



УДК 542.06;615.331

СТРУКТУРА И ИЗОФОРМНЫЙ СОСТАВ СУРФАКТИНА, СИНТЕЗИРУЕМОГО МУТАНТНЫМ ШТАММОМ *Bacillus subtilis* PY79^{sfp+}

© 2026 г. Е. Ю. Линдин*, **, В. С. Трефилов*, **, М. Б. Вирысов**, М. В. Серебрякова**,
А. Л. Ксенофонтов**, Т. С. Орецкая**, #, Е. А. Кубарева**

* Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет,
Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1

** Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1

Поступила в редакцию 13.10.2025 г.

После доработки 30.10.2025 г.

Принята к публикации 31.10.2025 г.

Сурфактин (Sur) – циклический липопептид, продуцируемый бактериями рода *Bacillus*, широко востребован в промышленности и медицине. Разработка штаммов-суперпродуцентов Sur актуальна для увеличения его производства и снижения себестоимости. В данной работе впервые получены клетки *Bacillus subtilis* штамма PY79 с восстановленной сурфактин-продуцирующей активностью за счет экспрессии интактного гена *sfp* с плазмиды pHT01. Показано, что в штамме PY79^{sfp+} синтезируется в 2 раза больше Sur (300 мг/л) по сравнению со штаммом NCIB 3610. Установлено, что делеции генов 6S-1 и 6S-2 РНК не оказывают влияния на выход целевого продукта. Аминокислотная последовательность синтезируемых изоформ Sur во всех изучаемых штаммах одинакова. Длина остатка жирной кислоты варьирует от C₁₃ до C₁₅. Преобладающей формой выступает C₁₅-сурфактин, обладающий лучшими поверхностно-активными характеристиками для использования в ряде отраслей промышленности. Полученные результаты демонстрируют один из возможных путей повышения выхода сурфактина, что способствует расширению сферы его применения.

Ключевые слова: сурфактин, ВЭЖХ, анализ изоформ, *Bacillus subtilis*, 6S РНК

DOI: 10.7868/S1998286026020071

ВВЕДЕНИЕ

Биологические поверхностно-активные вещества (биоПАВ) – семейство биосовместимых и биоразлагаемых соединений, обладающих более высокой удельной поверхностной активностью, чем большинство синтетических ПАВ [1, 2]. Один из наиболее исследованных биосурфактантов семейства липопептидов – сурфактин (Sur), молекула которого состоит из циклического гептапептидного фрагмента, этерифицированного жирной кислотой (C₁₂–C₁₆). Основные продуценты Sur – бактерии рода *Bacillus*, которые синтезируют смесь нескольких изоформ Sur, отличающихся как аминокислотным составом, так и фрагментами жирных кислот. При этом соотношение изоформ Sur может

определять физико-химические свойства смеси, полученной в результате ферментативного синтеза. В работе [3] показано, что повышение доли C₁₅-Sur в буровом растворе приводит к повышению количества извлеченной нефти из песчаных пластов. При увеличении числа атомов углерода в боковой цепи жирной кислоты понижается критическая концентрация мицеллообразования (ККМ) (0.35 мМ для C₁₂ и 0.08 мМ для C₁₅), улучшаются поверхностно-активные характеристики, а именно уменьшаются поверхностное натяжение воды (до 32.2 мН/м для C₁₂ и 27.6 мН/м для C₁₅) и значение адсорбционной энергии Гиббса [4]. Таким образом, изоформный состав продуцируемого Sur – важный параметр данного соединения для промышленных и исследовательских целей.

Сокращения: MALDI-TOF – времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight); MS-MS – тандемная масс-спектрометрия; Sur – сурфактин; биоПАВ – биологические поверхностно-активные вещества; ККМ – критическая концентрация мицеллообразования.

Автор для связи: (тел. +7 (916) 206-41-02; эл. почта: oretskaya@belozersky.msu.ru).

Создание штамма-суперпродуцента Sur приведет к увеличению выхода Sur по сравнению с уже изученными природными продуцентами. Среднее содержание Sur в культуральных жидкостях составляет 300–500 мг/л [5]. Однако путем генно-инженерных модификаций удастся значительно повысить выход синтезируемого вещества. В работе [6] в качестве исходного штамма использовали *B. subtilis* 168 – модельный штамм при изучении бактерий этого рода. Он лишен сурфактин-синтезирующей активности из-за мутации в гене *sfp*, который кодирует фермент 4'-фосфопантетеинилтрансферазу, иницирующий процесс сборки молекулы Sur в клетках (фенотип *Sfp*[–]). После вставки интактной последовательности *sfp* выход Sur составил ~0.35 г/л, а финальный выход после проведения 38 мутаций – 12.8 г/л. Нами показано, что бактерия *B. subtilis* NCIB 3610 также может быть использована для генно-инженерного конструирования суперпродуцента Sur, поскольку она не несет мутаций, отрицательно влияющих на биосинтез данного соединения. Штамм PY79 хотя и имеет мутацию, аналогичную штамму 168, содержит области протяженных делеций, затрагивающие гены, препятствующие биосинтезу Sur [7]. Поэтому восстановление сурфактин-синтезирующей активности и изоформная характеристика Sur, продуцируемого штаммом PY79^{sfp+}, актуальны как с фундаментальной, так и с прикладной точек зрения.

Ранее было показано влияние малой некодирующей 6S-1 РНК на количество мРНК генов сурфактинсинтетазы, а также генов, косвенно участвующих в регуляции биосинтеза Sur, в клетках *B. subtilis* NCIB 3610 [8]. Бактерия *B. subtilis* имеет две 6S РНК: 6S-1 и 6S-2. Графический вид зависимости количества 6S-1 РНК от времени похож на зависимость количества Sur в культуральной жидкости от времени [9], в то время как 6S-2 РНК вовлечена в регуляцию процесса формирования биопленки [10], так же как и Sur [11].

В рамках данной работы предполагалось восстановить сурфактин-синтезирующую активность, охарактеризовать структуру и изоформный состав продуцируемого вещества в клетках *B. subtilis* PY79, а также исследовать влияние нокаута генов 6S-1 и 6S-2 РНК на процесс биосинтеза Sur.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Возможность использования клеток *B. subtilis* PY79 в качестве штамма-основы для суперпродуцента Sur. В клетках *B. subtilis* за биосинтез

Sur отвечает оперон *srfA*, состоящий из четырех генов: *srfAA*, *srfAB*, *srfAC* и *srfAD*. Каждый из них кодирует одну из субъединиц нерибосомальной пептидной синтетазы Sur [8]. На начальном этапе мы проверили уровень транскрипции первых двух генов оперона *srfA* – *srfAA* и *srfAB* – в клетках дикого типа штамма PY79 (как главного объекта нашего исследования). Аналогичные эксперименты для природного штамма NCIB 3610, который обладает способностью синтезировать Sur, были проведены нами ранее [9]. С использованием метода количественной ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией (ОТ-кПЦР) было показано, что относительное количество мРНК генов *srfAA* и *srfAB* в клетках *B. subtilis* PY79 примерно на порядок превышает таковое в клетках штамма NCIB 3610 после 12 ч клеточного роста (рис. 1а). Было выбрано время, соответствующее ранней стационарной фазе роста, поскольку известно, что биосинтез Sur начинается в переходной фазе и достигает своего максимума в стационарной фазе [9].

