента на основе неорганической матрицы, такого как диоксид кремния, дает возможность отметить его превосходные механические свойства, однако исследователи наблюдают характерную необратимую неспецифическую сорбцию

белков [28]. Хелатные сорбенты, как и оксидные, позволяют в высокой степени селективно выделять фосфорсодержащие пептиды и белки. Однако имеет место и неспецифичная сорбция примесей, подавить которую полностью не удастся, а также возможность вымывания металла из сорбента во время элюирования. Кроме того, для работы с такими сорбентами необходимо дополнительное оборудование (спиновые колонки, качающаяся платформа). Немаловажным фактором представляется и высокая стоимость таких сорбентов.

В работах отечественных исследователей описано применение регулярных мультимолекулярных структур — пленок Ленгмюра — Блоджетт — (ПЛБ) на основе стеаратов трехвалентных металлов, содержащих лабильную ковалентную связь, в качестве сорбента для МАХ водорастворимых органических и биоорганических соединений, имеющих в составе атомы кислорода или фтора, что способствует повышению селективности и степени концентрирования. Преимуществом данного метода получения сорбента является то, что поверхность структуры состоит практически полностью из ионов металла, химически связанных с молекулами органической матрицы. В дальнейшем применение указанного сорбента возможно для селективного концентрирования пептидов, с последующей промывкой, элюцией и исследованием пробы в MALDI-TOF MS [9, 10].

Шиловских В.В. указывает на то, что особенность ПЛБ представлена возможностью получения поверхности, равномерно заполненной ионами металла. ПЛБ, благодаря предсказуемым свойствам, большой удельной поверхности и легкости получения, представляют собой привлекательный материал для практического применения — получения металл-аффинных сорбентов, которые предназначены для обогащения и разделения пептидов на основании различного сродства гетероатома в составе пептида к иону металла сорбента. Автором разработаны два новых сорбента, содержащих в составе ионы лантана (III), установлена их специфическая сорбционная способность по отношению к фосфорилированным пептидам: дисперсные частицы хромита лантана, полученные методом золь-гель синтеза, индуцированного микроволновым излучением, и коллапсированные монослои дистеарата лантана. Сделано предположение, что в присутствии полярного растворителя коллапсированные полислои могут расправляться, тем самым увеличивая эффективную поверхность, доступную для сорбции [14].

В работе Гладилович В.Д. показаны возможности коллапсированных монослоев — ПЛБ на основе стеарата железа (III) — металл-хелатный сорбент (МХС) Fe(III)

[1]. Золь-гель методом с совместным самораспространяющимся синтезом, индуцированным микроволновым излучением, были получены наноразмерные структуры на основе оксида железа (III) — металл-оксидный сорбент (МОС) Fe (III). Была определена возможность их применения в качестве металл-аффинных сорбентов и оптимизированы условия выделения фосфорилированных пептидов с целью повышения селективности анализа. Исследования фосфорилированных триптических пептидов казеина быка и синтетических пептидов, фосфорилированных по различным аминокислотам, выявили, что разработанные сорбенты обладают высокой селективностью и могут быть применены для анализа биологических образцов.

Кельцовой О.А. с коллегами для проведения анализа был изучен регулярный мультимолекулярный сорбент на основе стеарата железа (III) [3]. Сорбент характеризовался высокой сорбционной емкостью, а также высокой специфичностью к соединениям, обладающим атомами — жесткими основаниями Льюиса. Авторами было установлено, что использование на стадии пробоподготовки метода МАХ на Fe (III)-содержащем сорбенте позволяет избавиться от матричных эффектов и значительно повысить селективность анализа пробы в воде, что достаточно для большинства образцов природной воды [13].

МАХ с применением сорбентов, содержащих ионы трехвалентных металлов, — высокоспецифичный метод пробоподготовки. Исследователями Uma K. et al., Черновой Е.Н. с соавторами доказано, что иммобилизованные ионы металлов можно задействовать как сорбент, причем разрушить комплекс можно в мягких денатурирующих условиях [13]. Взаимодействие с белками и пептидами строго рН-зависимое, поэтому связанные пептиды можно элюировать, изменяя рН, уменьшая ионную силу буфера или действуя другие хелатирующие агенты, такие как ЭДТА или имидазол. Селективность жестких и промежуточных ионов различна; так, при оптимальном рН (кислом и нейтральном соответственно) они координируются с разными аминокислотными остатками или модификациями на поверхности молекулы белка, что способствует селективному разделению и становится возможным одношаговое выделение белков из сложных биологических смесей [51].

В настоящее время известны два принципиальных типа сорбентов для МАХ: хелатные на основе ионов металлов, хелатированных полидентантными лигандами, иммобилизованными на вспомогательной подложке (силикагель, агароза, сефароза, сшитый сополимер по-

листирола и дивинилбензола) [20]; твердотельные на основе оксидов металлов, чаще всего в виде свободных нанопорошков, либо связанных на инертном носителе [41]. Самым распространенным является оксид титана TiO_2 , которому посвящено большое число работ по оптимизации условий проведения анализа [54]. Было продемонстрировано, что оксид титана более устойчив к влиянию солей, детергентов и малых молекул, чем классические металл-аффинные сорбенты [58]. Много внимания исследователей уделено оксиду циркония ZrO_2 [44]. Также были предприняты успешные попытки использовать в качестве сорбента для обогащения фосфорилированных пептидов гидроксид алюминия $\text{Al}(\text{OH})_3$ [56], оксид галлия Ga_2O_3 [45], оксид ниобия Nb_2O_5 [43], оксид олова SnO_2 , который показал более низкий уровень неспецифического связывания по сравнению с TiO_2 [57].

Однако к серьезным недостаткам метода МАХ относится неспецифичное связывание с сорбентом таких аминокислот, как глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, гистидин и цистеин, и других отрицательно заряженных соединений. На протяжении последних десятилетий предпринимаются попытки уменьшить неспецифическую сорбцию различными способами. Так, можно варьировать рН раствора, в котором происходит связывание (связывающий буфер) или рН промывочного раствора [22, 30]. Несмотря на успешное применение этого подхода на стандартных белках, при переходе на уровень протеома селективность метода снижается до 60–70%, что приводит к недостаточно эффективной идентификации фосфорилированных белков.

Другие варианты сорбентов

Наиболее перспективными представляются системы с неполярными или малополярными сорбентами. Связано это с тем, что сорбция на данных сорбентах, обусловленная распределением гидрофобных соединений между водной фазой и гидрофобным сорбентом, обратима. Соединения металлов легко десорбируют при смене полярности растворителя такими элюентами, как 96% этанол [65], 1 М раствор HCl в 96% этаноле [23], метанол и ацетон [7], 1% раствор HNO_3 в метаноле [21].

Кузнецова Е.С. с соавторами описывают исследования сорбированных на различных сажах модельных соединений (пяти аминокислот) для оценки возможности их определения. Наиболее часто в масс-спектрометрическом исследовании как сорбенты были употреблены углеродные материалы различной природы [6, 69]. В качестве сорбентов авторы брали различные типы саж: графити-

рованная термическая сажа Carborack, графитированная печная сажа ПМ-16Э, печная сажа ПМ-75 и Vulcan XC 72R. Показано, что добавление к исследуемым сажам хлорида серебра повышает информативность и чувствительность определения исследуемых соединений. Метод МАЛДИ с применением предложенных сорбентов дает возможность проводить анализ с достаточно простой пробоподготовкой и высокой чувствительностью. Исследователями найдено, что идентификация соединений по аддукту с ионом серебра удобна по нескольким причинам. Во-первых, аддукт с серебром состоит из двух изотопных пиков, а не из одного, что обеспечивает повышение надёжности идентификации соединений, сорбированных на сажах. Кроме того, благодаря высокой ионизирующей способности, аддукты серебра имеют значительно большую эффективность [6]. Эффективность введения хлорида серебра, выражающаяся в увеличении чувствительности выявляемого объекта в 5–10 раз, подтверждена в ряде отечественных и зарубежных работ [5, 46].

Матричный эффект часто непосредственно связан с недостаточной очисткой исследуемого биологического образца. При этом уменьшение объема вводимой пробы или разбавление образца может резко сказаться на чувствительности метода [68]. Таким образом, оптимизация процедуры очистки образца имеет первостепенное значение.

Обсуждение влияния способа пробоподготовки и природы биологического объекта на матричный эффект при количественном хромато-масс-спектрометрическом анализе лекарственных препаратов методом постколоночного введения биологической матрицы, подготовленной к анализу, показано на примере морфина. Три вида биологических жидкостей (моча, слюна и плазма крови) были подвергнуты процедуре осаждения белков и ТФЭ. Установлено, что рассмотренные варианты подготовки пробы к анализу могут приводить как к уменьшению, так и к росту матричного эффекта [31].

Обнаружение матричного эффекта еще раз доказывает, что привлечение даже такой мощной аналитической техники, как тандемная масс-спектрометрия, не гарантирует отсутствия проблем, связанных с ингибирующим влиянием матричных компонентов при определении аналитов в биообъектах.

Севко Д.А. на примере импринтированного экдистеном сорбента на основе наночастиц диоксида титана с нанесенным золь-гель методом показано преимущество сорбентов с молекулярными отпечатками по сравнению с коммерчески доступным обращенно-фазовым силикагелем для группового извлечения фитостероидов при

подготовке проб из растительных экстрактов и лекарственных препаратов. Широко применяемые неорганические носители отличаются от органополимерных тем, что аналит не может проникать в глубь таких носителей и, соответственно, импринтинг с их использованием всегда бывает поверхностным. В работе Севко Д.А. рассмотрены способы получения молекулярных отпечатков разных типов на поверхности неорганических сорбентов на основе кремнезема, диоксида титана и оксидов железа, в том числе наноструктурированных, и применения этих материалов — в основном, в твердофазной экстракции [11]. Благодаря своей стабильности, подходящим физическим свойствам кремнезем стал наиболее часто употребляемым материалом при получении частиц ядро-оболочка (core-shell) [17, 34].

Создание молекулярно-импринтированных полимеров (МИП) — перспективный способ получения систем для селективного разделения и концентрирования компонентов сложных смесей. Количество разработок в области МИП в последние годы растет из-за их способности к селективному распознаванию, простоты их синтеза, термической и химической стабильности. Эти материалы находят применение в различных областях для разделения и выделения определяемых соединений [63]. МИП-ТФЭ при подготовке образцов уменьшает фоновый сигнал и мешающее влияние сопутствующих компонентов [60].

В качестве полимерной матрицы также может быть подключен хитозан — биоразлагаемый аминополисахарид, содержащий большое число amino- и гидроксильных групп. А импринтированный 2,4-дихлорфенолом слой хитозана, успешно закрепленный на частицах TiO_2/Fe_3O_4 , позволяет при дальнейшем их использовании с целью разложения 2,4-дихлорфенола повысить эффективность процесса до 98% [24].

