

DOI: 10.7868/S3034574X26050086

Оригинальная статья

УДК 547.963.4:633.34

ВЛИЯНИЕ РЕЖИМА АЭРАЦИИ НА СИНТЕЗ ЛЕГОГЛОБИНА И АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС КЛЕТОК *Escherichia coli*

О. В. Космачевская¹, Э. И. Насыбуллина¹, А. Ф. Топунов^{1,*}

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Российская Федерация

*E-mail: aftopunov@yandex.ru

Аннотация. Было изучено влияние аэрируемости питательной среды на клетки *Escherichia coli*, модифицированные плазмидой со встроенным геном легоглобина (леггемоглобина, Lb) сои. Рост клеток замедлялся при снижении аэрируемости. Клетки, выращенные при высокой аэрации, имели розовую окраску, обусловленную оксигенированным LbO₂, в то время как при низкой аэрации они имели оранжевый цвет. Lb в этих клетках имел гемихромные свойства, что свидетельствовало о его модификации. Степень обогащения среды кислородом влияла на общую пероксидазную и каталазную активности клеток *E. coli*. При низкой аэрации пероксидазная активность составляла 30%, а каталазная — 20% от активности при высокой аэрации. Плохо аэрируемые клетки были более устойчивы к действию редокс-медиатора бензилвиологена, что указывает на активацию в них анаэробных путей метаболизма.

Ключевые слова: легоглобин, *Escherichia coli*, аэрация, гемихром, пероксидазная активность, каталазная активность

Финансирование. Проведение работы не поддерживалось внешними источниками финансирования и грантами.

Соблюдение этических стандартов. Настоящая работа выполнена без привлечения людей или животных в качестве объектов исследований.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Ссылка для цитирования: Космачевская О.В., Насыбуллина Э.И., Топунов А.Ф. Влияние режима аэрации на синтез легоглобина и антиоксидантный статус клеток *Escherichia coli*. *Прикладная биохимия и микробиология* / *Applied biochemistry and microbiology*. 2026. Т. 62. № 5. С. 772–786.
<https://doi.org/10.7868/S3034574X26050086>

DOI: 10.7868/S3034574X26050086

Original Article

EFFECT OF AERATION CONDITIONS ON LEGHEMOGLOBIN SYNTHESIS AND ANTIOXIDANT STATUS OF *Escherichia coli* CELLS

O. V. Kosmachevskaya¹, E.I. Nasybullina¹, A. F. Topunov^{1,*}

¹ *Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

*E-mail: aftopunov@yandex.ru

Abstract. The aeration effect of culture medium on *Escherichia coli* cells modified with a plasmid containing the soybean leghemoglobin (Lb) gene was studied. Cell growth slowed down at decreased aeration. Cells grown under high aeration had pink colore due to oxygenated LbO₂, while under low aeration they had orange color. The Lb in these cells exhibited hemichemical properties, which indicated its modification. The degree of oxygen enrichment of the medium influenced the overall peroxidase and catalase activities of *E. coli* cells. At low aeration, the peroxidase activity was 30%, and the catalase one was 20% of the activity at high aeration. Poorly aerated cells were more resistant to the action of redox mediator benzyl viologen, which indicates the activation of anaerobic metabolic pathways in them.

Keywords: leghemoglobin, *Escherichia coli*, aeration, hemichrome, peroxidase activity, catalase activity

Funding. No additional grants to carry out or direct this particular research were obtained.

Ethics declarations. This work does not contain any studies involving human and animal subjects.

Conflict of interest. The authors of this work declare that they have no conflicts of interest.