Далее в работе было изучено влияние нокаута генов только 6S-1 РНК (линия ΔA), только 6S-2 РНК (линия ΔB), а также совместной делеции обоих генов (линия ΔAB) на количество мРНК гена *srfAA* в разных фазах клеточного роста. Данный ген был выбран, поскольку он первый в опероне *srfA*, который кодирует фермент сурфактинсинтетазу и имеет один, общий для всех генов промотор [10]. Были исследованы все фазы клеточного роста – экспоненциальная, переходная, ранняя и поздняя стационарная, что соответствует 2, 6, 12 и 28 ч роста. Делеция гена 6S-1 РНК приводит к увеличению количества мРНК *srfAA* в 3–4 раза только в поздней стационарной фазе (рис. 1б, желтые столбцы). В то же время делеция гена 6S-2 РНК не влияет на эффективность транскрипции гена *srfAA* ни в одной из фаз роста (рис. 1б, оранжевые столбцы), а двойная делеция приводит к такому же по величине увеличению относительного количества мРНК гена *srfAA*, как и нокаут только 6S-1 РНК (рис. 1б, красные столбцы). В линиях ΔA и ΔAB дополнительно были проверены уровни мРНК остальных генов оперона *srfA* в поздней стационарной фазе роста. Как и ожидалось, влияние нокаута гена 6S-1 РНК и генов обеих 6S РНК распространяется на все гены оперона, кодирующего сурфактинсинтетазу (рис. 1в).

Полученные данные позволяют сделать предположение, что штамм PY79 клеток *B. subtilis* имеет высокий потенциал использования в качестве штамма-суперпродуцента Sur. Выдвинута гипотеза, что повышенное на порядок количество мРНК генов, кодирующих субъединицы сурфактинсин-

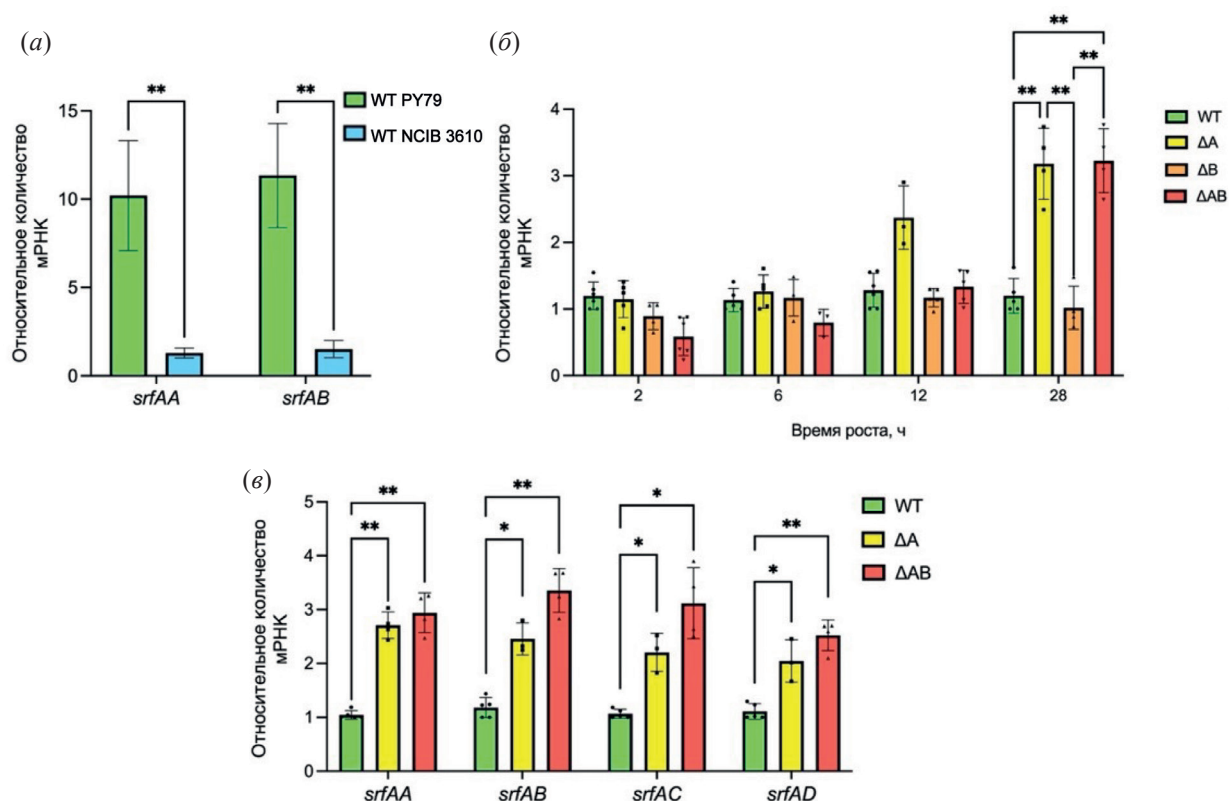


Рис. 1. Транскрипция генов оперона *srfA*, кодирующего сурфактинсинтазу, в штамме *B. subtilis* PY79. (а) – Количество мРНК первых двух генов оперона сурфактинсинтазы – *srfAA* и *srfAB* – в штаммах PY79 и NCIB 3610; (б) – эффект удаления только 6S-1 РНК (ΔA), только 6S-2 РНК (ΔB) и обеих 6S РНК (ΔAB) на уровень транскрипции гена *srfAA* в разных фазах роста клеток; (в) – количество мРНК остальных генов оперона *srfA* в поздней стационарной фазе роста клетки (28 ч) в линиях ΔA и ΔAB. Все данные получены методом кПЦР в реальном времени. Звездочки отражают статистическую значимость полученных различий: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

тетазы, по сравнению с природным продуцентом NCIB 3610 с большой вероятностью приведет к увеличенному содержанию Sur в культуральной жидкости бактерий. Известно, что генно-инженерная замена промотора оперона *srfA* в клетках рода *Bacillus*, продуцирующих Sur, приводит к росту выхода конечного соединения, например, замена нативного промотора P_{srfA} на P_{grac} привела к увеличению количества продуцируемого Sur в 1.5 раза [11], а замена P_{srfA} на P_{veg} – в 4 раза [12]. Повышенный уровень мРНК оперона *srfA* можно рассматривать как альтернативу постановки сильного промотора, поскольку стимуляция транскрипции – конечная цель усиления промоторной области. Более того, нокаут гена 6S-1 РНК, равно как и двойная делеция генов 6S-1 и 6S-2 РНК, может также способствовать увеличению количества продуцируемого клетками Sur. Характер влияния 6S-1 РНК на транскрипцию оперона *srfA* в штамме PY79 совпадает с таковым для штамма NCIB 3610, который был исследован ранее [9]. Эффекта от нокаута только гена 6S-2 РНК не наблюдается, а эффект от удаления обоих генов

сопоставим с эффектом от удаления 6S-1 РНК и, скорее всего, объясняется отсутствием именно последней.

Получение и характеристика штамма PY79 sfp^+ , продуцирующего Sur. Показано [7], что штамм PY79 не способен продуцировать Sur. С высокой вероятностью, это следствие мононуклеотидной вставки (Т в положение 467) в гене *sfp*, кодирующем 4'-фосфопантетеинилтрансферазу, отвечающую за активацию сурфактинсинтазы. Известны работы [6, 13], в которых вставка интактного гена *sfp* в геном клетки или внесение его на экспрессионной плазмиде приводило к восстановлению сурфактин-синтезирующего фенотипа (Sfp^+).