Стратегии пробоподготовки: новые возможности

Выбор стратегии пробоподготовки зависит как от химических свойств аналита, так и от умения исследователя оптимизировать процесс. К одним из современных тенденций в пробоподготовке относятся миниатюризация, автоматизация, «on-line» пробоподготовка. Миниатюризация реализована в установках для микротвердофазной экстракции (МТФЭ). Она обычно выполняется с помощью волокон и капиллярных трубок с покрытием соответствующей неподвижной фазой. Экстракция или адсорбция аналитов происходит на внешней поверхности волокна. В другом варианте

картридж для МТФЭ представляет собой сменную иглу, которая внутри заполнена определенным адсорбентом. Адсорбент находится в микрокартридже в верхней части иглы. Важным преимуществом МТФЭ служит минимальная времязатратность. В распространенных методах экстракции — жидкостно-жидкостной экстракции и при сорбционном концентрировании — процедура извлечения аналитов продолжается, по крайней мере, 15–20 мин. В отличие от них, в методе МТФЭ экстракция занимает на порядок меньшее время $\approx 1–2$ мин. Для анализа биологических образцов, где объем пробы часто ограничен, МТФЭ подходит идеально: большое количество образца не требуется. Автоматизация пробоподготовки реализуется как для осаждения белков, так и для экстракций обоих видов [66]. Автоматизация позволяет избежать грубых ошибок, увеличить производительность и надежность анализа, уменьшает влияние аналитика на результаты.

Сорбенты на основе оксидов металлов могут быть представлены в различном аппаратурном исполнении. Наиболее распространен «off-line» вариант, обеспечивающий гибкость в подборе растворителей и масштабируемости эксперимента. Частицы оксидов металлов могут быть упакованы в носики для автоматических пипеток (сорбция достигается путем многократного пропускания образца через сорбент) [47], либо помещены в спиновые колонки (образец пропускают через сорбент с помощью центрифуги). В работе [15] описан метод пробоподготовки путем микроэкстракции шприцем, заполненным сорбентом с дальнейшей постановкой масс-спектрометрии. Обнаружено, что такой подход минимизирует обработку пробы и сокращает время и стоимость анализа. Альтернативно возможен batch-вариант, в котором сорбент помещен в микропробирку, что позволяет веществу дольше взаимодействовать с ним. В «on-line»-режиме оксиды металлов помещают в предколонки для ВЭЖХ-систем [52].

Одно из перспективных решений — это «on-line» пробоподготовка. Она реализована как для жидкостно-жидкостной экстракции (ЖЖЭ) с использованием мембран, так и для ТФЭ [48]. Методы «on-line» ЖЖЭ основаны на диффузии аналитов из жидкой матрицы (фаза донора) к жидкой фазе акцептора. Функциональное назначение мембраны — обычно в качестве фазового разделителя или физического барьера. Подвижная фаза проходит через образец, аналиты поступают сразу в колонку. В качестве мембран выступают полые волокна, обеспечивающие низкое сопротивление потоку. Таким образом, миниатюризация, автоматизация, «on-line»

пробоподготовка позволяют снизить время анализа лекарственного препарата в плазме крови, что особенно актуально, когда в клиническом исследовании задействовано 500–2000 образцов.

Часто для заполнения картриджей используются сорбенты на основе силикагеля с иммобилизованными катионными или анионными [50] функциональными группами. Одним из важнейших достоинств таких сорбентов служит высокая скорость установления равновесия процессов сорбции и десорбции, позволяющих работать при достаточно быстром пропускании анализируемой пробы. Другое их преимущество дает постоянство объема сорбента при контакте с органическими и водно-солевыми растворами. Сорбенты на основе силикагеля не требуют длительного предварительного набухания и после проведения кратковременной активации и кондиционирования (либо регенерации) снова готовы к работе.

Сорбент в HLB-картриджах представляет собой модифицированный полистирол, обладающий одновременно свойствами гидрофильности и липофильности. Он способен оставаться увлажненным водой и удерживать широкий спектр полярных и неполярных молекул. Это — один из наиболее популярных видов сорбентов для сорбционного концентрирования при анализе препаратов в плазме крови [49].

Самым перспективным следует признать использование оксида железа, как в варианте магнитных шариков Fe_3O_4 [40], так и микроразмерного Fe_2O_3 [35]. Частицы оксидов металла, в частности, Fe_3O_4 , имеют нанометровый размер и высокую магнитную восприимчивость. Отмечается их значительное преимущество при пробоподготовке для извлечения и концентрирования аналитов из сложных образцов, так как разделение можно осуществить в одну стадию с помощью постоянного магнита, без применения центрифугирования или фильтрации.

Натаровым В.О. с соавторами сообщено о применении метода химического соосаждения на базе доступных неорганических прекурсоров для получения водной дисперсии нанокompозитных частиц $\gamma-Fe_2O_3/SiO_2$, применяемой для выделения и очистки аналитов методом магнитной сепарации [8]. Покрытие магнитных частиц оболочкой кремнезема открывает перспективу в дальнейшем получать широкий спектр функциональных групп на поверхности частиц SiO_2 [36, 38]. Распространены также методы модификации магнетита, основанные на послойном нанесении поверхностно-активных веществ (ПАВ). Наиболее широко применяют катионные ПАВ

— цетилтриметиламмония бромид (ЦТАБ), цетилпиридиния хлорид, а также анионы длинноцепочечных жирных кислот [4, 19].

Недавно появились разработки наночастиц на основе оксидов металлов, тонкий слой оксида наносится на наноразмерные магнитные шарики или на полимерную подложку. Эта структура обладает большой удельной поверхностью и повышенной сорбционной емкостью по сравнению с традиционными металл-аффинными сорбентами, однако есть сомнения по поводу ее воспроизводимости. Также имеются сведения о создании модифицированных сорбентами мишеней для МАЛДИ-масс-спектрометрии [22, 55].

Thingholm T.E. et al. показали новый подход — последовательное элюирование сорбента для разделения моно- и мультифосфорилированных пептидов при варьировании элюентов. По сравнению с проточным вариантом МАХ, batch-анализ (в пробирке) продемонстрировал прекрасную степень извлечения и моно-, и мультифосфорилированных пептидов. Таким образом, экспериментальные условия сильно влияют на производительность и селективность МАХ [62]. Метод получил быстрое развитие во многих направлениях биоанализа, и в последние годы круг задач, решаемых с его помощью, стремительно расширяется.

В настоящее время MALDI-TOF масс-спектрометрия активно используется для детекции особо опасных патогенов [12].

Существует ряд как экспериментальных, описываемых в оригинальных авторских исследованиях, так и коммерческих, получивших сертификат на применение в клинической и лабораторной практике сорбентов. Среди коммерческих наборов особое внимание стоит обратить на серию наборов компании Bruker Daltonics, нашедшей применение разным типам магнитных сорбентов для таргетного обогащения исследуемого образца. Пептиды и белки извлекаются из сложного биологического материала и концентрируются на поверхности магнитных микрочастиц. Элюированные молекулы наносят непосредственно на мишень MALDI-TOF без дополнительных стадий очистки. Все этапы обработки образца могут быть выполнены посредством ручного магнитного сепаратора или полностью автоматизированы благодаря подходящим роботизированным системам для повышения пропускной способности образца. Масс-спектры получают с помощью масс-спектрометров MALDI-TOF. Программное обеспечение дает возможность визуализировать и сравнивать большие наборы данных, оценивать статистические пики, распознавать шаблоны и,

таким образом, обнаруживать кандидаты в биомаркеры. Применение магнитных частиц с разной функциональной группой позволяет избирательно извлекать разные пептиды и белки, увеличивая вероятность нахождения целевого анализа. В настоящее время выпускаются наборы с магнитными частицами трех видов: MB-NIS 8, MB-WCX, MB-IMAC Cu. Выделение и концентрирование с использованием магнитных частиц MB-NIS 8 основано на взаимодействии с обращенной фазой, тогда как MB-WCX представляется слабым катионообменником, а Cu MB-IMAC зависит от аффинности ионов металлов.

Технология магнитной сорбции имеет много преимуществ: простой протокол экстракции, возможность автоматизации, гибкость в исследовании разного количества образцов. Успешное применение и воспроизводимость магнитных наборов при работе с образцами сыворотки, плазмы и мочи продемонстрированы в различных исследованиях. В последние годы наблюдается увеличение числа работ, направленных на поиск биомаркеров многофакторных, наследственных и онкологических заболеваний в биологическом материале, прежде всего в сыворотке крови. В этом случае необходимо выделить и проанализировать большое количество белков, в том числе и те, которые присутствуют в образце в минорном количестве. Как показывают результаты, изложенные в ряде работ, оптимально выполняют способы пробоподготовки магнитные частицы разного типа, которые очищают образец от ингибирующих веществ, многозарядных ионов и мажорных белков (альбуминовая фракция). Развитие данного направления привело к формированию нового метода селективной пробоподготовки на основе магнитных частиц в сочетании с MALDI-TOF масс-спектрометрией — иммуномасс-спектрометрии (iMALDI) [27, 42, 70]. Преимущества магнитных частиц обусловлены высокой способностью связывания антител, возможностью вовлечения разных функциональных групп, легкостью в стандартизации и автоматизации процесса пробоподготовки [37].

Еще один вариант комбинированного использования технологии селективной магнитной сорбции и масс-спектрометрии — SISCAPA (обогащение и захват белков с помощью иммобилизованных антипептидных антител и стандартных стабильных изотопов), которая позволяет, помимо детекции белков и пептидов, проводить реакции множественного мониторинга межбелковых взаимодействий.

В работе [25] описывается применение метода iMALDI для быстрой и высокоточной диагностики туляремии в клиническом материале (мазки из носа,

плазма). По данным авторов, такая методика показала наивысшую чувствительность (320 КОЕ/мл) из всех употребляемых для диагностики туляремии на данный момент. Также метод использования селективных магнитных сорбентов в сочетании с масс-спектрометрией был предложен для детекции спор сибиреязвенного микроба в сложных образцах окружающей среды методом иммуно-жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии (иммуно LC LC / MS) [25]. После параллельного расщепления трипсином и Glu-C протеотипные пептиды, соответствующие малым кислоторастворимым белкам спор *B. anthracis* (SASP-B), специально контролируются в реакции множественного мониторинга (MRM) методом масс-спектрометрии. Соотношение пептидов тщательно контролируется и обеспечивает дополнительный уровень специфичности, который очень полезен для дифференциации от близкородственных сапрофитов, в изобилии встречающихся в почве, и отсекания ложноположительных / отрицательных результатов. Чувствительность метода составила 7×10^3 спор/мл молока или 10 мг почвы.

Заключение

Разработка новых методов индикации возбудителей опасных инфекций, сочетающих возможность концентрирования и очистки проб объектов окружающей среды с проведением высокочувствительных и специфичных методов детекции патогенов, таких как MALDI-TOF масс-спектрометрия, продолжает оставаться актуальной задачей, решение которой позволит усовершенствовать лабораторную диагностику, сделать ее более экономичной, увеличить пропускную способность лабораторий, расширить спектр выявляемых патогенов.

Анализ данных литературы выявил, что из существующего многообразия методов пробоподготовки в каждом конкретном случае, в зависимости от возбудителя, особенностей анализируемых образцов (почва, вода, биологические жидкости и т.д.) необходим индивидуальный подход, как в подборе сорбентов, так и в применении элюирующих растворов и методов элюции. Современная процедура пробоподготовки образцов объектов окружающей среды, полевого и клинического материала должна быть не только простой в исполнении, воспроизводимой и относительно недорогой, но и отвечать международным требованиям, предъявляемым к биоаналитическим методикам, которые применяются при проведении клинических и диагностических исследований.