For citation: Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Topunov A.F. Effect of Aeration Conditions on Leghemoglobin Synthesis and Antioxidant Status of *Escherichia coli* Cells. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya / Applied biochemistry and microbiology*. 2026;62(5):772–786. (In Russ.)
<https://doi.org/10.7868/S3034574X26050086>

ВВЕДЕНИЕ

Легоглобин (леггемоглобин, **Lb**) представляет собой мономерный белок с молекулярной массой ~16.5 кДа, содержащий гемовую группу — комплекс железа с протопорфирином IX. Структурно и функционально Lb подобен гемоглобину и миоглобину, что обусловлено происхождением этих белков от общего предка. Легоглобин выполняет функцию регулятора концентрации свободного кислорода в растительных клетках, инфицированных клубеньковыми бактериями — ризобиями. Связывая кислород с высоким сродством ($K_d \sim 37\text{--}50\text{ нМ}$), Lb создает микроаэробную среду, необходимую для функционирования кислородчувствительного фермента нитрогеназы, и одновременно обеспечивает дыхание видоизмененных бактерий *Rhizobium* — бактериоидов [2, 36].

В последние годы рекомбинантный Lb сои используется в пищевой промышленности в качестве функционального ингредиента для имитации «мясного вкуса» в продуктах из растительного сырья [7, 31], так называемого «растительного мяса». Однако эффективное производство биологически активного Lb в бактериальных экспрессионных системах остается сложной технологической задачей из-за трудностей корректной инкорпорации гема в белок и поддержания стабильности его нативной оксигенированной формы.

Клетки *Escherichia coli* по-прежнему широко используются для получения рекомбинантных белков. К важным характеристикам *E. coli* как продуцента относятся возможность достижения высокой плотности культуры, простота культивирования, а также хорошо изученные физиология и генетический аппарат микроорганизма. Именно в клетках *E. coli* была осуществлена первая экспрессия рекомбинантного легоглобина, это был Lb I желтого люпина [33].

E. coli является факультативно анаэробной бактерией, способной адаптироваться к различным кислородным условиям. Это позволяет ей выживать не только в естественной среде обитания (кишечник), но и в биореакторах, где из-за неэффективного перемешивания могут возникать градиенты растворенного кислорода [32]. Распределение кислорода особенно неоднородно в крупномасштабных биореакторах, где отдельные клетки часто подвергаются метаболическим изменениям, что может приводить к снижению выхода целевого продукта [37].

Режим аэрации служит критическим фактором при культивировании *E. coli* для получения рекомбинантных гемопротеидов. Их синтез требует баланса между ростом биомассы и доступностью гема. С одной стороны, синтез гема энергозатратен, и аэробный метаболизм обеспечивает необходимую энергию. Интенсивная аэрация способствует быстрому росту биомассы и высокой

скорости синтеза рекомбинантного белка. Однако при чрезмерно высокой скорости синтеза белок не успевает правильно свернуться и связать гем, что приводит к образованию неактивных агрегатов — телец включения (inclusion bodies). Кроме того, избыточная аэрация повышает внутриклеточную концентрацию активных форм кислорода (**АФК**), которые могут повреждать структуру рекомбинантного белка. С другой стороны, при недостаточной аэрации клетка не синтезирует необходимое количество гема, что ведет к образованию нефункционального апопротеида. В микроаэробных условиях метаболизм замедляется, что способствует правильному фолдингу белка и увеличивает выход растворимой, функционально активной фракции гемопротеида, поэтому для максимизации выхода часто применяют комбинированный режим, при котором периоды интенсивной аэрации чередуются с периодами микроаэробноза.

Несмотря на имеющиеся данные о влиянии кислородных условий на экспрессию рекомбинантных белков в *E. coli*, остается недостаточно изученным комплексное влияние доступности кислорода на количественный выход и структурную целостность Lb, антиоксидантный статус клетки-продуцента и взаимосвязь между редокс-метаболизмом и устойчивостью к экзогенным редокс-медиаторам.

Целью настоящей работы было исследование влияния режима аэрации жидкой питательной среды на эффективность синтеза функционального рекомбинантного соевого легоглобина Lba в экспрессионной системе *E. coli*.

МЕТОДИКА

Среда LB (Lysogeny Broth), лизоцим, фенилметилсульфонилфторид (**PMSF**), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ получены у “AppliChem” (Германия); гидропероксид *трет*-бутила, дитионит натрия, феррицианид калия, *о*-дианизидин, бензилвиологен, пиридин, Ultrogel AcA54 — “Sigma-Aldrich” (США); FeSO_4 — “Fluka” (Швейцария); ампициллин, трис — “ICN” (США). Остальные реактивы российского производства, квалификации «хч» или «осч».