Нами было принято решение восстановить фенотип Sfp^+ клеток *B. subtilis* PY79 с помощью экспрессионной плазмиды pHT01. Для создания конструкции был использован классический метод молекулярного клонирования с использованием эндонуклеаз рестрикции (см. раздел “Эксперим. часть”). Полученной конструкцией были трансформированы заранее подготовленные компетент-

ные клетки *B. subtilis* PY79 дикого типа (WT) с получением штамма PY79^{sfp+} и всех мутантных клеточных линий (ΔA, ΔB, ΔAB). Для оценки эффективности восстановления фенотипа Sfp⁺ в клетках PY79^{sfp+} использовали колориметрический метод и ВЭЖХ (см. раздел “Эксперим. часть”). Внесение интактного гена *sfp* привело к появлению Sur в культуральной жидкости бактерий *B. subtilis* PY79 (рис. 2а). Добавление IPTG (изо-пропил-β-D-1-тиогалактопиранозид), который индуцирует транскрипцию гена *sfp* в плазмиде рНТ01, не влияло на количество синтезируемого соединения (рис. 2а). Мы считаем, что это связано с небольшой активностью промотора P_{grac} [14], а также с особенностью участия белка Sfp в процессе биосинтеза сурфактина, заключающейся в однократной активации субъединиц сурфактинсинтетазы [15]. По результатам колориметрического анализа выход Sur в клетках WT PY79^{sfp+} через 24 ч после начала клеточного роста

(рис. 2б) был в 2 раза больше количества Sur, полученного с помощью клеток WT NCIB 3610.

Этот результат хорошо коррелирует с предположением, выдвинутым ранее на основе данных сравнительного анализа геномов, о большем сурфактин-синтезирующем потенциале клеток PY79 по сравнению с клетками NCIB 3610 [7], а также с тем фактом, что в штамме PY79 количество мРНК оперона *srfA* на порядок больше, чем в штамме NCIB 3610 (рис. 1а).

На рис. 3 приведены результаты ОТ-кПЦР первых двух генов оперона *srfA* – *srfAA* и *srfAB*, полученные для клеток штамма WT PY79^{sfp+}. Результаты показывают, что внесение интактного гена *sfp* на плазмиде рНТ01 не приводит к изменению количества мРНК генов оперона *srfA*, таким образом, внесение плазмидной ДНК не сказывается на эффективности транскрипции генов данного оперона.

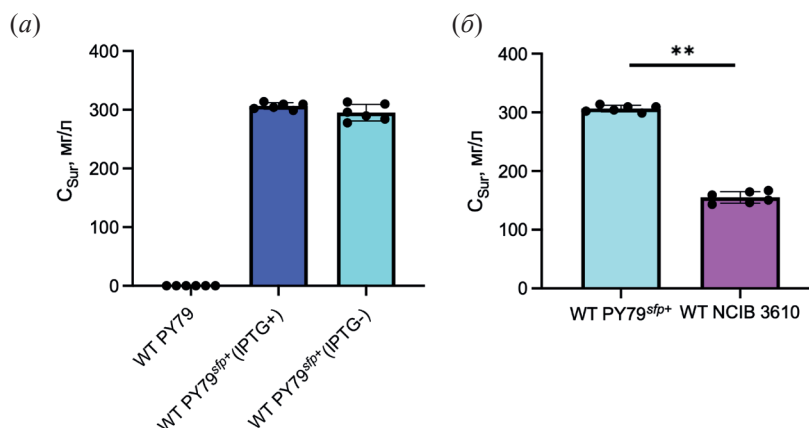


Рис. 2. Восстановление сурфактин-синтезирующей активности в штамме PY79. (а) – Проверка способности клеток PY79^{sfp+} синтезировать Sur и влияние индуктора на эффективность биосинтеза через 24 ч после начала клеточного роста в среде LB; (б) – сравнение выхода Sur в клетках дикого типа штаммов PY79^{sfp+} и NCIB 3610 через 24 ч после начала клеточного роста в среде LB. Каждый столбец – усредненное значение данных, полученных не менее чем для трех биологических повторов; пределы погрешности представляют собой стандартное отклонение, рассчитанное по выборке результатов для всех биологических повторов. Звездочки отражают статистическую значимость полученных различий: ns (статистически не значимо), $p > 0.05$; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

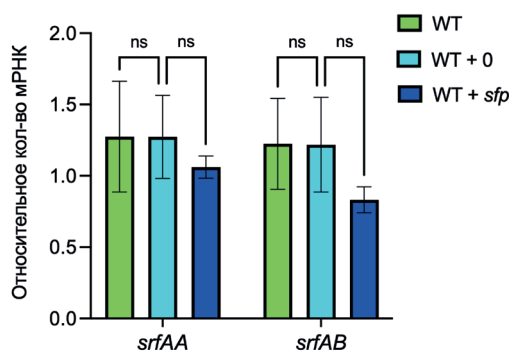


Рис. 3. Влияние плазмидной ДНК на эффективность транскрипции первых двух генов оперона *srfA*, кодирующего сурфактинсинтетазу, в штамме PY79. WT – клетки дикого типа без плазмидной ДНК, WT + 0 – клетки дикого типа с плазмидной ДНК, не несущей вставку гена *sfp*, WT + *sfp* – клетки дикого типа с плазмидной ДНК с вставкой гена *sfp* (WT + *sfp*). Результаты нормированы на WT + *sfp*.

Далее было проанализировано количество продуцируемого Sur всеми клеточными линиями штамма PY79^{sfp+} с восстановленной сурфактин-продуцирующей способностью.

Оказалось, что удаление как 6S-1/6S-2 РНК по отдельности, так и обеих 6S РНК одновременно не приводит к изменению количества вещества, продуцируемого данными клетками по сравнению с WT PY79^{sfp+} (рис. 4). Этот результат хотя и не является положительным для последующей разработки штамма-суперпродуцента, но хорошо коррелирует с результатами, полученными нами ранее, а именно с отсутствием увеличения выхода Sur в клетках NCIB 3610 с делецией гена 6S-1 РНК, несмотря на увеличение уровня транскрипции оперона *surfA* [9].

Характеристика изоформного состава коммерческого образца Sur. Определение липопептидных биоПАВ, как и любых поверхностно-активных веществ, представляет довольно слож-

ную аналитическую задачу из-за их поверхностно-активных свойств и отсутствия специфичных структурных фрагментов и функциональных групп, свойственных не только ПАВ. *B. subtilis* синтезируют семейство изоформ и гомологов Sur, отличающихся аминокислотным составом пептидного фрагмента и длиной углеводородной цепи.

Был проведен анализ коммерческого образца Sur (KANEKA, Япония). Согласно данным производителя, он представляет собой смесь изоформ с преобладанием C₁₅-Sur. Поскольку данный препарат предполагалось использовать как стандарт при анализе Sur, производимого клетками *B. subtilis* PY79^{sfp+}, в ходе работы образец был проанализирован методом ВЭЖХ. В качестве базовых использовали условия, описанные в работе [16], с оптимизацией состава элюента для улучшения разделения. На рис. 5 приведена хроматограмма стандартного образца Sur (черная линия).

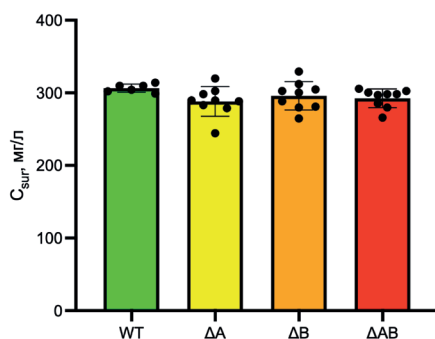


Рис. 4. Эффективность биосинтеза Sur в клетках PY79^{sfp+} после 24 ч роста в питательной среде LB. Данные получены колориметрическим методом. Каждый столбец – усредненное значение данных, полученных не менее чем для трех биологических повторов; пределы погрешности представляют собой стандартное отклонение, рассчитанное по выборке результатов для всех биологических повторов.