Литература

1. *Гладилович В.Д.* Разработка новых металл-аффинных сорбентов, содержащих железо(III), для решения задач фосфопротеомики: дис. ... канд. хим. наук. – С.-Петербург. гос. ун-т. СПб., 2014. – 116 с.
2. *Думанов В.И., Русу Е.И., Марковский М.Г., Гугучкина Т.И., Агеева Н.М.* Хромато-масс-спектрометрическое определение ароматобразующих компонентов вин с применением улучшенной твердофазной экстракции // Известия ВУЭов. Пищевая технология. – 2011. – № 4(322). – С. 112–113.
3. *Кельцьева О.А., Гладилович В.Д., Прусаков А.Н. и др.* Регулярные мультимолекулярные сорбенты (РММС). Получение, изучение поверхностных и сорбционных свойств // Научное приборостроение. – 2012. – Т. 22(4). – С. 50–55.
4. *Кубракова И.В., Кошечева И.Я., Пряжников Д.В., Мартынов Л.Ю., Киселева М.С., Тотюнник О.А.* Микроволновой синтез, свойства и аналитические возможности наноразмерных сорбционных материалов на основе магнетита // Журн. аналит. химии. – 2014. – Т. 69(2). – С. 1–12.
5. *Кузнецова Е.С., Буряк А.К.* Сопоставление термодинамических характеристик адсорбции аминокислот и их ассоциатов, рассчитанных молекулярно-статистическим методом, и их величин удерживания на углеродном сорбенте Гиперкарбе в варианте ОФ ВЭЖХ // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2009. – Т. 9(5). – С. 616–626.
6. *Кузнецова Е.С., Пыцкий И.С., Буряк А.К.* Использование хлорида серебра для масс-спектрометрического исследования аминокислот на углеродных сорбентах // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2017. – Т. 17(2). – С. 191–195.
7. *Малофеева Г.И.* Применение метода твердофазной экстракции для концентрирования палладия, платины, иридия и золота // Ж. аналит. химии. – 1996. – Т. 51(10). – С. 1038–1041.
8. *Натаров В.О., Котиков Д.А., Сурвило В.Л., Паньков В.В., Перчик А.В., Попова А.В.* Магнитные сорбенты на основе нанокompозитных частиц $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ для выделения и очистки ДНК/РНК // Свиридовские чтения: сб. ст. Вып. 11. – Минск, 2015. – С. 52–54.
9. Патент 2608529 РФ МПК51 В01J 20/28, В01J 20/281. Регулярные мультимолекулярные сорбенты для металл-аффинной хроматографии, содержащие лабильную ковалентную связь / Гладилович В.Д., Подольская Е.П., Селютин А.А. Суходолов Н.Г.; патентообладатель: Гладилович В.Д., Подольская Е.П., Селютин А.А. Суходолов Н.Г.; заявл. 18.04.2012; опублик. 19.01.2017. Бюл. № 2. – 9 с.
10. *Рожкова Е.А., Краснов И.А., Суходолов Н.Г., Иванов Н.С., Янкович А.И., Подольская Е.П., Краснов Н.В.* Исследование поверхностных свойств наноструктур (пленок Лэнгмюра – Блджетт), содержащих ионы железа, и определение их состава с привлечением методов масс-спектрометрии // Научное приборостроение. – 2008. – Т. 18(4). – С. 54–60.
11. *Севко Д.А.* Концентрирование и определение фитостероидов с помощью молекулярно-импринтированных сорбентов и tandemной масс-спектрометрии высокого разрешения: дис. ... канд. хим. наук. – МГУ имени М.В. Ломоносова. М., 2016. – 131 с.
12. *Цимбалистова М.В., Павлович Н.В., Аронова Н.В., Чайка И.А., Чайка С.О., Водопьянов А.С.* Масс-спектрометрический анализ природных и антиген-измененных штаммов туляремийного микроба // Проблемы особо опасных инфекций. – 2017. – № 4. – С. 92–96.
13. *Чернова Е.Н., Кельцьева О.А., Гладилович В.Г., Русских Я.В., Суходолов Н.Г., Селютин А.А., Никифоров В.А., Жаковская Э.А., Подольская Е.П.* Применение хромато-масс-спектрометра высокого разрешения LTQ ORBITRAP для определения перфторкислот в природной воде с использованием традиционного твердофазного и металл-аффинного сорбентов: разработка и оптимизация метода // Научное приборостроение. – 2013. – Т. 23(1). – С. 30–37.
14. *Шиловских В.В.* Разработка металл-аффинного сорбента на основе лантана для решения задач фосфопротеомики: дис. ... канд. хим. наук. – С.-Петербург. гос. ун-т. СПб., 2017. – 123 с.
15. *Шурек Я., Пулкрабова Я., Хайцлова Я., Назафарин Л., Ковальчук Т.* Возможности метода микроэкстракции шприцем, заполненным сорбентом (MEPS), в паре с системой газовой хроматографии/времяпролетной масс-спектрометрии в анализе бромированных антипиренов в сточных водах. Часть 2 / Масс-спектрометрия. – 2010. – Т. 7(2). – С. 150–153.
16. *Ярошенко Д.В.* Нивелирование влияния биологической матрицы при определении лекарственных препаратов в плазме крови методом хромато-масс-спектрометрии: дис. ... канд. хим. наук. – С.-Петербург. гос. ун-т. СПб., 2014. – 153 с.
17. *Alexander C., Andersson H., Andersson L., Ansell R., Kirsch N., Nicholls I., O'Mahony J., Whitcombe M.* Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003 // J. Mol. Recognit. – 2006. – Vol. 19. – P. 106–180.
18. *Aryal U.K., Ross A.R.* Enrichment and analysis of phosphopeptides under different experimental conditions using titanium dioxide affinity chromatography and mass spectrometry. // Rapid Communications in Mass Spectrometry. – 2010. – Vol. 24(2). – P. 219–231.
19. *Ballesteros-Gomez A., Rubio S.* Hemimicelles of alkyl carboxylates chemisorbed onto magnetic nanoparticles: study and application to the extraction of carcinogenic polycyclic

- aromatic hydrocarbons in environmental water samples // *Anal. Chem.* – 2009. – Vol. 81(21). – P. 9012–9020.
20. *Batalha I.L., Lowe C.R., Roque A.C.A.* Platforms for enrichment of phosphorylated proteins and peptides in proteomics // *Trends in Biotechnology.* – 2011. – Vol. 30(2). – P. 100–110.
 21. *Benkhedda K., Dimitrova B., Heidi Goenaga Infante, Ivanova E., Adams Freddy C.* Simultaneous on-line preconcentration and determination of Pt, Rh and Pd in urine, serum and road dust by flow injection combined with inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry // *J. Anal. At. Spectrom.* – 2003. – Vol. 18. – P. 1019–1025.
 22. *Blacken G.R., Volný M., Diener M., Jackson K.E., Ranjitkar P., Maly D.J., Turecek F.* Reactive landing of gas-phase ions as a tool for the fabrication of metal oxide surfaces for in situ phosphopeptide enrichment // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – 2009. – Vol. 20 – P. 915–926.
 23. *Bogacheva L.V., Kovalev I.A., Tikhomirova T.I., Formanovsky A.A., Tsygin G.I., Zolotov Y.A.* Sorption of palladium on hydrophobic polymers in the presence of alkylamines // *Separation and Purification Technology.* – 2002. – Vol. 29. – P. 33–40.
 24. *Chen A., Zeng G., Chen G., Hu X., Yan M., Guan S., Shang Cui., Lu L., Zou Z., Xie G.* Novel thiourea-modified magnetic ion-imprinted chitosan/TiO₂ composite for simultaneous removal of cadmium and 2,4-dichlorophenol // *Chem. Eng. J.* – 2012. – Vol. 191. – P. 85–94.
 25. *Chenau J., Fenaille F., Ezan E., Morel N., Lamourette P., Goossens P.L., Becher F.* Sensitive detection of *Bacillus anthracis* spores by immunocapture and liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *Analytical Chemistry.* – 2011. – Vol. 83(22). – P. 8675–8682.
 26. *Cheng K., Chui H., Domish L., Hernandez D., Wang G.* Recent development of mass spectrometry and proteomics applications in identification and typing of bacteria // *Proteomics Clin. Appl.* – 2016. – Vol. 10(4). – P. 346–357.
 27. *Chen Y.N., Du H.Y., Shi Z.Y., He Li, He Y.-Y., Wang D.* Serum proteomic profiling for autism using magnetic bead-assisted matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a pilot study // *World Journal of Pediatrics.* – 2018. – Vol. 14. – P. 233–237.
 28. *Cheung R.F., Wong JH., Ng T.B.* Immobilized metal ion affinity chromatography; a review on its applications // *Appl. Microbiol Biotechnol.* – 2012. – Vol. 96. – P. 1411–1420.
 29. *Clark A.E., Kaleta E.J., Arora A., Wolk D.M.* Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2013. – Vol. 26(3). – P. 547–603.
 30. *Corthals G.L., Aebersold R., Goodlett D.R., Burlingame A.L.* Identification of phosphorylation sites using microimmobilized metal affinity chromatography // *Methods in Enzymology; Academic Press: New York.* – 2005. – Vol. 405. – P. 66–81.
 31. *Dams R., Huestis M., Lambert W., Murphy C.* Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: Influence of ionization type, sample preparation, and biofluid // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – 2003. – Vol. 14. – P. 1290–1294.
 32. *Eeckhaut A., Lanckman K., Sarre S., Smolders I., Michotte Y.* Validation of bioanalytical LC–MS/MS assays: Evaluation of matrix effects // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2009. – Vol. 877(23). – P. 2198–2207.
 33. *Florio W., Tavanti A., Barnini S., Ghelardi E., Lupetti A.* Recent advances and ongoing challenges in the diagnosis of microbial infections by MALDI-TOF mass spectrometry // *Front Microbiol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 1097. doi: 10.3389/fmicb.2018.01097.
 34. *Gao D., Zhang Z., Wu M., Xie C., Guan G., Wang D.* A surface functional monomer-directing strategy for highly dense imprinting of TNT at surface of silica nanoparticles // *J. Am. Chem. Soc.* – 2007. – Vol. 129(25). – P. 7859–7866.
 35. *Han L., Shan Z., Chen D., Yu X., Yang P., Tu B., Zhao D.* Mesoporous Fe₂O₃ microspheres: Rapid and effective enrichment of phosphopeptides for MALDI-TOF MS analysis // *J. Colloid Interface Sci.* – 2008. – Vol. 318. – P. 315–321.
 36. *Huang W., Yang X., Zhao S., Zhang M., Hu X., Wang J., Zhao H.* Fast and selective recognizes polysaccharide by surface molecularly imprinted film coated onto aldehyde-modified magnetic nanoparticles // *Analyst.* – 2013. – Vol. 21(138). – P. 6653–6661.
 37. *Jiang J., Parker C.E., Fuller J.R., Kawula T.H., Borchers C.H.* An immunoaffinity tandem mass spectrometry (iMALDI) assay for detection of *Francisella tularensis* // *Anal. Chim. Acta.* – 2007. – Vol. 605(1). – P. 70–79.
 38. *Khatiri R., Revhani A., Mortazavi S.Z., Hossainlipour M.* Preparation and characterization of Fe₃O₄ / SiO₂ / APTES core-shell nanoparticles / In: *Proceedings of the 4th International Conference on Nanostructures (ICNS4), 12–14 March, 2012. Kish Island, I.R. Iran.* – Sharif University of Technology, Iran. – P. 1456–1458.
 39. *Knecht S., Ricklin D., Eberle A. N., Ernst B.* Oligohis-tags: Mechanisms of binding to Ni²⁺-NTA surfaces // *J. Mol. Recognit.* – 2009. – Vol. 22. – P. 270–279.
 40. *Lee A., Yang H.-J., Lim E.-S., Kim J., Kim Y.* Enrichment of phosphopeptides using bare magnetic particles // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2008. – Vol. 22. – P. 2561–2564.
 41. *Leitner A.* Phosphopeptide enrichment using metal oxide affinity chromatography // *Trends in Analytical Chemistry* – 2010. – Vol. 29(2). – P. 177–185.
 42. *Li H., Popp R., Frohlich B., Chen M.X., Borchers C.H.* Peptide and protein quantification using automated immuno-