Выращивание и обработка клеток *E. coli* бензилвиологеном. В работе были использованы клетки *E. coli* штамма TB-1, модифицированного плазмидой pEMBL18⁺::SyLba со встроенным геном Lba сои, полученного сотрудниками Автономного университета штата Морелос (Мексика) и Университета штата Небраска (США), любезно предоставленные Р. Арредондо-Петер’ом (R. Arredondo-Peter) из Автономного университета штата Морелос. В качестве контроля использовали аналогичный штамм без плазмиды. Клеточную суспензию, хранившуюся при температуре $-70\text{ }^\circ\text{C}$ в растворе глицерина, высевали в жидкую среду LB, содержащую ампициллин (50 мкг/мл при культивировании модифицированного штамма) и выращивали в

течение 15 ч при 37 °С на термошейкере фирмы «Биоком» (Россия) с частотой перемешивания 200 об./мин. Полученную культуру клеток использовали для засева серии колб объемом 350 мл до A_{600} 0.02, 0.03, содержащих разные объемы жидкой LB среды: 36, 60, 240 мл, что соответствовало ~ следующим коэффициентам заполнения (**Кз**) колбы — доля жидкой среды в колбе (**fill level**, **FI**): 0.1, 0.2, 0.7.

Бензилвиологен в различных концентрациях вносили в питательную среду на ранней стадии логарифмической фазы роста, через 3 ч после засева (при A_{600} = 0.12, 0.15). Количество клеток в культуре измеряли через каждые 2 ч.

Получение клеточного экстракта. Культуру клеток *E. coli* после окончания культивирования отмывали от компонентов питательной среды трехкратным центрифугированием по 5 мин при 10000 g в 100 мМ К-фосфатном буфере (**КРВ**) pH 7.2 и нормировали до оптической плотности A_{600} = 0.24. К отмытой суспензии клеток добавляли лизоцим (20 мкг/мл), ингибитор протеаз PMSF (20 мкМ) и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. Затем клетки разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе «Soniprep 150» («MSE», Великобритания) при максимальной мощности 23 кГц (4 цикла по 20 с), охлаждая между циклами. Суспензию разрушенных клеток центрифугировали при 15000 g в течение 20 мин для получения клеточного экстракта.

Выделение и очистка Lb из клеток *E. coli*. Белки клеточного экстракта высаливали сульфатом аммония в диапазоне насыщения 50–90%. Очистку Lb осуществляли гель-фильтрацией на колонке с Ultrogel AcA-54 (1*60 см). Lb-содержащую фракцию концентрировали в ячейке для ультрафильтрации и диализовали против 50 мМ КРВ (pH 7.2) в течение ночи. Все процедуры проводили при температуре 4 °С.

Определение количества гемовых групп. Концентрацию гема в клеточном экстракте определяли с помощью пиридинохромового метода в модификации авторов [18]. К 15 мкл экстракта добавляли 135 мкл воды и 450 мкл 30%ного щелочного раствора пиридина. Непосредственно перед измерением раствор восстанавливали дитионитом натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). Оптическое поглощение восстановленного комплекса гема с пиридином измеряли при 556 и 539 нм. Расчет концентрации гема осуществляли по разнице ($A_{556} - A_{539}$), используя коэффициент $E_{556-539} = 4.3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [18].

Определение пероксидазной и каталазной активностей. Общую пероксидазную активность клеточного экстракта определяли спектрофотометрически по интенсивности окраски *o*-дианизидина, окисленного перекисью водорода при действии пероксидазы, при длине волны 454 нм ($\epsilon_{454} = 30 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) по методу, описанному в работе [20] с модификациями. При определении общей пероксидазной активности клеточных экстрактов

использовали обессоленный раствор белка в 0.1 М Tris-HCl буфере (pH 6.8). К 0.1 мл раствора белка добавляли 0.6 мл *o*-дианизидинового реактива и 0.55 мл воды, инкубировали в течение 5 мин при 30 °С, затем добавляли 50 мкл свежеприготовленного 0.075%-ного раствора H_2O_2 , инкубировали еще 3 мин и останавливали реакцию добавлением 0.2 мл 50%-ного H_2SO_4 . Осадок белка отделяли центрифугированием при 10000 g в течение 20 мин. Супернатант использовали для спектрофотометрического определения окрашенного продукта окисления *o*-дианизидина.