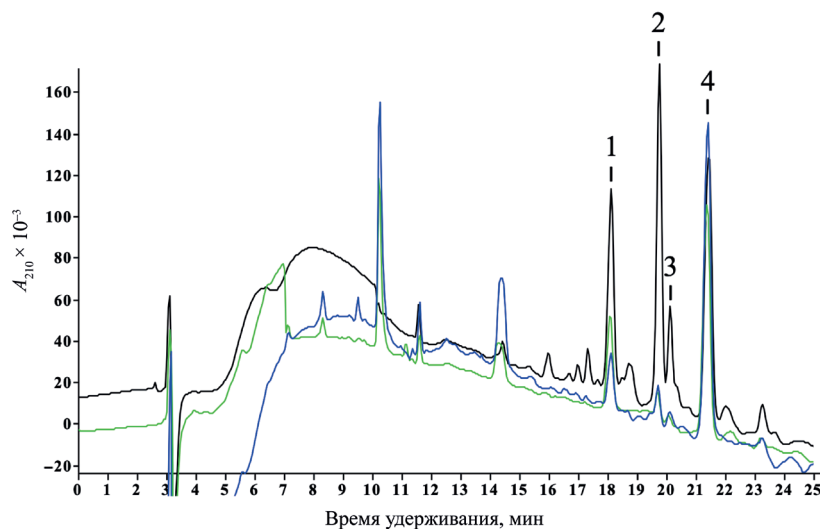


Рис. 5. Совмещение хроматограмм образца коммерческого Sur (черный цвет), экстракта Sur, синтезированного клетками PY79^{sfp+} дикого типа (зеленый), и экстракта Sur, синтезированного клетками NCIB 3610 дикого типа (синий).

Собраны четыре фракции, соответствующие пикам 1–4, которые были проанализированы методом масс-спектрометрии в вариантах MALDI-TOF и MS-MS (табл. 1). Соотнесение сигнала в масс-спектре и изоформы Sur проводили на основании данных, приведенных в работе [17].

Длину углеводородного остатка жирной кислоты определяли по масс-спектру, полученному после фрагментации молекул по пептидной связи, следующей после остатка Glu (рис. 6). Сам остаток глутаминовой кислоты отщепляется вместе с жирной кислотой, потеря 2 а.е.м. соответствует образованию двойной связи. Один из предпола-

гаемых механизмов фрагментации, соответствующий разности между сигналами в масс-спектре, приведен на рис. 7.

Для более точной характеристики стандартного образца Sur был проведен аминокислотный анализ собранных фракций изоформ. Полученные результаты нормировали на остаток Asp, поскольку во всех изоформах Sur он один. Показано, что аминокислотная последовательность выделенных изоформ Sur консервативна, и продуцируемый Sur представляет собой смесь трех изоформ, отличающихся только длиной углеводородной цепи жирной кислоты (табл. 1).

Таблица 1. Состав изоформ коммерческого образца Sur (KANEKA, Япония) и изоформ Sur, продуцируемого клетками штаммов NCIB 3610 и PY79^{sfp+} дикого типа

№ пика	Аминокислотная последовательность	Количество атомов углерода в жирной карбоновой кислоте	Рассчитанная относительная молекулярная масса	Определенная относительная молекулярная масса	Время удерживания, мин (ВЭЖХ)
Коммерческий Sur (KANEKA, Япония)					
1	ELLVDLL	C ₁₃	1008	1008.6	18.14
2	ELLVDLL	C ₁₄	1022	1022.6	19.77
3	ELLVDLL	C ₁₄	1022	1022.7	20.14
4	ELLVDLL	C ₁₅	1036	1036.7	21.45
Sur (WT NCIB 3610, 24 ч)					
1	ELLVDLL	C ₁₃	1008	1008.6	18.10
2	ELLVDLL	C ₁₄	1022	1022.6	19.73
3	ELLVDLL	C ₁₄	1022	1022.7	20.14
4	ELLVDLL	C ₁₅	1036	1036.7	21.38
Sur (WT PY79 ^{sfp+} , 24 ч)					
1	ELLVDLL	C ₁₃	1008	1008.6	18.11
2	ELLVDLL	C ₁₄	1022	1022.6	19.71
3	ELLVDLL	C ₁₄	1022	1022.7	20.13
4	ELLVDLL	C ₁₅	1036	1036.7	21.39

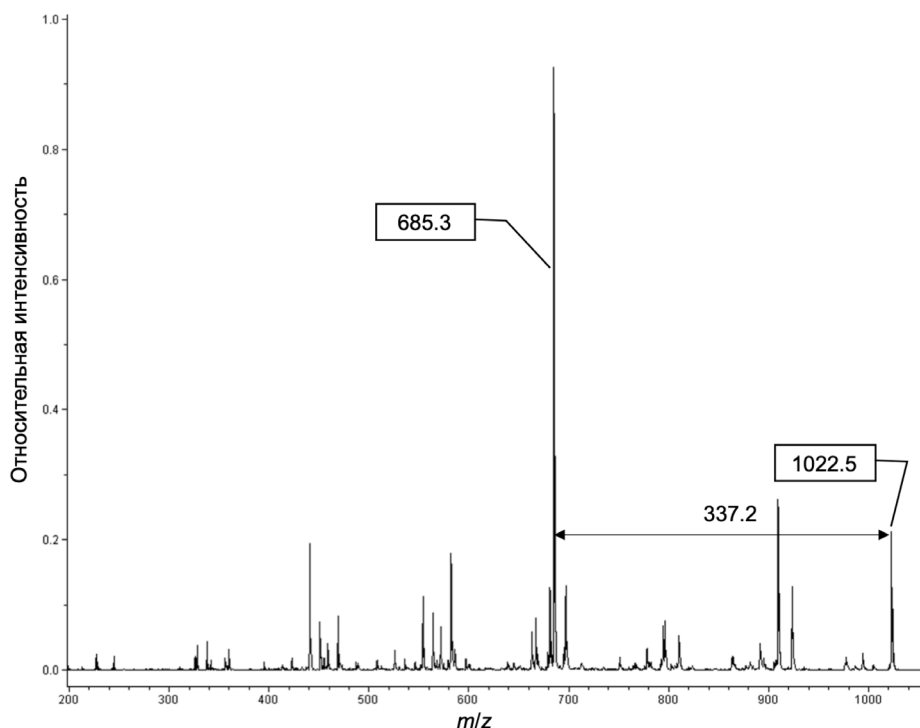


Рис. 6. Масс-спектр, полученный после фрагментации молекулы C_{14} -Sur (m/z 1022.5). Разность между исходным и основным сигналами (m/z 337.2) соответствует остатку Glu, связанному с остатком жирной кислоты C_{14} . Аналогично проанализированы данные для других изоформ Sur.

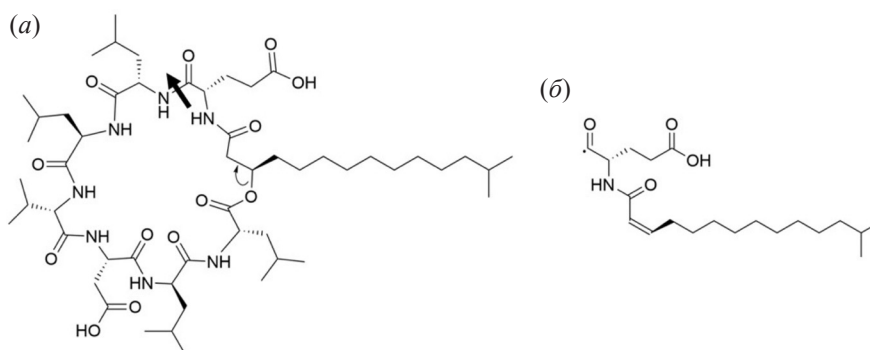


Рис. 7. Вероятная схема фрагментации молекулы C_{14} -Sur в методе MS-MS. Другие изоформы предположительно фрагментируются аналогично. (а) – Исходная молекула Sur, прямыми стрелками показаны связи, подвергающиеся фрагментации; (б) – частица, полученная при фрагментации молекулы Sur, обуславливающая разность между исходным и основным сигналами.