- MALDI (iMALDI) // *J. Vis. Exp.* — 2017. — Vol. 126. doi: 10.3791/55933.
43. Lin H.Y., Chen W.Y., Chen Y.C. Iron oxide/niobium oxide core-shell magnetic nanoparticle-based phosphopeptide enrichment from biological samples for MALDI MS analysis // *J. Biomed. Nanotechnol.* — 2009. — Vol. 5. — P. 215–223.
 44. Li Y., Leng T., Lin H., Deng C., Xu X., Yao N., Yang P., Zhang X. Preparation of Fe₃O₄ and ZrO₂ core-shell microspheres as affinity probes for selective enrichment and direct determination of phosphopeptides using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry // *J. Proteome Res.* — 2007. — Vol. 6. — P. 4498–4510.
 45. Li Y., Lin H., Deng C., Yang P., Zhang X. Highly selective and rapid enrichment of phosphorylated peptides using gallium oxide-coated magnetic microspheres for MALDI-TOF-MS and nano-LC-ESI-MS/MS/MS analysis // *Proteomics.* — 2008. — Vol. 8. — P. 238–249.
 46. Min Q., Zhang X., Chen X., Li S. N-doped graphene: an alternative carbon-based matrix for highly efficient detection of small molecules by negative ion MALDI-TOF MS // *Analytical Chemistry.* — 2014. — Vol. 86(18). — P. 9122–9130.
 47. Miyazaki S., Morisato K., Ishizuka N., Minakuchi H., Shintani Y., Furuno M., Nakanishi K. Development of a monolithic silica extraction tip for the analysis of proteins // *J. Chromatogr. A.* — 2004. — Vol. 1043. — P. 19–25.
 48. Pan J., Zhang C., Zhang Z., Li G. Review of online coupling of sample preparation techniques with liquid chromatography // *Anal. Chim. Acta.* — 2014. — Vol. 815. — P. 1–15.
 49. Patel D., Sharma N., Patel M., Patel B., Shrivastav P., Sanyal M. LC-MS/MS assay for olanzapine in human plasma and its application to a bioequivalence study // *Acta Pharmaceutica Sinica B.* — 2012. — Vol. 2(5). — P. 481–494.
 50. Patel D., Sharma P., Sanyal M., Shrivastav P. SPE-UPLC-MS/MS method for sensitive and rapid determination of aripiprazole in human plasma to support a bioequivalence study // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed Life Sci.* — 2013. — Vol. 925. — P. 20–25.
 51. Pearson R.G. Hard and soft acids and bases, HSAB, part II: Underlying theories // *Journal of Chemical Education.* — 1968. — Vol. 45(10). — P. 643–648.
 52. Pinkse M.W.H., Mohammed S., Gouw L.W., van Breukelen B., Vos H.R., Heck A.J.R. Highly robust, automated and sensitive online TiO₂-based phosphoproteomics applied to study endogenous phosphorylation in *Drosophila melanogaster* // *J. Proteome Res.* — 2008. — Vol. 7. — P. 687–697.
 53. Qiao F., Sun H., Yan H., Row K.H. Molecularly imprinted polymers for solid phase extraction // *Chromatographia.* — 2006. — Vol. 64(11/12). — P. 625–636.
 54. Qiao L., Roussel C., Wan J., Yang P., Girault H.H., Liu B. Specific on-plate enrichment of phosphorylated peptides for direct MALDI-TOF MS analysis // *J. Proteome Res.* — 2007. — Vol. 6. — P. 4763–4769.
 55. Rainer M., Sonderegger H., Bakry R., Huck C.W., Morandell S., Huber L.A., Gjerde D.T., Bonn G.K. Analysis of protein phosphorylation by monolithic extraction columns based on poly(divinylbenzene) containing embedded titanium dioxide and zirconium dioxide nano-powders // *Proteomics.* — 2008. — Vol. 8. — P. 4593–4602.
 56. Röhrig H., Colby T., Schmidt J., Harzen A., Facchinelli F., Bartels D. Analysis of desiccation-induced candidate phosphoproteins from *Craterostigma plantagineum* isolated with a modified metal oxide affinity chromatography procedure // *Proteomics.* — 2008. — Vol. 8. — P. 3548–3560.
 57. Sturm M., Leitner A., Smått J.-H., Lindén M., Lindner W. Tin dioxide microspheres as a promising material for phosphopeptide enrichment prior to liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry analysis // *Adv. Funct. Mater.* — 2008. — Vol. 18. — P. 2381–2389.
 58. Sugiyama N., Nakagami H., Mochida K., Daudi A., Tomita M., Shirasu K., Ishihama Y. Large-scale phosphorylation mapping reveals the extent of tyrosine phosphorylation in *Arabidopsis* // *Mol. Syst. Biol.* — 2008. — Vol. 4. — P. 193.
 59. Teijlingen R., Meijer J., Takusagawa S., Gelderen M., Beld C., Usui T. Development and validation of LC-MS/MS methods for the determination of mirabegron and its metabolites in human plasma and their application to a clinical pharmacokinetic study // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* — 2012. — Vol. 887–888. — P. 102–111.
 60. Theodoridis G., Lasakova M., Skerikova V., Tegou A., Giantsiou N., Jandera P. Molecular imprinting of natural flavonoid antioxidants: application in solid-phase extraction for the sample pretreatment of natural products prior to HPLC analysis // *J. Sep. Sci.* — 2006. — Vol. 29(15). — P. 2310–2321.
 61. Theparee T., Das S., Thomson R.B. Jr. Total laboratory automation and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry improve turnaround times in the clinical microbiology laboratory: a Retrospective analysis // *J. Clin. Microbiol.* — 2017. — Vol. 56(1). — pii: e01242-17. doi: 10.1128/JCM.01242-17.
 62. Thingholm T.E., Jensen O.N., Robinson P.J., Larsen M.R. SIMAC (sequential elution from IMAC), a phosphoproteomics strategy for the rapid separation of monophosphorylated from multiply phosphorylated peptides // *Mol. Cell. Proteomics* — 2008. — Vol. 7(4). — P. 661–671.
 63. Uzuna L., Turner A.P.F. Molecularly-imprinted polymer sensors: realising their potential // *Biosens. Bioelectron.* — 2016. — Vol. 76. — P. 131–144.
 64. Van Belkum A., Chatellier S., Girard V., Pincus D., Deol P., Dunne W.M. Jr. Progress in proteomics for clinical microbiology: MALDI-TOF MS for microbial species identification and more // *Expert Review of Proteomics.* — 2015. — Vol. 12(6). — P. 595–605.

65. Vlasánková R., Otruba V., Bendl J., Fiserá M., Kanický V. Preconcentration of platinum group metals on modified silicagel and their determination by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry in airborne particulate // *Talanta*. – 1999. – Vol. 48. – P. 839–846.
66. Vogeser M., Kirchoff F. Progress in automation of LC-MS in laboratory medicine // *Clin. Biochem.* – 2011. – Vol. 44. – P. 4–13.
67. Wojnicz A., Cabaleiro-Ocampo T., Román-Martínez M., Ochoa-Mazarro D., Abad-Santos F., Ruiz-Nuño A. A simple assay for the simultaneous determination of human plasma albendazole and albendazole sulfoxide levels by high performance liquid chromatography in tandem mass spectrometry with solid-phase extraction // *Clinica Chimica Acta*. – 2013. – Vol. 426. – P. 58–63.
68. Yadav M., Trivedi V., Upadhyay V., Shah G., S. Goswami S., Baxi G.A., Shrivastav S. Comparison of extraction procedures for assessment of matrix effect for selective and reliable determination of atazanavir in human plasma by LC–ESI-MS/MS // *J. Chromatogr. B*. – 2012. – Vol. 885. – P. 138–149.
69. Ye T., Durkin D.P., Hu M., Wang X., Banek N.A., Wagner M.J., Shuai D. Enhancement of nitrite reduction kinetics on electrospun Pd-carbon nanomaterial catalysts for water purification // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2016. – Vol. 8(28). – P. 17739–17744.
70. Zhu J., He K., Zhao L., Liu L., Song T., Huang C. Proteomic profiling of invasive ductal carcinoma (IDC) using magnetic beads-based serum fractionation and MALDI-TOF MS // *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. – 2015. – Vol. 29(4). – P. 321–327.

APPLICATION OF SORBENTS IN PREPARATION OF SAMPLES FOR MASS-SPECTROMETRIC ANALYSIS (REVIEW)

I.V. ZHARNIKOVA, S.A. KURCHEVA, T.V. ZHARNIKOVA, E.A. KOTENEVA, A.S. GEOGJAYAN,
O.A. GNUSAREVA, A.V. KALININ, O.I. TSYGANKOVA, A.G. KOSHKIDKO

Stavropol Antiplague Institute of Rosпотребнадзор

The review provides modern information on the problem of the use of sorbents in the preparation of samples for mass spectrometric analysis. Various types of sorbents used by researchers for sample preparation for mass spectrometry of objects from the environment and clinical material are considered.

Keywords: sorbent, magnetic sorbent, mass spectrometric analysis.

