

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования

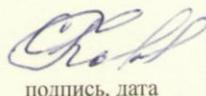
**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.  
ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра биохимии и биофизики

**СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ  
ТРАНСФОРМАЦИИ КВЕРЦЕТИНА В ПРИСУТСТВИИ БАКТЕРИЙ  
*AZOSPIRILLUM BRASILENSE* SP245**

Автореферат бакалаврской работы  
студентки 4 курса 421 группы  
направления подготовки бакалавриата - 06.03.01 Биология  
Биологического факультета  
Цвень Анны Сергеевны

Научный руководитель:  
профессор, док. биол. наук

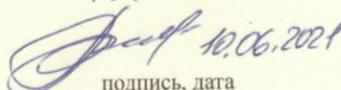


С.А. Коннова

подпись, дата

10.06.2021

Научный консультант:  
канд. хим. наук



В.С. Гринёв

подпись, дата

Зав. кафедрой:  
профессор, док. биол. наук



С.А. Коннова

подпись, дата

10.06.2021

Саратов 2021

**Введение.** Флавоноиды относятся к числу чрезвычайно широко распространенных растительных метаболитов. Они могут стать удобным инструментом воздействия на индукцию биосинтеза бактериями метаболитов, вовлеченных во взаимодействие с растениями. Однако большинство наиболее эффективных флавоноидов гидрофобны, и, как следствие, мало растворимы в воде. Очевидно, что столь активные химически и фотохимически молекулы при взаимодействии с компонентами среды культивирования бактерий могут подвергаться структурным изменениям, что существенным образом сказывается на их свойствах, и отражается в их спектральных характеристиках. Однако характер трансформации флавоноидов бактериями в ходе метаболизма исследован недостаточно. В связи с этим исследование, целью которого явилось спектрофлуориметрическое выявление флавоноида кверцетина и продуктов его трансформации ферментами культуральной жидкости бактерий рода *Azospirillum*, а также лакказой (из культуры *Trametes versicolor* DSM11269, как препарата сравнения) представляется перспективным и отличается новизной и актуальностью.

Для реализации цели решали следующие задачи:

1. Определить оптимальные концентрации кверцетина, а также параметры эксперимента, позволяющие регистрировать спектры флуоресценции растворов флавоноида, находящегося в ионизированной форме.
2. Используя метод спектрофлуориметрии обнаружить остаточные количества кверцетина и продуктов его окисления в культуральной жидкости до и после культивирования с микробными клетками.
3. Оптимизировать параметры эксперимента с участием ферментного препарата из погруженной культуры *Trametes versicolor* DSM11269 с учетом его биохимических свойств.

4. Определить на основе спектров флуоресценции вероятное строение продуктов трансформации кверцетина под действием фермента лакказы, выделенного из *Trametes versicolor* DSM11269.

**Структура и объем работы.** Работа изложена на 46 страницах машинописного текста и включает 7 разделов: список сокращений и условных обозначений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение, заключение, список использованных источников, содержащий 78 наименований.

**Основное содержание работы:** Под термином флавоноиды объединены различные связанные между собой соединения общей формулы углеродного скелета C<sub>6</sub>–C<sub>3</sub>–C<sub>6</sub> и их производные. В основе молекулы флавоноида лежит структура флавана, которая состоит из двух бензольных колец и одного гетероциклического, замещённого ароматическим, обозначаемых А, С и В, соответственно. Флавоноиды играют существенную роль в установлении растительно-микробного взаимодействия, как показано на примере формирования бобово-ризобиального симбиоза. Синтезируемые растением-хозяином молекулы флавоноидной природы служат сигналом для микроорганизмов, которые откликаются на них экспрессией генов, необходимых для последующего взаимодействия с растением. В качестве модельного объекта исследования ассоциативных симбиозов часто используются бактерии рода *Azospirillum*. Данные соединения при взаимодействии с компонентами среды культивирования бактерий могут подвергаться различным трансформациям, что существенным образом сказывается на их свойствах и спектральных данных.

Работа проводилась на базе ИБФРМ РАН в 2020-2021 гг. Грамотрицательные бактерии *A. brasilense* штамма Sp245 были предоставлены коллекцией микробных культур ИБФРМ РАН. Бактерии рода *Azospirillum* часто используют как модельный объект исследования

ассоциативных симбиозов. Азоспириллы – граммотрицательные азотфиксирующие ризобактерии вибриоидной или спиральной формы с характерным винтообразным движением.