На хроматограмме, приведенной на рис. 5, справа от пика 2 присутствует небольшой пик 3, сигнал в масс-спектре которого аналогичен сигналу пика 2, хотя, как видно из хроматограммы, данные пики все же разрешаются. Фракции, соответствующие пикам 2 и 3, оказались идентичными по аминокислотному составу и длине остатка жирной кислоты, однако можно предположить, что жирный углеводородный хвост может быть разветвленным или аминокислоты могут быть в различной абсолютной конфигурации. Данные изоформы – основные, однако не исключено,

что в продуцируемом Sur будут присутствовать и минорные компоненты с аминокислотными заменами в пептидном кольце.

Количественное определение образцов Sur методом ВЭЖХ осложняется наличием малых количеств ряда изоформ Sur, а также присутствием липидных компонентов исходной пробы из-за малой селективности экстракции. Необходимо оптимизировать условия экстракции для более эффективного отделения целевого вещества от липидных компонентов клеточной культуры.

Характеристика изоформного состава образца Sur, продуцируемого клетками *B. subtilis* PY79^{sfp+} и NCIB 3610. Количество продуцируемого Sur, определенное колориметрическим методом, составляет ~300 мг/л культуральной среды, при этом данное значение вдвое больше, чем для штамма NCIB 3610 (рис. 2). Более того, это количество практически одинаково для всех клеточных линий, что согласуется с показанными ранее данными для штамма NCIB 3610. Несмотря на увеличение эффективности транскрипции оперона *srfA*, количество Sur не изменялось (рис. 3).

Для идентификации продуцируемых изоформ образцы экстрактов Sur, продуцируемого клетками штаммов NCIB 3610 и PY79^{sfp+} дикого типа, также были проанализированы методом ВЭЖХ.

На рис. 5 приведены хроматограммы коммерческого образца Sur, синтезируемого клетками WT PY79 (зеленая линия) и клетками WT NCIB 3610 (синяя линия). Время удерживания пиков 1–4 остается одинаковым. Таким образом, качественный состав продуцируемого Sur аналогичен коммерческому образцу, помимо этого, отсутствует раз-

личие в изоформном составе штаммов NCIB 3610 и PY79^{sfp+}.

На рис. 8 приведено типичное разделение аминокислот после кислотного гидролиза выделенного образца Sur PY79^{sfp+}, пик 1 на хроматограмме (рис. 5б) в сравнении со стандартным Sur “стандарт, пик 1” (рис. 5а). Аминокислотная последовательность пептидной части Sur, синтезируемого клетками PY79^{sfp+}: Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu. Этот пептид обнаружен в сурфактине всех клеточных линий. Для штамма NCIB 3610 получены аналогичные результаты по аминокислотному составу пептидной части молекулы. Масс-спектрометрический анализ показал, что длины остатков жирной кислоты пиков 1–4 соответствуют аналогичным значениям, полученным для образца коммерческого Sur.

Общая информация по соотношению пиков на хроматограмме и изоформ продуцируемого Sur представлена в табл. 1.

При совмещении хроматограмм хорошо видно, что качественный изоформный состав не изменяется для всех клеточных линий с делецией 6S РНК штамма PY79^{sfp+} (WT, ΔA, ΔB, ΔAB).

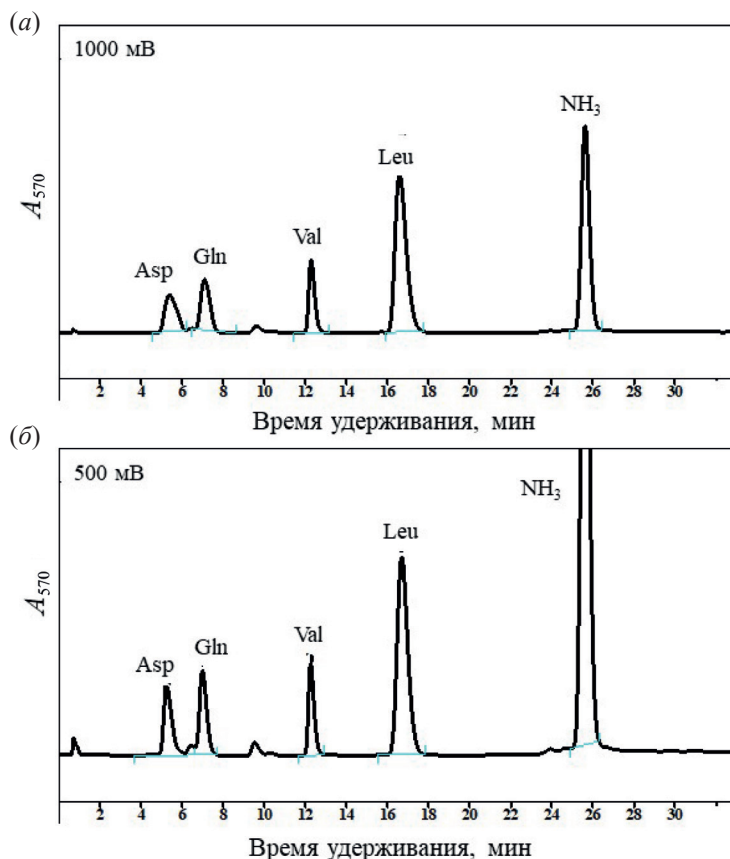


Рис. 8. Хроматографическое разделение аминокислот в образцах Sur после кислотного гидролиза: (а) – коммерческий препарат KANEKA; (б) – продуцируемый клетками PY79^{sfp+} дикого типа. Фотометрическая детекция при 570 нм.

Пики 1–4 присутствуют на всех хроматограммах (рис. 9), времена удерживания соответствуют изоформам Sur с аминокислотным составом и длиной углеводородного фрагмента жирной кислоты, приведенным в табл. 1.

Расчет долей изоформ Sur от общего количества продуцируемого вещества был выполнен методом внутренней нормализации пиков на хро-

матограмме. Так, для штамма PY79^{sp+} показано, что основная изоформа Sur – C₁₅-Sur, преимущественная для всех клеточных линий. Наименее представлена изоформа C₁₄-Sur. Данные расчета доли изоформ для всех клеточных линий приведены на рис. 10. Доля изоформ в сумме составляет < 100%, поскольку в данных, используемых для построения гистограммы, не учитываются минорные изоформы Sur.