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ И ПОДХОДЫ В РАЗРАБОТКЕ СИСТЕМ ЖИЗНЕОБЕСПЕЧЕНИЯ ОБИТАЕМЫХ КОСМИЧЕСКИХ АППАРАТОВ. ЧАСТЬ 2

Д.В. СУХИНОВ^{1,2*}, П.М. ГОТОВЦЕВ¹, Я.Э. СЕРГЕЕВА¹, К.В. ГОРИН¹, Р.Г. ВАСИЛОВ¹

¹ *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,*

² *Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет), Москва*

Представленная работа является частью 2 статьи, опубликованной в № 4 за 2019 год журнала «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова» [1]. В настоящей публикации обзорного характера продолжено рассмотрение результатов исследований, посвященных разработке технологий и принципов функционирования биологических систем жизнеобеспечения, используемых в пилотируемых космических аппаратах. Констатируется, что в рассматриваемой области нет однозначных устоявшихся способов, направленных на решение проблемы обеспечения астронавтов непрерывно и безотходно возобновляемыми ресурсами: кислородом, чистой водой, пищей. При этом наиболее перспективным подходом к созданию систем жизнеобеспечения по-прежнему считается внедрение биологических компонентов — растений и микроорганизмов. Среди микроорганизмов наибольший интерес представляют фототрофные микроорганизмы и, в первую очередь, цианобактерии, обладающие высокой пищевой ценностью и возможностью создания цикла углерода в пределах одного космического аппарата. С применением этих микроорганизмов будут снижены объемы доставляемых и/или хранимых запасов, что крайне актуально и перспективно для решения всей проблемы в целом. Проанализированы конкретные возможности использования таких фототрофных микроорганизмов в системах жизнеобеспечения.

Ключевые слова: биологические системы жизнеобеспечения, фототрофные микроорганизмы, цианобактерии, пилотируемая космонавтика, исследование Луны и Марса.

Введение

Проекты, посвященные исследованиям околоземного космического пространства, включая Луну и Марс, активно обсуждаются в настоящее время. Повышение интереса к пилотируемой космонавтике, и, в частности, к усовершенствованию систем поддержания жизни, вызвано обсуждением таких масштабных, наиболее перспективных и активно разрабатываемых космических проектов, как: 1. Lunar Orbital Platform-Gateway — проект по строительству окололунной космической станции, которая, скорее всего, придет на замену МКС [25]. 2. Artemis — программа, частью которой и является станция Gateway, по доставке человека на Луну для ее освоения и проведения обширных научных исследований на ее поверхности [26]. 3. Chinese Space Station — проект по строительству китайской околоземной космической стан-

ции [41]. Технологии, разработанные и протестированные в указанных проектах, являются основополагающими для создания последующих программ пилотируемых полетов к Марсу, его освоению и исследованию [7].

К одной из главных проблем, с которой сталкивается любая долгосрочная пилотируемая космическая миссия, относится поддержание жизни экипажа космического корабля. Системы жизнеобеспечения МКС базируются на поставках ресурсов с Земли с последующей регенерацией с применением различных физико-химических процессов. Эффективность данных процессов, а также возможные пути их улучшения рассмотрены в нашей предыдущей публикации [1]. Из литературы известно, что введение биологических элементов в системы жизнеобеспечения служит эффективным решением для обеспечения рециркуляции большинства основных компонентов [20]. Подобные биологические системы жизнеобеспечения основаны на процессах метаболизма растений и микроорганизмов [37], обеспечивающих не только рециркуляцию кислорода и воды, но и рециркуляцию углерода за счет производства продуктов питания для астронавтов [32]. При таком подходе частично имитируется биосфера Земли, что в идеале позволит создать

© 2020 г. Сухинов Д.В., Готовцев П.М., Сергеева Я.Э., Горин К.В., Василов Р.Г.

* **Автор для переписки:**

Сухинов Даниил Владиславович
магистрант НИЦ «Курчатовский институт»
E-mail: suhinov.dv@phystech.edu

полный цикл углерода, азота, кислорода, водорода и других элементов [27, 28].

Сейчас проводятся многочисленные исследования растений и микроорганизмов с целью выявления наиболее перспективных для применения в условиях космического корабля, параллельно ведутся работы по созданию прототипов систем жизнеобеспечения с их использованием [32, 48]. Фототрофные микроорганизмы, главным образом цианобактерии, все чаще упоминаются в качестве наиболее подходящих для заданных целей производства кислорода, продуктов питания, очистки воды; при этом они неприхотливы к условиям культивирования [27, 46, 48].

Производство кислорода

Микроводоросли и цианобактерии рассматриваются как наиболее интересные объекты для связывания углекислого газа и производства кислорода [39]. Известны данные, что эти организмы более эффективны в производстве кислорода, чем высшие растения. Для сравнения: деревья, произрастающие на одном гектаре земли, в среднем способны производить от 2,5 до 11 тонн кислорода в год, в то время как в Калифорнии при промышленном культивировании некоторых видов цианобактерии рода *Arthrospira* в открытых прудах аналогичной площади в атмосферу выделяется около 17 тонн кислорода в год [46]. Поэтому цианобактерии могут быть задействованы как дополнение к физико-химическим методам, которые были рассмотрены нами ранее [1], или же как их замена, с переводом описанных ранее систем на уровень запасных или аварийных.

В связи с этим обстоятельством если в части 1 настоящей статьи внимание больше было смещено на общие принципы жизнеобеспечения в космических аппаратах, то во второй статье сделан акцент на практические аспекты и детализацию возможностей фототрофных микроорганизмов (главным образом цианобактерий).

Культивирование цианобактерий и микроводорослей (помимо естественных водоемов) проводится в фотобиореакторах на питательных средах, содержащих все компоненты, необходимые для роста этих организмов. Продуктивность биомассы (выход биомассы с единицы объема) в различных типах фотобиореакторов заметно отличается: так, в реакторах открытого типа она может достигать 0,5 г/л, в то время как в закрытых системах до 5 г/л [44, 45]. Чем больше концентрация биомассы, тем больше фиксируется углекислого газа и, соответственно, производится кислорода. Имеется ряд факторов, оказывающих существенное влияние на фиксацию углерода: стадия роста культуры, интенсивность подвода углекислого газа и отвода кислорода, глубина проникновения света в слой среды с биомассой [14, 17, 29]. Таким образом, производительность фотобиореакторов по кислороду зависит не только от используемого микроорганизма, но и от его конструкции. В таблице 1 представлены данные о продуктивности кислорода для некоторых микроорганизмов, полученные при культивировании в фотобиореакторах различного типа в условиях Земли [9]. Объем фотобиореактора, необходимый для обеспечения кислородом одного человека, оценивался, исходя из максимальной продуктивности биомассы по кислороду и ежедневной потребности человека [1, 34].

Таблица 1

Продуктивность по кислороду некоторых фотосинтезирующих микроорганизмов

№	Организм	Концентрация клеток/биомассы	Выход O ₂	Требуемый объем фотобиореактора на человека, дм ³	Источник
Водоросли					
1	<i>Chlorococcum</i> sp.	18·10 ⁴ клеток/мл	0,1 л/л/сутки (6,02 мг/л/час)	5813,95	[6]
2	<i>Scenedesmus obliquus</i>	0,15 г/л/день	1,957 г/г сухой биомассы	2866,9	[10]
3	<i>Chlorella kessleri</i>	10 ⁹ клеток/мл	10,75 л/л/сутки (14 ммоль/л/час)	78,13	[17]
4	<i>Chlorella vulgaris</i>	1,2·10 ⁹ клеток/мл	4,61 л/л/сутки (6 ммоль/л/час)	182,29	[19]
5	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	слой культуры 1 см	16,42 л/л/сутки (684 см ³ /л/час)	35,82	[42]
Цианобактерии					
6	<i>Nostoc sphaeroides</i>	1,4 г/л/день	16,67 л/л/сутки	35,28	[11]
7	<i>Arthrospira platensis</i>	не указано	4,32 л/л/сутки (3 мкл/мл/мин)	136,11	[13]
8	<i>Arthrospira platensis</i>	не указано	8,64 л/л/сутки (16 ммоль/л/час)	68,06	[33]

Указанная в таблице 1 максимальная продуктивность по кислороду не представляет собой постоянную величину и изменяется в процессе роста биомассы [17]. При этом максимальный выход кислорода с литра питательной среды с биомассой наблюдается на стадии экспоненциального роста [17]. Также имеется значительное различие в объеме фотобиореактора, который требуется для обеспечения кислородом одного человека при максимальной эффективности. Это различие обусловлено скоростью накопления биомассы, которая зависит от доступности освещения по толщине слоя питательной среды и особенностями различных видов микроорганизмов [17, 19, 42]. Тем не менее скорость накопления биомассы и, соответственно, производства кислорода культурой, может быть увеличена оптимизацией параметров культивирования (температуры, расхода и концентрации питательных веществ, рН среды, плотности клеток, освещенности, способа перемешивания и т.д.) [12, 30, 31, 33]. Следует подчеркнуть, что нет необходимости специально выделять ограниченные ресурсы для выращивания цианобактерий в системах жизнеобеспечения для производства кислорода, поскольку кислород в любом случае будет побочным продуктом жизнедеятельности фотосинтезирующих микроорганизмов. Поэтому можно сконцентрироваться на других полезных применениях фототрофов, например, на применении этих организмов в биофотовольтаике, основанном на способности цианобактерий и микроводорослей преобразовывать световую энергию в электрический ток, используя воду в качестве источника электронов [23, 35, 36, 38], или на производстве продуктов питания.

Производство продуктов питания

К текущему моменту нельзя констатировать наличие готовой, устойчивой и проверенной технологии по автономному производству продуктов питания в космических кораблях в условиях полета. Самый простой вариант обеспечения экипажа пищей, который используется в настоящее время на МКС, — это доставка с Земли продуктов, готовых к употреблению. Однако этот вариант пригоден лишь для краткосрочных космических полетов и миссий (на низкой околоземной орбите, как МКС, или, возможно, даже на Луне), но совершенно не подходит для долгосрочных пилотируемых полетов на Марс, тем более при установке долгосрочных баз и поселений на его поверхности. Исходя из ежедневных потребностей человека [34], начальный

запас или поставка продуктов питания и питьевой воды, рассчитанные на 3 земных года для экипажа из 6 человек, добавит порядка 30 тонн к массе перевозящего этот груз аппарата [46]. Учитывая, что только перелет до Марса в одну сторону займет от 6 до 8 земных месяцев, такой вариант организации пилотируемой миссии выходит излишне затратным.

Другой вариант, упомянутый в предыдущем разделе, — это использование фотосинтезирующих организмов в пищу. Типичная сбалансированная диета подразумевает рацион, включающий в себя белки, жиры, углеводы, целый ряд витаминов и минералов. Поэтому высокая скорость производства биомассы, отсутствие токсинов и качество питательных соединений — наиболее важные критерии отбора организмов, употребляемых в качестве пищевой добавки или основы рациона космонавтов. К тому же данные организмы в идеале должны обладать высокой скоростью выделения O_2 и фиксации CO_2 в процессе фотосинтеза. Идеальными кандидатами служат съедобные цианобактерии, так как они удовлетворяют всем указанным выше условиям [46]. Наиболее известны из употребляемых в пищу в качестве биодобавок виды из рода *Arthrospira* (коммерческое название *Spirulina*; хотя, согласно научной классификации, это — представители разных родов одного класса *Cyanophyceae*) [22, 50], цианобактерия *Nostoc commune* [11] и симбиотическая ассоциация *Anabaena/Azolla* [21].