*A. brasilense* отличаются подвижностью за счет полярного жгутика, используемого для перемещения в жидких средах, и дополнительных латеральных жгутиков для движения в более плотных средах.

У бактерий р. *Azospirillum* существуют механизмы, которые поддерживают их жизнедеятельность при дефиците питания. Например, азоспириллы могут трансформироваться в цистоподобные образования, и это повышает их выживаемость в ризосфере. Эти морфологические изменения сопровождаются развитием внешней оболочки, состоящей из полисахаридов, а также аккумуляцией поли-β-гидроксibuтирата, который служит источником углерода и энергии в условиях стресса, что обеспечивает выживаемость бактерий р. *Azospirillum*.

Ферментный препарат лакказа из погруженной культуры *Trametes versicolor* DSM11269 был любезно предоставлен ИБФРМ РАН. Ферментный препарат из погруженной культуры *Trametes versicolor* DSM11269 выращивали в течение 7-10 суток на богатой среде для базидиомицетов, далее удаляли мицелий фильтрованием через 4 слоя марли, культуральную жидкость замораживали для удаления внеклеточных полисахаридов. Ферментный препарат был стабилен при хранении при -20 °С. Перед процедурой очистки грубый ферментный препарат размораживали и фильтровали через бумажный фильтр для удаления осадка полисахаридов и фракционировали сульфатом аммония на «ледяной бане» в течение 3 ч при постоянном перемешивании. Для формирования осадка препарат оставляли на холоду на 12 ч. Осадок, образующийся при 20-80% насыщения  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , собирали центрифугированием при 4000 об./мин. 30 мин. Преципитат ресуспендировали в 50 мМ NaК-фосфатном буфере рН 6,0 и диализовали против 3 л этого же буфера в течение ночи. За единицу активности

принимали количество фермента, катализирующего образование 1 мкмоль продукта окисления в минуту.

Спектры поглощения и флуоресценции регистрировали при комнатной температуре на спектрометре Chirascan (Applied Photophysics, Великобритания), снабженном флуориметрическим детектором. Диапазон сканирования при регистрации спектров возбуждения – 200-600 нм, спектров эмиссии – 200-1000 нм. Спектры эмиссии регистрировали при возбуждении длинами волн, соответствующими максимумам и точкам вблизи максимумов на спектрах возбуждения. Концентрации кверцетина в модельных экспериментах составляли 20, 50, 100, 200 мкг/мл. Взвешивание осуществляли на аналитических весах Axis AGN (Польша). Гомогенизацию труднорастворимых веществ для получения растворов проводили на шейкере Reax top (Heidolph, Германия). В работе также были использованы магнитная мешалка с подогревом MSH–300. Величины pH растворов измеряли на цифровом pH-метре MT320 (Mettler Toledo, Испания). Длины оптического пути 2 и 10 мм. В результате предварительной серии экспериментов была подобрана оптимальная для регистрации спектров флуоресценции концентрация кверцетина (100 мкг/мл) и длина оптического пути (2 мм).

На первом этапе исследования в качестве растворителя для работы с кверцетином была выбрана фосфатно-солевая буферная (ФСБ) система, поскольку в дальнейшем предполагается использовать общую методику измерения флуоресценции для работы, в том числе, с бактериальными клетками. В то же время, как следует из литературных данных, кверцетин интенсивно флуоресцирует в анионной форме, которая образуется в щелочной среде. Таким образом, целесообразно регистрировать спектры флуоресценции кверцетина как в ФСБ системе при pH, близком к оптимуму для клеток *Azospirillum*, так и после приведения pH среды к значению 12, при котором обеспечивается приемлемый для регистрации сигнал от анионных форм флавоноида.

На спектре возбуждения раствора кверцетина с концентрацией 100 мкг/мл в ФСБ при рН 7 можно видеть, что в области ~420-500 нм имеется ряд перекрывающихся максимумов, отвечающих различным цепям сопряжения в молекуле кверцетина, однако возбуждение излучением с длинами волн 420, 450, 470 нм не приводит к выраженной эмиссии, а наблюдается слабовыраженный сигнал первого обертона на удвоенной длине волны. При изменении рН среды до 12 профиль спектра возбуждения кверцетина с той же концентрацией меняется существенно, возникает два максимума при ~275 и 400 нм приблизительно одинаковой интенсивности. При этом при стоянии раствора с течением времени в спектре возбуждения наблюдается изменение соотношения интенсивностей полос, а более длинноволновый пик претерпевает батохромный сдвиг, и максимум при 470 нм совпадает с таковым для спектра возбуждения кверцетина при рН 7, что говорит о смещении равновесия в системе в сторону молекулы флавоноида в форме, характерной для нейтральной среды.