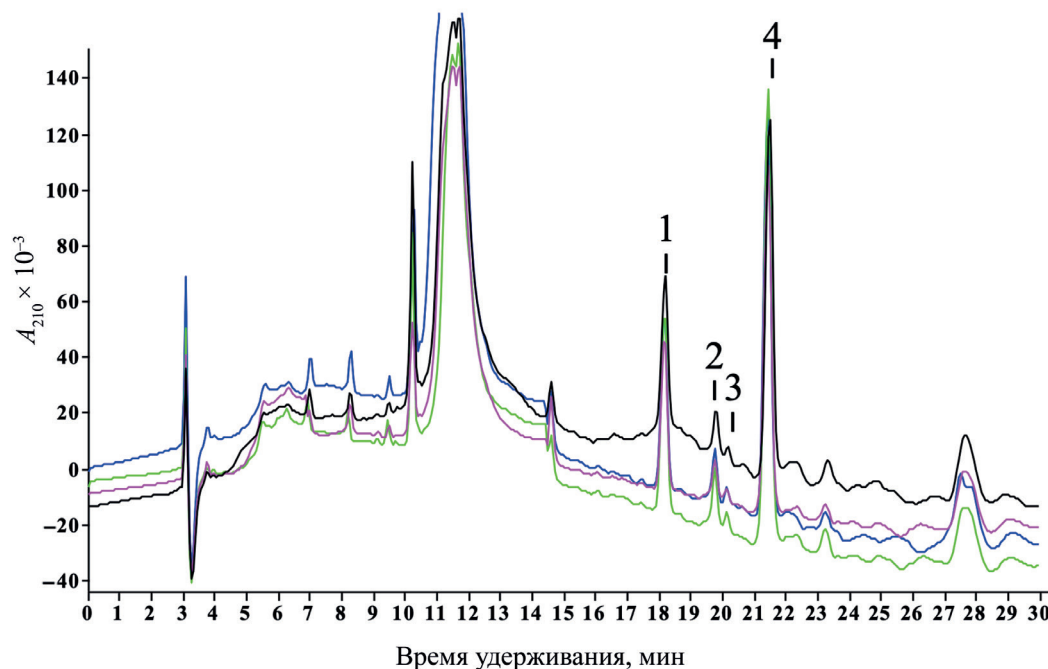


Рис. 9. Совмещение хроматограмм экстрактов Sur, синтезируемого клетками PY79^{sp+}: WT – черный цвет, ΔA – синий, ΔB – зеленый, ΔAB – фиолетовый.

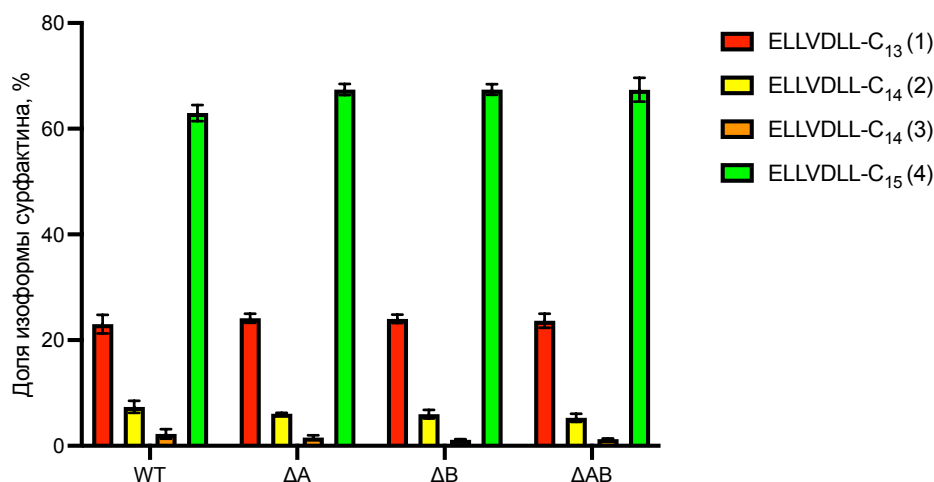


Рис. 10. Содержание изоформ в Sur, продуцируемом клетками PY79^{sp+} (WT, ΔA, ΔB, ΔAB): ELLVDLL-C₁₃ (пик 1), ELLVDLL-C₁₄ (пик 2), ELLVDLL-C₁₄ (пик 3), ELLVDLL-C₁₅ (пик 4). Данные получены методом ВЭЖХ (см. рис. 9), обработка проведена методом градуировочной зависимости по групповому компоненту.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. Праймеры для амплификации гена *sfp* были синтезированы в компании Синтол (Россия). Для молекулярного клонирования использовали следующие ферменты: эндонуклеазы рестрикции *Bam*HI и *Sma*I, ДНК-лигазу T4, ДНК-полимеразы Phusion™ High-Fidelity и Taq, а также ингибитор рибонуклеаз RiboLock (все производства Thermo Fisher Scientific, США). Обратную транскриптазу MMLV (Синтол, Россия) и дезоксирибонуклеазу I (Thermo Fisher Scientific, США) применяли в реакциях обратной транскрипции и деградации ДНК. Для восстановления сурфактин-синтезирующей активности использовали экспрессионный вектор pHT01, любезно предоставленный научной группой под руководством д.х.н., проф., чл.-корр. РАН Смирнова И.В. (ИБХ РАН, Москва, Россия). В качестве индуктора экспрессии применяли IPTG (Thermo Fisher Scientific, США). В качестве стандарта сурфактина для ВЭЖХ-анализа использовали коммерческий препарат Sur (KANEKA, Япония).

Клетки. В работе использовали штаммы *Bacillus subtilis* PY79 (лабораторный штамм) и NCIB 3610 (природный штамм), а также полученные на их основе изогенные мутантные штаммы с делецией гена 6S-1 РНК (ΔA), 6S-2 РНК (ΔB) и генов обеих 6S РНК (ΔAB). Культуры клеток всех штаммов были любезно предоставлены проф. Р. Хартманном (Университет Марбурга, Германия). Для штамма PY79 делеция гена 6S-2 РНК сопровождалась вставкой кассеты устойчивости к канамицину, а для штамма с делецией генов обеих 6S РНК – кассет устойчивости к канамицину и спектиномицину одновременно. В случае штамма NCIB 3610 мутантные клеточные линии были получены без введения селективных маркеров. Исходные и мутантные штаммы культивировали в стандартных условиях в среде LB. Для штамма PY79 с делецией гена 6S-2 РНК в питательную среду добавляли канамицин в конечной концентрации 10 мкг/мл, а для штамма с делецией генов обеих 6S РНК – канамицин и спектиномицин в конечных концентрациях 10 и 100 мкг/мл соответственно. Все штаммы хранили в виде криоконсервированных культур при –80°C в 15%-ном глицерине. Перед экспериментами культуры восстанавливали посевом на LB-агар с соответствующими антибиотиками.

Для клонирования и амплификации плазмидных ДНК использовали компетентные клетки *E. coli* XL1-Blue для химической трансформации.

Дизайн и получение экспрессионной конструкции для восстановления сурфактин-продуцирующей активности в штамме PY79. Для получения целевого гена проводили ПЦР-амплификацию с использованием геномной ДНК *B. subtilis* NCIB 3610, выделенной с использованием коммерческого набора Monarch Genomic DNA Purification Kit T3010 (New England Biolabs, США). Последовательности используемых праймеров (5'→3'): прямой – АСТТGGATCCTATGAAGATTTACGGAATTTATATGG, обратный – TGAATCCCGGGATTATAAAAGCTCTTCGTACGAG. Синтезированные праймеры содержали на 5'-концах дополнительные последовательности, соответствующие участкам узнавания эндонуклеаз рестрикции *Bam*HI и *Sma*I (подчеркнуты). После амплификации полученный ПЦР-продукт последовательно обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *Sma*I (10 ед. акт., 30°C, 16 ч) и эндонуклеазой рестрикции *Bam*HI (10 ед. акт., 37°C, 1 ч). Очистку полученных фрагментов проводили с использованием набора Cleanup Standard (Евроген, Россия). Подготовленные фрагменты ДНК в соотношении 5 : 1 смешивали с плазмидным вектором pHT01, предварительно линейризованным теми же эндонуклеазами рестрикции, и осаждали спиртом.