Arthrospira — нитчатая цианобактерия, используемая в пищу человеком уже на протяжении сотен лет. Сейчас *Arthrospira* культивируется по всему миру, используется в качестве биодобавки или как отдельно употребляемый продукт, в основном из-за своей исключительной питательной ценности и доказанного отсутствия токсичности [35, 38, 39]. Сухая биомасса этой цианобактерии характеризуется высоким содержанием общего белка (до 60–77% асб), углеводов (10–15%) и липидов (11–13%) [4, 8, 43, 50]. Причем, в состав липидов входит целый комплекс ненасыщенных жирных кислот, а именно: олеиновой, линолевой и γ -линоленовой, который иногда определяют как витамин F. Однако необходимо отметить, что содержание липидов может довольно сильно изменяться, в основном из-за различий в способах культивирования и сбора биомассы [8]. Наряду с этим *Arthrospira* содержит большое количество витаминов группы В (тиамин В1, рибофлавин В2, ниацин В3, пиридоксин В6, цианокобаламин В12), витамина Е и β -каротина. Биомасса *Arthrospira* характеризуется еще наличием легко усваиваемой формы железа, высоким уровнем

кальция, калия, цинка и селена [5, 43, 50]. Витамины А и Е и различные пигменты функционируют в клетках как эффективные антиоксиданты [8, 18, 40].

Известны и некоторые терапевтические свойства культуры *Arthrospira*, способствующие укреплению здоровья, среди которых, например, антимуtagenные функции, стимуляция роста полезных эндобактерий кишечника, стимуляция иммунного ответа, радиационно-защитные эффекты, влияние на диабет, ожирение и гипертонию и некоторые другие [3, 5, 8]. Следовательно, нет необходимости в какой-либо специальной обработке или приготовлении биомассы *Arthrospira* перед ее употреблением в пищу человеком, что сохраняет целостность витаминов и полиненасыщенных жирных кислот [24]. Именно поэтому штамм *Arthrospira* sp. PCC8005 был выбран в качестве производителя кислорода и важной пищевой добавки, например, в проекте Европейского космического агентства (ЕКА) под аббревиатурой MELiSSA (Micro-Ecological Life Support System Alternative) [32, 48].

Целесообразно отметить и то, что рассматриваемая культура обладает достаточно высокой производительностью по биомассе. Так, например, в открытых водоемах в природных, естественных условиях роста можно собирать от 10 до 30 тонн сухой биомассы с гектара водоема в год [16]. Но в контролируемых оптимальных условиях роста в фотобиореакторах можно достичь производительности около 1 грамма сухой биомассы на литр в сутки [47]. Учитывая энергетическую ценность 3,78 ккал на грамм сухого веса [43], для получения членом экипажа 2000 ккал в сутки необходим биореактор объемом порядка 530 литров, что также удовлетворит и его потребность в кислороде, основываясь на данных, указанных в таблице 1 и [34]. Хотя были довольно удачные эксперименты, в ходе которых на короткое время достигались скорости накопления биомассы примерно 1,2 грамм сухого веса на литр в час. Такие результаты удалось получить благодаря огромному потоку фотонов ($8000 \text{ мкмоль}/(\text{м}^2 \cdot \text{с})$), что примерно в 3–4 раза превосходит максимальный поток солнечных фотонов, доходящий до поверхности Земли), короткому пути света (14 мм) и турбулентному перемешиванию [33]. Проводя аналогичный расчет и предполагая указанную скорость роста постоянной, получаем более приемлемую цифру порядка 20 литров на человека. Тем не менее эти цифры представляют собой лишь грубую оценку потребностей экипажа в биомассе цианобактерии, поскольку, удовлетворяя потребности в калориях, нельзя забывать о сбалансированности такого питания.

Несмотря на все полезные качества цианобактерии *Arthrospira*, ее биомасса в настоящее время не может быть использована в качестве основного продукта в рационе космонавтов. Во-первых, вкус этой цианобактерии многие люди квалифицируют как специфичный и не очень привлекательный. Во-вторых, у биомассы довольно низкое соотношение углеводов к белкам, излишне высокое содержание витамина А, а витамина С, напротив, недостаточное [46, 43, 49]. В связи с этим рекомендуется смешивать сухую или влажную биомассу цианобактерий с другими источниками съедобной биомассы, например, микроводорослями и/или растениями для устранения неприятного вкуса и оптимизации содержания питательных веществ. С другой стороны, эти вопросы могут быть решены методами генной инженерии, с применением которой уже получены мутантные штаммы *A. platensis*, с более высоким содержанием (по сравнению с исходными штаммами) аминокислот, хлорофилла а, фикобилипротеинов и каротиноидов [2], или же с несколько измененным белковым составом [5].

В исследовании [15] была разработана эффективная и стабильная система генетической трансформации цианобактерии *A. platensis*, позволяющая преодолеть ферментативные рестрикционные барьеры, препятствующие горизонтальному переносу генов. Следовательно, используя такой метод при трансформации генома *A. platensis*, можно ожидать, что получение мутантных штаммов цианобактерии будет упрощено. К тому же рассматриваются и методы синтетической биологии [49], переходящей от модификации уже существующих геномов к созданию искусственных.

Заключение

В результате проведенного анализа публикаций, посвященных разработке технологий и принципов функционирования биологических систем жизнеобеспечения для пилотируемых космических аппаратов, констатируется факт активного развития данной области исследований. Это, безусловно, вызвано подъемом интереса к пилотируемой космонавтике и обсуждением таких проектов, как Lunar Orbital Platform-Gateway [25] и Artemis [26] в США, а также программ пилотируемых полетов Китая [41] и, как следствие, ростом финансирования исследований по обсуждаемой тематике. Впрочем, при теперешнем состоянии дел в рассматриваемой сфере нет однозначных устоявшихся способов решения проблемы обеспечения астронавтов непрерывно и безотходно возобновляемыми ресурсами: кислородом, чистой водой,

пищей. Но наиболее перспективным подходом к созданию систем жизнеобеспечения по-прежнему считается внедрение различных биологических компонентов — растений и микроорганизмов. Среди последних наибольший интерес вызывают фототрофные микроорганизмы и, в первую очередь, цианобактерии, обладающие высокой пищевой ценностью. Возможность создать с их помощью цикл углерода в пределах одного пилотируемого космического корабля представляется весьма заманчивой, так как позволит снизить объемы подвозимых и/или хранимых запасов. С другой стороны, для культивирования фототрофных микроорганизмов требуется большой объем воды, который, по сути, практически не используется для каких-либо иных целей. В связи с этим совершенствование систем культивирования и поиск путей их интеграции с другими системами космического аппарата сегодня также относятся к важнейшим задачам.

Литература

1. Сухинов Д.В., Готовцев П.М., Сергеева Я.Э., Горин К.В., Василов Р.Г. Современные технологии и подходы в разработке систем жизнеобеспечения обитаемых космических аппаратов. Часть 1 // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2019. — Т. 15. — № 4. — С. 69–76.
2. Brown I. Mutant strains of *Spirulina (Arthrospira) platensis* to increase the efficiency of micro-ecological life support systems // 37th COSPAR Scientific Assembly. Held 13–20 July 2008, in Montréal, Canada. — 2008. — 384 p.
3. Chen Y.-H. et al. Well-tolerated *Spirulina* extract inhibits influenza virus replication and reduces virus-induced mortality // Sci. Rep. — 2016. — Vol. 6(1). — P. 24253.
4. Ciferri O., Tiboni O. The biochemistry and industrial potential of *Spirulina* // Annu. Rev. Microbiol. — 1985. — Vol. 39(1). — P. 503–526.
5. Dehghani J. et al. Stable transformation of *Spirulina (Arthrospira) platensis*: a promising microalga for production of edible vaccines // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2018. — Vol. 102(21). — P. 9267–9278.
6. Dinesh Kumar R., Manikandavelu D., Guru Kasirajan K. Fixation of Carbon dioxide and oxygen production by photosynthetic simulations in indoor environs // J. Algal Biomass Utiln. — 2010. — Vol. 1(4). — P. 84–88.
7. Drake B.G., Hoffman S.J., Beaty D.W. Human Exploration of Mars Design Reference Architecture 5.0 // 2010 IEEE Aerospace Conference, Big Sky, MT — 2010. — P. 1–24.
8. Furmaniak M.A. et al. Edible cyanobacterial genus *Arthrospira*: Actual state of the art in cultivation methods, genetics, and application in medicine // Frontiers in Microbiology. — 2017. — Vol. 8. — 2541. doi: 10.3389/fmicb.2017.02541.
9. Gotovtsev P.M. et al. Biotechnology for thermal power plants. A review of recent and perspective technologies // Sustain. Energy Technol. Assessments. — 2019. — Vol. 31. — P. 132–141.
10. Grobbelaar J.U. et al. Rates of biogenic oxygen production in mass cultures of microalgae, absorption of atmospheric oxygen and oxygen availability for wastewater treatment // Water Res. — 1988. — Vol. 22. — No. 11. — P. 1459–1464.
11. Hao Z. et al. *Nostoc sphaeroides* Kutzing, an excellent candidate producer for CELSS // Adv. Sp. Res. — 2011. — Vol. 48(10). — P. 1565–1571.
12. Hartig P. et al. On the mass culture of microalgae: Areal density as an important factor for achieving maximal productivity // Biomass. — 1988. — Vol. 15(4). — P. 211–221.
13. Hoshino K. et al. Measurements of oxygen production rate in flowing *Spirulina* suspension // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 1991. — Vol. 35. — P. 89–93.
14. Jacob-Lopes E. et al. Effect of light cycles (night/day) on CO₂ fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors // Chem. Eng. Process. Process Intensif. — 2009. — Vol. 48(1). — P. 306–310.
15. Jeamton W. et al. Overcoming intrinsic restriction enzyme barriers enhances transformation efficiency in *Arthrospira platensis* C1 // Plant Cell Physiol. — 2017. — Vol. 58(4). — P. 822–830.
16. Jiménez C., Cossio B.R., Niell F.X. Relationship between physicochemical variables and productivity in open ponds for the production of *Spirulina*: a predictive model of algal yield // Aquaculture. — 2003. — Vol. 221(1–4). — P. 331–345.
17. Kim N.-J., Lee C.-G. A theoretical consideration on oxygen production rate in microalgal cultures // Biotechnol. Bioprocess Eng. — 2001. — Vol. 6(5). — P. 352–358.
18. Krishnaraj N.R. et al. Antioxidant property of fresh and marine water cyanobacterial extracts in Swiss mice // J. Biopestic. — 2012. — Vol. 5. — P. 250–254.
19. Lee C.G., Palsson B.O. High-density algal photobioreactors using light-emitting diodes // Biotechnol. Bioeng. — 1994. — Vol. 44(10). — P. 1161–1167.
20. Lehto K.M., Lehto H.J., Kanervo E.A. Suitability of different photosynthetic organisms for an extraterrestrial biological life support system // Res. Microbiol. — 2006. — Vol. 157(1). — P. 69–76.
21. Liu X. et al. Research on some functions of *Azolla* in CELSS system // Acta Astronaut. — 2008. — Vol. 63(7–10). — P. 1061–1066.
22. Mazard S. et al. Tiny microbes with a big impact: The role of cyanobacteria and their metabolites in shaping our future // Marine Drugs. — 2016. — Vol. 14(5). — pii: E97. doi: 10.3390/md14050097.