Инкубация раствора кверцетина в ФСБ с концентрацией 100 мкг/мл с клетками *A. brasilense* Sp245 приводит к изменению спектра возбуждения надосадочного раствора, имеющего в составе, предположительно, кверцетин и продукты его трансформации. По сравнению с соответствующим спектром возбуждения кверцетина в отсутствие клеток, мы наблюдали гипсохромное смещение длинноволновой полосы на приблизительно 200 нм и появление наиболее интенсивной полосы в спектре, длина волны которой соответствует компоненту, наблюдаемому при изменении рН среды до 12. Было обнаружено, что при возбуждении длинами волн УФ диапазона наблюдается интенсивная флуоресценция компонентов раствора, выделенного после инкубирования кверцетина с клетками. Возбуждение излучением с длинами волн в диапазоне 400-470 нм не приводит к выраженной флуоресценции, в спектрах наблюдаются только соответствующие слабоинтенсивные первые обертоны при удвоенной длине волны, аналогично спектрам кверцетина в

ФСБ при рН 7. Таким образом, при нейтральном значении рН кверцетин не проявляет в растворе тенденцию к флуоресценции, а смещение показателя кислотности среды к 12 даёт возможность регистрировать спектры эмиссии при возбуждении раствора длинами волн, соответствующих более длинноволновому максимуму на спектре возбуждения (вблизи 400 нм).

Инкубирование раствора кверцетина с клетками *Azospirillum* приводит, согласно спектральным данным, полученным при нейтральном рН, к изменению структуры флавоноида, что сопровождается в спектре возбуждения появлением более коротковолнового максимума при ~230 нм и исчезновением пика вблизи 400 нм, что можно объяснить укорочением цепи сопряжения в продукте трансформации по сравнению с исходным кверцетином. В процессе культивирования в среде выращивания клеток происходит защелачивание, а также выделение экстраклеточных ферментов – фенолоксидаз. Среди вероятных превращений флавоноидов под действием этих двух факторов можно предположить раскрытие  $\gamma$ -пиронового кольца С с образованием соответствующего халкона в щелочной среде, а также окисления фенольных фрагментов до соответствующих хиноидных форм и С-димеризация, которая с химической точки зрения, тоже представляет собой процесс окисления, т.к. сопровождается удалением атомов водорода ароматических колец.

Наличие двух максимумов в диапазоне 230-280 нм и отсутствие длинноволнового максимума позволяют сделать вывод о предпочтительности первых двух процессов, либо их комбинации, поскольку процесс димеризации сопровождается удлинением цепи сопряжения.

Азоспириллы в процессе жизнедеятельности выделяют во внеклеточную среду пул низко- и высокомолекулярных соединений различных классов, включающих полисахариды, вещества белковой природы, в том числе, обладающих ферментативной активностью. Можно

предположить, что часть этих ферментов могут обладать фенолоксиляющей активностью.

Были проведены исследования, которые доказывают, что подвижные и непигментированные виды азоспирилл обладают лакказной активностью. Также было выдвинуто предположение, что наряду с лакказой весь комплекс ферментов, окисляющих фенол, вырабатывается бактериями, поскольку все ферменты способствуют деградации субстрата.

С целью выявления одного из возможных окислителей, содержащихся среди выделяемых в окружающую среду азоспириллами высокомолекулярных веществ, нами был выбран в качестве модельного белок, выделенный из гриба *Trametes versicolor* DSM11269. Показано, что он обладает активностью в отношении ряда соединений полифенольной природы и действует в широком диапазоне значений pH. Для экспериментов по окислению кверцетина препаратом фермента была выбрана буферная система, состоящая из 0,1 М лимонной кислоты и 0,2 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, смешанных в соотношении в соответствии с требуемым значением pH и позволяющая проводить окисление при трёх значениях pH – 3,5, 5,5 и 7,5. Было показано, что окисление использованным нами ферментом может проходить легче в присутствии медиатора – АБТС, роль которого сводится в акцептировании и переносе неспаренного электрона от субстрата к окислителю. Для выявления оптимальных условий трансформации лакказой кверцетина нами были проведены дополнительные эксперименты, показавшие, что использование трёхкомпонентной системы, включающей АБТС, приводит к конкурирующему процессу его окисления. Выводы сделаны на основании анализа спектров флуоресценции контрольных образцов, включающих АБТС и фермент, которые отличались от таковых, записанных для трёхкомпонентной системы. Это делает использование АБТС в качестве медиатора при исследуемом нами ферментативном