Реакцию лигирования проводили в течение 1 ч при 25°C в буферном растворе (50 мМ Трис-HCl, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ АТФ, 10 мМ дитиотреитол, pH 7.5), ДНК-лигазы (5 ед. акт.) и подготовленной смеси вектор/вставка. Полученную смесь (20 мкл) использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* XL1-Blue методом теплового шока. Выделение рекомбинантных плазмид из трансформантов осуществляли с использованием набора Plasmid Miniprep 2.0 (Евроген, Россия). Правильность сборки рекомбинантной плазмиды подтверждали методом секвенирования по Сэнгеру, выполненном в Центре коллективного пользования “Геном” (Москва, Россия).

Анализ биосинтеза сурфактина. Для определения содержания сурфактина, продуцируемого штаммами *B. subtilis* NCIB 3610 и PY79^{sfp+} дикого типа и с делецией только гена 6S-1, 6S-2 РНК или генов 6S-1 и 6S-2 РНК одновременно, применяли экстракцию липопептидов с последующим фотометрическим экспресс-анализом и разделением методом ВЭЖХ. Клеточные культуры выращивали в стандартных условиях (37°C, 200 об/мин) с использованием питательной среды LB, отбирая аликвоты объемом 10 мл на разных стадиях роста. После удаления клеточной биомассы

центрифугированием (2500 g, 10 мин, 4°C) надосадочную жидкость подкисляли 6 М HCl до pH 2.0 и инкубировали при 4°C в течение 1.5 ч для осаждения целевых соединений. Образовавшийся осадок экстрагировали дихлорметаном (2 × 0.8 мл) с последующим упариванием органической фазы при 37°C. Полученный остаток растворяли в 0.2 мл 90%-ного водного раствора ацетонитрила.

Количество сурфактина в полученных экстрактах определяли спектрофотометрическим методом с использованием pH-индикатора бромтимолового синего по методике, приведенной в работе [18]. Цветовой переход фиксировали при длине волны 620 нм. Концентрацию сурфактина в исследуемом образце определяли по градуировочному графику.

Хроматографическое разделение изоформ сурфактина методом ВЭЖХ. Использовали ВЭЖХ-систему, состоящую из двух насосов Waters 501 (США), формирующих состав элюента смешением в линии высокого давления с динамическим смесителем, и ручного инжектора Rheodyne 7725 (США), термостата колонки Phenomenex, УФ-спектрофотометрического детектора Gilson 151 (США). Для управления блоками прибора, сбора и обработки данных использовали персональный компьютер с программным обеспечением Мультихром 4.1 (Амперсенд, Россия). Вводили 20 мкл образца сурфактина, полученного после выделения методом экстракции дихлорметаном, упаривания растворителя, растворения осадка в 90%-ном водном растворе ацетонитрила и разбавления полученной жидкости в 10 раз 90%-ным водным раствором ацетонитрила. Разделение проводили на колонке Luna C18 (II) 5 мкм, 4.6 × 250 мм (Phenomenex, США) при 40°C, детектирование – при 210 нм, скорость потока составляла 1 мл/мин. Объем вводимой пробы 20 мкл. Элюент А – вода с 0.1% ТФУ, элюент В – ацетонитрил с 0.1% ТФУ. Программа градиента: 0–1 мин – 30% В, 1–8 мин – линейное увеличение с 30 до 80% В, 8–25 мин – увеличение с 80 до 100% В, 25–28 мин – 100% В (28–35 мин снижение содержания буфера В до 30%). Для количественных расчетов использовали абсолютную градуировку (метод внешнего стандарта). Поскольку имеющиеся коммерческие стандартные образцы для приготовления градуировочных растворов и реальные образцы могут отличаться по составу и соотношению изоформ сурфактина, количественные расчеты проводили с использованием группового компонента. Рассчитывали сумму площадей всех пиков изоформ

стандартного образца сурфактина в выбранном диапазоне времен удерживания, строили градуировочный график, по которому определяли содержание суммы изоформ сурфактина в анализируемом объекте.

Эксперименты проводили в трех биологических повторах для каждого штамма, при этом каждый биологический повтор анализировали не менее 3 раз методом ВЭЖХ. Для каждого среднего значения рассчитывали стандартное отклонение и доверительный интервал ($n = 3$, $p = 0.95$).

Масс-спектрометрический анализ сурфактина. Подготовку образцов для масс-спектрометрии проводили следующим образом: на матрице смешивали по ~0.5 мкл раствора образца, полученного при разделении изоформ Sur методом ВЭЖХ, и 0.5 мкл раствора 2.5-дигидроксibenзойной кислоты (40 мг/мл в 30%-ном водном ацетонитриле, 0.5% ТФУ), высушивали на воздухе. Масс-спектры были получены на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре UltrafleX-treme (Bruker Daltonics, Германия), оснащенном УФ-лазером (Nd), в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона; точность измеренных моноизотопных масс была в пределах 0.1 Да. Спектры регистрировали в диапазоне 600–6000 m/z , выбирая оптимальную мощность лазера для достижения наилучшего разрешения. Для получения спектров фрагментации использовали тандемный режим прибора Lift, точность измерения фрагментных ионов была не выше 1 Да. Масс-спектры обрабатывали с помощью программного пакета FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics, Германия) и размечали вручную с опорой на ожидаемую структуру.

Аминокислотный анализ пептидного фрагмента молекулы Sur. Образец изоформы сурфактина (4–7 мкг) упаривали досуха, переносили в стеклянную ампулу (молибденовое стекло) и добавляли 0.2 мл свежеприготовленной гидролизующей смеси (концентрированные соляная и трифторуксусная кислоты в соотношении 2 : 1 с добавлением 0.1% β-меркаптоэтанола), ампулу запаивали. Гидролиз проводили при 155°C в течение 1 ч. Затем ампулу (после охлаждения) вскрывали, содержимое количественно переносили в пластиковую пробирку и досуха удаляли гидролизующую смесь. Следы кислот удаляли, повторив дважды процедуру упаривания 0.1 мл воды, добавляемых к сухому остатку, на CentriVar Concentrator (Labconco, США). Далее для аминокислотного анализа к гидролизату (сухому остатку) добавляли 0.2 мл 0.1 н. соляной кислоты, интенсивно перемешивали в закрытой пластиковой про-

бирке, центрифугировали в течение 5 мин при 8000 об/мин на центрифуге Microfuge 22R (Beckman-Coulter, США). Полученный образец использовали для последующего анализа. Аминокислоты разделяли на ионообменной колонке (4.6×150 мм, с 7 мкм смолы на основе сополимера стирола и дивинилбензола (ST-DVB, Strong acid, DiVinyl-Benzene, Na^+), используя градиент натрий-цитратных буферов, при скорости потока 0.45 мл/мин на аминокислотном анализаторе АКА-1000 на базе хроматографа Скороход (Sevko&Co, Россия). Постколоночную дериватизацию проводили раствором нингидрина. Для обработки данных хроматографического разделения использовали программу Мультихром (Амперсэнд, Россия). Определяли количественное содержание всех аминокислот в образце за исключением триптофана, который разрушается в условиях гидролиза. Перед исследованием аминокислотного состава образцов анализировали стандартную смесь (AAS18-5ML Analytical Standard, FLUKA, Германия) с известным содержанием аминокислот (градуировка по “внешнему стандарту”).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования, представленные в работе, показали, что лабораторный штамм *B. subtilis* PY79 перспективен для генно-инженерных манипуляций, связанных с получением суперпродукта Sur. Восстановление нативной последовательности гена *sfp*, кодирующего 4'-фосфопантетеинилтрансферазу, необходимую для биосинтеза Sur, привело к двукратному увеличению количества этого биоПАВ по сравнению с природным штаммом NCIB 3610. Делеция гена 6S-1 РНК не оказывает влияния на выход целевого продукта, несмотря на наблюдаемый положительный эффект, связанный с увеличением количества мРНК сурфактинсинтетазы.