23. McCormick A.J. et al. Biophotovoltaics: oxygenic photosynthetic organisms in the world of bioelectrochemical systems // Energy Environ. Sci. — 2015. — Vol. 8(4). — P. 1092–1109.
24. Morist A. et al. Recovery and treatment of *Spirulina platensis* cells cultured in a continuous photobioreactor to be used as food // Process Biochem. — 2001. — Vol. 37(5). — P. 535–547.
25. National Aeronautics and Space Administration — Artemis [Electronic resource]. URL: <https://www.nasa.gov/artemis>.
26. National Aeronautics and Space Administration — Lunar Gateway [Electronic resource]. URL: <https://www.nasa.gov/topics/moon-to-mars/lunar-gateway>.
27. Nelson M., Dempster W.F., Allen J.P. Key ecological challenges for closed systems facilities // Adv. Sp. Res. — 2013. — Vol. 52(1). — P. 86–96.
28. Nitta K. Basic design concept of closed ecology experiment facilities // Adv. Sp. Res. 1999. — Vol. 24(3). — P. 343–350.
29. Oguchi M. et al. Food production and gas exchange system using blue-green alga (*Spirulina*) for CELSS // Adv. Space Res. — 1987. — Vol. 7(4). — P. 7–10.
30. Oliveira M.A.C.L. de et al. Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures // Aquac. Int. — 1999. — Vol. 7(4). — P. 261–275.
31. Oncel S., Sukan F.V. Comparison of two different pneumatically mixed column photobioreactors for the cultivation of *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*) // Bioresour. Technol. — 2008. — Vol. 99(11). — P. 4755–4760.
32. Pickett M.T. et al. Regenerative water purification for space applications: needs, challenges, and technologies towards «closing the loop» // Life Sci. Sp. Res. Elsevier BV, 2019.
33. Qiang H., Zarmi Y., Richmond A. Combined effects of light intensity, light-path and culture density on output rate of *Spirulina platensis* (*Cyanobacteria*) // Eur. J. Phycol. — 1998. — Vol. 33(2). — P. 165–171.
34. Quantius D. et al. Initial design of laboratories for sustainable habitation // Acta Astronaut. — 2014. — Vol. 94(2). — P. 541–562.
35. Ren H., Lee H.-S., Chae J. Miniaturizing microbial fuel cells for potential portable power sources: promises and challenges // Microfluid. Nanofluidics. — 2012. — Vol. 13(3). — P. 353–381.
36. Rosenbaum M., He Z., Angenent L.T. Light energy to bioelectricity: photosynthetic microbial fuel cells // Curr. Opin. Biotechnol. — 2010. — Vol. 21(3). — P. 259–264.
37. Saltykov M.Y., Bartsev S.I., Lankin Y.P. Stability of Closed Ecology Life Support Systems (CELSS) models as dependent upon the properties of metabolism of the described species // Adv. Sp. Res. — 2012. — Vol. 49(2). — P. 223–229.
38. Sawa M. et al. Electricity generation from digitally printed cyanobacteria // Nat. Commun. — 2017. — Vol. 8. — Article number 1327.
39. Sayre R. Microalgae: The potential for carbon capture // Bioscience. — 2010. — Vol. 60(9). — P. 722–727.
40. Shimamatsu H. Mass production of *Spirulina*, an edible microalga // Hydrobiologia. — 2004. — Vol. 512(1–3). — P. 39–44.
41. Shi S., Wang D., Ruan S., Li R., Jin M., & Liu H. High integrated modular joint for Chinese Space Station Experiment Module Manipulator. Conference Paper // 2015 IEEE International Conference on Advanced Intelligent Mechatronics (AIM). — 2015. — P. 1195–1200.
42. Shuler R.L., Affens W.A. Effect of light intensity and thickness of culture solution on oxygen production by algae // Appl. Microbiol. — 1970. — Vol. 19(1). — P. 76–86.
43. Tokuşoglu O., Ünal M.K. Biomass nutrient profiles of three Microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana* // J. Food Sci. — 2003. — Vol. 68(4). — P. 1144–1148.
44. Uduman N. et al. Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels // J. Renew. Sustain. Energy. — 2010. — Vol. 2. — Issue 1. doi: 10.1063/1.3294480.
45. Vandamme D., Foubert I., Muylaert K. Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production // Trends Biotechnol. — 2013. — Vol. 31(4). — P. 233–239.
46. Verseux C. et al. Sustainable life support on Mars — the potential roles of cyanobacteria // Int. J. Astrobiol. — 2016. — Vol. 15(1). — P. 65–92.
47. Vonshak A. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): physiology, cell-biology, and biotechnology. — Taylor & Francis Ltd., 1997. — 233 p.
48. Walker J., Granjou C. MELiSSA the minimal biosphere: Human life, waste and refuge in deep space // Futures. — 2017. — Vol. 92. — P. 59–69.
49. Way J.C., Silver P.A., Howard R.J. Sun-driven microbial synthesis of chemicals in space // Int. J. Astrobiol. — 2011. — Vol. 10(4). — P. 359–364.
50. Wells M.L. et al. Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding // J. Appl. Phycol. — 2017. — Vol. 29(2). — P. 949–982.

MODERN TECHNOLOGIES AND APPROACHES IN THE LIFE SUPPORT SYSTEMS DEVELOPMENT FOR INHABITED SPACECRAFT. PART 2

D.V. SUKHINOV^{1,2}, P.M. GOTOVTSEV¹, Ya.E. SERGEEVA¹, K.V. GORIN¹, R.G. VASILOV¹

¹ *National Research Centre «Kurchatov Institute»,*

² *Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Moscow*

The presented work is part 2 of an article published in No. 4 for 2019 of the journal «Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im. Yu.A. Ovchinnikova» [1]. This review publication continues to discuss research results on the development of technologies and principles for the functioning of biological life support systems used in manned spacecraft. It was stated that in the area under consideration there are no unambiguous well-established methods aimed at solving the problem of providing astronauts with continuously and non-waste renewable resources: oxygen, clean water, food. At the same time, the introduction of biological components — plants and microorganisms — is still considered the most promising approach to creating life support systems. Among microorganisms, phototrophic microorganisms and, first of all, cyanobacteria with high nutritional value and the ability to create a carbon cycle within a single spacecraft are of the greatest interest. Using these microorganisms, the volumes of delivered and / or stored stocks will be reduced, which is extremely relevant and promising for solving the whole problem as a whole. The specific possibilities of using such phototrophic microorganisms in life support systems are analyzed.

Keywords: biological life support systems, phototrophic microorganisms, cyanobacteria, manned space exploration, exploration of the Moon and Mars.

ЮБИЛЕЙНЫЕ И ЗНАМЕНАТЕЛЬНЫЕ ДАТЫ 2020 ГОДА*

СОБЫТИЯ, ФАКТЫ

1840 — Ю. Либих сформулировал теорию минерального питания растений.

1855 — открыта кишечная палочка, *Escherichia coli*, будущий широко используемый объект в науке и практике.

1870 — немецкий цитолог В. Флеминг (1843—1905) обнаружил митоз.

1875 — Фрэнсис Гальтон продемонстрировал полезность близнецового метода для изучения наследственных свойств. Был напечатан перевод на русский язык его книги «Наследственность таланта».

1875 — Чарльз Дарвин выдвинул теорию существования «геммул» (наследственных частиц).

1880 — А. Коссель (будущий лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине 1910 года) расщепил нуклеиновые кислоты на более мелкие составные части, в том числе фосфорную кислоту и сахар.

1880 — Луи Пастер опубликовал работу об аттенуации микробов.

1895 — С.Н. Виноградский (1856—1953) показал процесс фиксации азота бактериями *Clostridia* в отсутствие кислорода.

1900 — повторное «открытие» законов Менделя Карлом Корренсом, Эрихом фон Чермаком, Гуго де Фризом и соответствующие публикации.

1905 — введен термин «генетика» (У. Бэтсоном: сначала — в письме, а в 1906 году — в печати).

1905 — Э. Вильсон и Н. Стивенс установили, что X- и Y-хромосомы определяют пол.

1910 — создание Т.Х. Морганом линейной теории гена.

1920 — открытие гормона роста (Эванс Г. и Лонг К.).

1920 — 100-летие обнародования открытия Н.И. Вавиловым закона гомологических рядов в наследственной изменчивости (Саратов, 3-й Всероссийский селекционный съезд).

1920 — немецким ботаником Гансом Винклером введен термин «геном» для обозначения совокупности генов, заключенных в гаплоидном наборе хромосом организмов одного биологического вида.

1925 — К.Б. Бриджес (ученик Моргана) предложил балансовую теорию формирования пола у дрозофилы.

1925 — Н.И. Вавилов начал свою первую экспедицию по изучению генетических ресурсов земного шара.

1930 — вручение Нобелевской премии по химии Гансу Фишеру (1881—1945) за конструирование гемина и хлорофилла.

1935 — вышла в свет статья Кизеля А.Р. и Белозерского А.Н., в которой доказывалось присутствие в растительных клетках тимонуклеиновой кислоты (ДНК).

1935 — Герман Меллер (в период работы в Москве, в Институте генетики по приглашению Н.И. Вавилова) и А.А. Прокофьева-Бельговская определили размер генов у дрозофилы.

1935 — американский вирусолог и биохимик В. Стэнли получил в кристаллическом виде вирус табачной мозаики.

1940 — О. Эйвери в Рокфеллеровском институте изолировал чистую ДНК.

1940 — обнаружение резус-фактора (Ландштейнер К. и Винер А.).

1945 — Нобелевская премия по физиологии и медицине (А. Флеминг, Э.Б. Чени, Х.У. Флори) за открытие пенициллина.

* Материал подготовлен В.С. Воробьевым

1950 — Э. Чаргафф сформулировал свои правила, легшие в основу создававшейся молекулярной генетики.

1955 — Северо Очоа, испано-американский биохимик, лауреат Нобелевской премии 1959 г., выделил совместно со своей аспиранткой М. Грюнберг-Маного новый фермент — полинуклеотидфосфорилазу, который катализировал *in vitro* синтез молекулы, сходной с РНК. Последующие эксперименты с очисткой этого фермента привели к получению РНК-подобного полимера, представляющего собой линейную цепочку, нуклеозидные единицы которой связаны 3,5'-фосфодиэфирными мостиками.

1955 — показан стимулирующий рост эффект цитокининов на табаке (Скуг Ф.).

1960 — полный синтез хлорофилла (Вудворд Р.Б.)

1960 — присуждение Нобелевской премии Ф. Бернету и П. Медавара за исследования приобретенной иммунологической толерантности.

1965 — вручение Нобелевской премии по физиологии и медицине Андре Львову, Ф. Жакобу и Ж. Моно за открытие генетической регуляции синтеза ферментов и вирусов.

1965 — открытие С. Бреннером стоп-кодонов.

1965 — гибридизация клеток мыши и человека (Harris H., Watkins J.F.).

1965 — Р. Холли определил полную нуклеотидную последовательность тРНК (тРНК ананина дрожжей).

1970 — открытие обратной транскриптазы (Х. Темин, Д. Балтимор).

1970 — открытие рестриктазы (Г. Смит).