окислении кверцетина скорее нежелательным, и дальнейшие эксперименты проходили в отсутствие АБТС.

Спектр возбуждения кверцетина, инкубированного с раствором лакказы в кислой среде при рН 3,5 содержит три выраженных максимума при ~265, 365 и 455 нм приблизительно одинаковой интенсивности. При увеличении рН среды до величины 5,5 профиль спектра возбуждения меняется незначительно, при этом наблюдается значительное уширение полос с максимумами вблизи 280 и 350 нм без изменений соотношения их интенсивностей. Интенсивность полосы с максимумом при 440 нм при рН 5,5, по сравнению, с таковой в кислой среде при рН 3,5 уменьшилась. При дальнейшем увеличении рН среды до 7,5 в спектре возбуждения наблюдается значительное увеличение интенсивности и батохромное смещение максимума поглощения при 380 нм, по сравнению с рН 3,5. Аналогично, наблюдается красное смещение максимума вблизи 475 нм при одновременном уменьшении его интенсивности. При этом, профиль спектра в области 230-300 нм значительных изменений не претерпевает.

Аналитическим доказательством наличия нескольких форм, находящихся в равновесии, является присутствие особой точки пересечения спектральных кривых, в которой поглощательная способность предполагаемых молекул, находящихся в равновесии, будет одинаковой – изобестической точки. На основании этого, можно сделать вывод, что в растворе находятся в равновесии две молекулярные формы, одна из которых содержит две хромофорные группы, а другая форма – одну. Предполагаемое ранее окисление кверцетина в халкон при инкубировании с клетками *A. brasilense* Sp245 сопровождалось аналогичными изменениями в спектрах возбуждения флуоресценции.

Спектры эмиссии при рН 3,5 и 5,5 при возбуждении излучением с длинами волн в диапазоне 260-375 нм характеризуются присутствием поглощения в широкой области от 350 до 550 нм, сложным для однозначной

интерпретации. При изменении pH среды в спектрах эмиссии при возбуждении длинами волн 250 300 и 385 нм наблюдается выраженная флуоресценция с максимумом вблизи 480 нм, сопоставимая по интенсивности с таковой для кверцетина в ФСБ в присутствии клеток *A. brasilense* Sp245.

**Заключение:** Таким образом, модельный эксперимент с окислением кверцетина с помощью фермента лакказы из *Trametes versicolor*, обладающей фенолоксидазной активностью в отношении ряда фенольных соединений и способной действовать при различных значениях pH, подтверждает выдвинутое ранее предположение о трансформации клетками *A. brasilense* Sp245 кверцетина в растворе посредством выделения ферментов до соответствующего халкона. При этом, как исходный кверцетин, так и предполагаемый продукт его трансформации – халкон, – существуют в растворе при различных pH в виде нескольких депротонированных форм, динамически превращающихся друг в друга, что отражается на их спектральных свойствах.

Анализ полученных нами в данной работе результатов позволяет сделать следующие выводы:

1. При помощи спектрофлуориметрического метода исследования удалось обнаружить остаточные количества кверцетина и продуктов его окисления в культуральной жидкости до и после культивирования с микробными клетками.

2. Показано, что инкубация бактерий *A. brasilense* Sp245 в присутствии кверцетина приводит к трансформации флавоноида, о чем свидетельствуют изменение показателей его флуоресценции.

3. Были определены параметры эксперимента с участием ферментного препарата из погруженной культуры *Trametes versicolor* DSM11269 с учетом его биохимических свойств.

4. Согласно спектральным данным вероятное строение продуктов трансформации кверцетина под действием фермента лакказы, выделенного из *Trametes versicolor* DSM11269 идентично обнаруженным из эксперимента с клетками бактерий *A. brasilense* Sp245.