Охарактеризованы три изоформы сурфактина, продуцируемые штаммами PY79^{sfp+} и NCIB 3610. В обоих случаях преобладающим соединением выступает пептид Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu с остатком жирной кислоты, содержащей 15 атомов углерода. Это наиболее востребованная в промышленности и медицине изоформа Sur, обладающая целым рядом полезных свойств [3, 4].

Полученные в работе результаты могут использоваться для разработки штамма суперпродукта на основе описанного впервые в данном исследовании штамма PY79^{sfp+} путем варьирования условий культивирования клеток, генно-инженерных модификаций и других инструментов. В дальнейшем планируется работа над уве-

личением количества продуцируемого сурфактина с целью его использования в производстве косметики.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность д.х.н., проф., чл.-корр. РАН И.В. Смирнову за предоставленную плазмиду pHT01 для трансформации клеток штамма *B. subtilis* PY79, а также проф. Р. Хартманну (Университет Марбурга, Германия) за предоставленные культуры клеток штаммов PY79 и NCIB.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научного проекта № 24-24-00193.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы ЕЮЛ и ВСТ внесли равноценный вклад в написание статьи.

ЕЮЛ и ВСТ участвовали в разработке методологии исследования, проведении экспериментов, анализе данных и подготовке текста статьи; МБВ разрабатывал методику и осуществлял анализ образцов методом ВЭЖХ; МВС и АЛК проводили масс-спектрометрический и аминокислотный анализ изоформ Sur соответственно; ТСО участвовала в анализе данных и подготовке текста статьи; ЕАК разрабатывала методологию исследования, участвовала в написании статьи и доработке финального варианта текста.

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у автора для связи по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bueno-Mancebo J., Barrena R., Artola A., Gea T., Altmajer-Váz D. // Int. J. Cosmet. Sci. 2024. V. 46. P. 702–716.
<https://doi.org/10.1111/ics.12957>
2. Singh A., Van Hamme J.D., Ward O.P. // Biotechnol. Adv. 2007. V. 25. P. 99–121.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.10.004>

3. Liu Q., Lin J., Wang W., Huang H., Li S. // Biochem. Eng. J. 2015. V. 93. P. 31–37.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.08.023>
4. Bochynek M., Lewinska A., Witwicki M., Debczak A., Lukashevich M. // Front. Bioeng. Biotechnol. 2023. V. 11. P. 1211319.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1211319>
5. Hu F., Liu Y., Li S. // Microb. Cell Fact. 2019. V. 18. P. 42.
<https://doi.org/10.1186/s12934-019-1089-x>
6. Guo Z., Sun J., Ma Q., Li M., Dou Y., Yang S., Gao X. // Microorganisms. 2024. V. 12. P. 998.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms12050998>
7. Трефилов В.С., Лабанов В.А., Хренова М.Г., Панова Т.В., Родин В.А., Савицкая В.Ю., Кубарева Е.А., Зверева М.Э. // Биотехнология. 2023. Т. 39. С. 61–69.
<https://doi.org/10.56304/S0234275823050125>
8. Trefilov V., Lindin E., Elkina D., Zvereva M., Alferova V., Schluter M., Hartmann R., Kubareva E., Burenina O. // Biochimie. 2025. V. 238. P. 1181–1196.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2025.08.008>
9. Wassarman K.M., Storz G. // Cell. 2000. V. 101. P. 613–623.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80873-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80873-9)
10. Thüring M., Ganapathy S., Schluter M., Lechner M., Hartmann R. // RNA Biol. 2021. V. 18. P. 79–92.
<https://doi.org/10.1080/15476286.2020.1795408>
11. Stannius R.O., Fusco S., Cowled M., Kovacs A. // Biofilm. 2024. V. 9. P. 100249.
<https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2024.100249>
12. Cosmina P., Rodriguez F., De Ferra F., Grandi G., Perego M., Venema G., Van Sinderen D. // Mol. Microbiol. 1993. V. 8. P. 821–831.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01629.x>
13. Aleti G., Sessitsch A., Brader G. // Comput. Struct. Biotechnol. J. 2015. V. 13. P. 192–203.
<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2015.03.003>
14. De Moraes D., Pastore G. // Patent Application WO2012151647A1, 2012.
15. Willenbacher J., Mohr T., Henkel M., Gebhard S., Mascher T., Syltatk C., Hausmann R. // J. Biotechnol. 2016. V. 224. P. 14–17.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.03.002>
16. Zhen C., Ge X.-F., Lu Y.-T., Liu W.-Z. // AIMS Microbiol. 2023. V. 9. P. 195–217.
<https://doi.org/10.3934/microbiol.2023012>
17. Tran D.T.M., Phan T.T.P., Doan T.T.N., Tran T.L., Schumann W., Nguyen H.D. // Biotechnol. Rep. 2020. V. 28. P. e00540.
<https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00540>
18. Nakano M.M., Corbell N., Besson J., Zuber P. // Mol. Gen. Genet. 1992. V. 232. P. 313–321.
<https://doi.org/10.1007/BF00280011>
19. Mubarak M.Q.E., Hassan A.R., Hamid A.A., Khalil S., Isa M.H.M. // Sains Malaysiana. 2015. V. 44. P. 115–120.
<https://doi.org/10.17576/jsm-2015-4401-16>
20. Trefilov V., Lindin E., Monakhova M., Kisil O., Viryasov M., Oretskaya T., Kubareva E. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2025. V. 51. P. 465–490.
<https://doi.org/10.1134/S1068162024606517>
21. Yang H., Yu H., Shen Z. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2015. V. 42. P. 1139–1147.
<https://doi.org/10.1007/s10295-015-1635-4>

Structure and Isoforms of Surfactin Produced by Mutant Strain *Bacillus subtilis* PY79^{sfp+}

E. Yu. Lindin*, **, V. S. Trefilov*, **, M. B. Viryasov**, M. V. Serebryakova**,
A. L. Ksenofontov **, T. S. Oretskaya**,[#] and E. A. Kubareva**

[#] Phone: +7 (916) 206-41-02; e-mail: oretskaya@belozersky.msu.ru

* Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1, Moscow, 119991 Russia

** A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye Gory 1, Moscow, 119991 Russia

Surfactin (Sur) is a cyclic lipopeptide primarily produced by *Bacillus* spp. and is in high demand for various industrial and medical applications. The development of surfactin superproducer strains is crucial for increasing yield and reducing production costs. In this work, the construction of a surfactin-producing *Bacillus subtilis* PY79 strain for the first time by expressing the *sfp* gene using the pHT01 plasmid was performed. The new strain, PY79^{sfp+}, produces 300 mg/L of surfactin, which is twice the yield of the NCIB 3610 strain. In this paper we also demonstrated that deletion of the 6S-1 and 6S-2 RNA genes does not affect Sur yield. While the amino acid sequence of surfactin is consistent across all studied strains, the fatty acid chain length varies from C₁₃ to C₁₅, with the C₁₅ isoform being predominant. These results enable the development of a super-producing strain based on our novel PY79^{sfp+}. Future work will focus on optimizing cultivation and applying genetic engineering to scale up surfactin yield for commercial applications.

Keywords: surfactin, HPLC, isoforms analysis, *Bacillus subtilis*, 6S RNA