1975 — разработка Ф. Сенгером метода секвенирования ДНК.

1975 — награждение Нобелевской премией по физиологии и медицине Р. Дульбекко, Х. Темина и Д. Балтимора.

1975 — создание первых моноклональных антител (за это присуждена Нобелевская премия 1984 г.).

1975 — состоялась конференция в Асиломаре с призывом наложить мораторий на эксперименты с рекомбинантной ДНК. Инициаторами были выдающиеся ученые — молекулярные биологи. В результате было принято взвешенное решение.

1975 — создание рекомбинантного инсулина.

1980 — присуждение Нобелевской премии по химии П. Бергу (половинная) — за фундаментальные исследования нуклеиновых кислот, в частности, рекомбинантной ДНК; другая половина вручена У. Гилберту и Ф. Сенгеру за их вклад в определение последовательности оснований в нуклеиновых кислотах.

1980 — изобретение полимеразной цепной реакции — ПЦР (polymerase chain reaction — PCR). Метод обеспечил существенный методический прогресс в молекулярной биологии. Автор изобретения — американский биохимик Кэри Муллис (1944–2019) — удостоен за это Нобелевской премии по химии в 1993 году (совместно с Майклом Смитом — Великобритания).

1980 — С. Коэн и Г. Бойер получили патент США на использование вирусных и плазмидных векторов для создания рекомбинантной ДНК.

1985 — первые полевые испытания генетически модифицированных растений, устойчивых к насекомым, вирусам и бактериям.

1985 — в журнале «Science» опубликовано сообщение о новой технологии, основанной на ПЦР, позволяющей генерировать миллиарды копий последовательности гена-мишени за несколько часов (Cetus Corporation).

1985 — вышло в свет руководство Национального института здоровья (США) для осуществления экспериментов по генотерапии на людях.

1990 — начало реализации проекта «Геном человека» под руководством Дж. Уотсона.

1990 — первые успешные полевые испытания генетически модифицированного хлопка (Calgene Inc.).

1995 — завершено исследование полной генетической последовательности невирусного организма — бактерии *Haemophilus influenzae* (1,8 млн. пар нуклеотидов).

2000 — объявлено об общем плане последовательностей в человеческом геноме, то есть о первой реконструкции его полного генома (фактическое завершение проекта «Геном человека» — 2003 год).

2000 — сообщено о секвенировании генома дрозофилы (165 млн. пар оснований, 14 тыс. генов).

2000 — создание «золотого риса» — генно-модифицированной культуры, вырабатывающей повышенное количество бета-каротина.

2000 — составление полной карты генома растения *Arabidopsis*.

ПЕРСОНАЛИИ

175 лет со дня рождения И.И. Мечникова (1845–1916).

130 лет со дня рождения Г. Меллера (1890–1967), лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине 1946 г.

120 лет со дня рождения Ганса Кребса (1900–1981).

120 лет со дня рождения Н.В. Тимофеева-Ресовского (1900–1981).

115 лет со дня рождения испано-американского биохимика Северо Очоа (1905–1993).

110 лет со дня рождения французского молекулярного биолога Жака Моно (1910–1976), лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине 1965 г. (совместно с Андре Львовым и Франсуа Жакобом).

110 лет со дня рождения Дороти Ходжкин (1910–1994), английской химика, лауреата Нобелевской премии (1964) за рентгеноструктурное исследование структуры биологически активных веществ (холестерина, пенициллина, витамина В12, инсулина).

105 лет со дня рождения П. Медавара (Нобелевская премия 1960 г.).

100 лет со дня рождения Эдмонда Генри Фишера (род. в 1920 г.), швейцарско-американского биохимика, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине 1992 года (совместно с Эдвином Кребсом), присужденной за открытия, касающиеся обратимого белкового фосфорилирования как механизма биологической регуляции.

100 лет со дня рождения П.Д. Митчелла (1920–1992), английского биохимика, лауреата Нобелевской премии по химии 1978 г. за открытие хеомотического механизма синтеза АТФ.

100 лет со дня рождения Б. Бенасеррафа (1920–2011), американского иммунолога, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине 1980 г. за открытие главного комплекса гистосовместимости: группы генов, отвечающих за распознавание чужеродных веществ и развитие иммунного ответа (совместно с Ж. Доссе и Дж.Снеллом).

100 лет со дня рождения Питера Денниса Митчелла (1920–1992), английского биохимика, лауреата Нобелевской премии по химии (1978) «За вклад в понимание процесса переноса биологической энергии, сделанный благодаря хемиосмотической теории». Человек со сложной научной и личной судьбой, Обычные биографические данные изложены в различных информационных источниках, в основном Интернете. Более подробные сведения о жизни и деятельности П.Д. Митчелла представлены в книге В.П. Скулачева «Рассказы о биоэнергетике». 2-е изд. — М.: Молодая гвардия, 1985 (имеется электронная версия с фрагментом о Митчелле).

95 лет со дня рождения Дж. Ледерберга (1925–2008), американского генетика и биохимика, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине 1958 г. за фундаментальные исследования организации генетического материала и бактерий (вместе с Дж. Бидлом и Э. Тейтмом).

80 лет со дня рождения П. Догерти (р. в 1940 г.), австралийского ученого, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине 1996 г. за открытия в области иммунной системы человека, в частности ее

способности выявлять клетки, пораженные вирусом (совместно с Р. Цинкернагелем).

125 лет со дня смерти Луи Пастера.

110 лет со дня смерти Р. Коха.

75 лет со дня смерти Т.Х. Моргана.

75 лет со дня смерти Ганса Фишера (1881–1945), лауреата Нобелевской премии по химии 1930 г.

50 лет со дня смерти Отто Генриха Варбурга (1883–1970), лауреата Нобелевской премии в области

физиологии и медицины 1931 года за открытие природы и функций «дыхательных ферментов».

50 лет со дня смерти Ф. Рауса (1879–1970), открывшего вирус саркомы, носящей его имя.

40 лет со дня смерти А.Н. Несмеянова, президента Академии наук СССР.

35 лет со дня смерти Р.Р. Портера (1917–1985) — удостоен Нобелевской премии по физиологии и медицине 1972 г. за установление химического строения антител (вместе с Дж. Эдельманом).

1. Рукописи статей и других материалов представляются в редакцию на бумажном носителе (формат А4) или в электронном виде (на дискете или по электронной почте с обязательным уведомлением).
2. Текст набирается в Microsoft Word, шрифт — Times New Roman, размер шрифта — 12, межстрочный интервал — полуторный. Размещение на листе формата А4 со стандартными полями. Кроме текста статьи, добавляются сведения об авторе (ах): Ф.И.О., место работы, должность, научные степень и звание, адреса для переписки и электронной связи, номера факсов и телефонов). Необходимо сопроводительное письмо из учреждения.
3. Объем рукописи: оригинальные статьи — не более 12–14 стр. (в среднем 22000 знаков), не более 25 цитированных авторов; обзоры — не более 20–24 стр. (в среднем 40000 знаков), список литературы — не более 50 авторов. Требования к композиции рукописи: 1) оригинальные статьи — УДК, название, автор (ы), место работы, резюме на русском и английском языках, ключевые слова, введение, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение (выводы), литература, список сокращений; 2) краткие сообщения и обзоры строятся в виде сплошного текста, без вышеуказанных рубрикаций, со списком литературы, резюме на русском и английском языках; 3) остальные материалы (письма в редакцию, хроникальные сообщения, рецензии и т.д.) представляются в произвольной форме.
4. Требования к оформлению содержания рукописи (таблицы, графики, формулы, фотографии, рисунки и др.). Рисунки прилагаются отдельно к тексту рукописи в бумажном и электронном виде в формате TIF или JPEG. Таблицы помещаются по ходу текста или прилагаются отдельно. Порядок оформления иллюстративного и иного дополнительного (пояснений, примечаний, благодарностей и т.д.) материала к текстам обычный.
5. Требования к цитированной литературе: Список литературы оформляется или в алфавитном порядке (вначале — литература на русском языке, затем — на иностранных), или по порядку упоминания и ссылок в тексте при использовании цифр. В последнем случае номер цитированного источника берется в тексте в квадратные скобки. Оформление отдельного источника литературы осуществляется в соответствии с общепринятыми

для научных изданий библиографическими требованиями, включая международные правила.

6. Не допускается публикация работ, уже напечатанных или посланных в редакции других изданий.
7. При несоблюдении указанных правил статьи редакцией не принимаются.
8. Принятые к публикации рукописи проходят рецензирование, после чего принимается окончательное решение о возможности печатания. Отклоненные рукописи не возвращаются.
9. Редакция не несет ответственности за достоверность фактов, выводы и суждения, приведенные в представленном к печати и опубликованном материале авторов.
10. Редакция оставляет за собой право делать научную и литературную правку, в том числе сокращать объем статей.
11. Адрес редакции указан на титульном листе журнала.
12. Журнал является безгонорарным. Редакция резервирует для автора статьи по 1 экземпляру журнала. По вопросам приобретения отдельных номеров журнала следует обращаться в редакцию.
13. Имеется электронный архив журнала на сайте Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (www.biorosinfo.ru).



Подписано к печати 30.03.2020
Формат 60/90¹/₈. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 4,0. Тираж 1000 экз.

ООО «Издательство «БИОСФЕРА»
109147 Москва, ул. Марксистская, 20, стр. 8
Тел.: +7 (495) 763-18-41; E-mail: biosphere@biorosinfo.ru

ОБЩЕСТВО БИОТЕХНОЛОГОВ РОССИИ ИМ. Ю.А. ОВЧИННИКОВА

Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (ОБР) создано в 2003 г., зарегистрировано Минюстом России.

Главными целями деятельности ОБР являются:

- содействие развитию биотехнологии в России как приоритетного направления научно-технического прогресса, основы повышения уровня жизни и благосостояния ее граждан;
- содействие сохранению научного и научно-технологического потенциала биотехнологии в различных отраслях народного хозяйства, достижению приоритета российской науки;
- обеспечение обмена научными идеями и научно-техническими достижениями, передовым производственным опытом;
- содействие развитию сотрудничества ученых, инженеров, специалистов с мировым научным и общественно-политическим сообществом;
- создание условий для творческой работы, роста профессионализма и компетентности, более полного использования интеллектуального потенциала членов организации в интересах развития науки и производства.

Для достижения этих целей ОБР осуществляет различные мероприятия, в том числе проводит конференции, симпозиумы, рабочие совещания. Регулярно проводится Съезд Общества биотехнологов России.

Издается журнал «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова» совместно с Информационно-аналитическим центром медико-социальных проблем.

ОБР имеет отделения в 57 регионах России и объединяет свыше 3000 членов.

ОБР является членом Европейской федерации биотехнологии.

ОБР тесно сотрудничает с Союзом биотехнологов и другими общественными и государственными организациями, научными и образовательными учреждениями по профилю.

Основой организационной деятельности ОБР являются региональные отделения, тесно взаимодействующие с Центральным Правлением и Секциями (экспертными группами).

Членство в ОБР является бесплатным для физических лиц.

Контакты: Адрес: 123060, г. Москва, а/я 3

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: vestnik@biorosinfo.ru; www.biorosinfo.ru