Каталазную активность измеряли, используя в качестве субстрата перекись водорода, уменьшение оптической плотности которой по мере ее разложения регистрировали при 240 нм ($\epsilon_{240} = 43.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [1].

Определение общего белка. Количество общего белка определяли по методу [4]. Белоксодержащий клеточный экстракт перед измерением разбавляли в 100 раз водой. К 0.1 мл разбавленного раствора добавляли 0.5 мл реактива Брэдфорда (делается на основе красителя Кумасси бриллиантовый синий G-250) и хорошо перемешивали. Через 5 мин измеряли поглощение при 595 нм относительно чистого реагента (0.1 мл воды + 0.5 мл реагента). Концентрацию белка рассчитывали, исходя из формулы: $C = A_{595} \cdot 100 / 0.0042$ (мкг/мл). Данное соотношение корректно до $A_{595} = 0.4$. Реагент Брэдфорда готовили следующим образом: 20 мг Кумасси бриллиантового синего G-250 растворяли в 10 мл 95%-ного этанола, затем добавляли 20 мл 85%-ной ортофосфорной кислоты и доводили вод до объема 200 мл.

Коэффициенты для расчета концентрации белка определяли, используя раствор бычьего сыровороточного альбумина.

Оптическая и флуоресцентная спектрофотометрия. Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре «Beckman Coulter DU 650» (США). Спектры поглощения растворов белков и целых клеток записывали при комнатной температуре со скоростью 600 нм/мин с интервалом 1 нм.

Регистрацию флуоресценции образцов проводили на спектрофлуориметре «Shimadzu RF-5301 PC» (Япония) при высокой чувствительности и средней скорости сканирования (по маркировке прибора). Ширина щели возбуждающего и поглощающего света составляла 5 нм. Рассчитывали разницу спектров образцов Lb и фона (КРВ). Концентрация Lb в кювете составляла 5 мкМ.

Количество клеток в единице объема жидкой культуры определяли при 600 нм (A_{600}) в 0.1 см кварцевой кювете. Остальные измерения проводили в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см.

Все эксперименты были выполнены не менее, чем в трех повторностях. На графиках представлены как средние значения $\pm$ стандартное отклонение. Статистическую обработку данных проводили исходя из трех аналитических повторностей в программе Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние режимов аэрации на рост *E. coli* и синтез легоглобина. Режим аэрации создавали, изменяя объем жидкой питательной среды в колбах, используя следующие коэффициенты **Кз**: 0.1, 0.2, 0.7, — отношение объема питательной среды к общему объему колбы. На рис. 1а представлены кривые роста *E. coli* при трех различных **Кз**. Кривая 1 (**Кз** = 0.1) соответствовала высокой степени аэра-

ции и наиболее интенсивному росту с экспоненциальной фазой до 4 ч и достижением максимальной оптической плотности культуры к 22 ч $A_{600} \sim 0.75$. Кривая 2 (**Кз** = 0.2) отражала рост при умеренной аэрации. Скорость роста была немного ниже, чем при **Кз**, равной 0.1, с экспоненциальной фазой до 4 ч. Максимальная оптическая плотность достигала $A_{600} \sim 0.7$. Кривая 3 (**Кз** = 0.7) характеризовала рост при низкой аэрации. Наблюдалось значительное замедление роста с удлинением экспоненциальной фазы до 7 ч. Максимальная оптическая плотность культуры не превышала 0.2. Рекомбинантный штамм, синтезирующий **Lba**, демонстрировал схожие паттерны роста при всех режимах аэрации (рис. 1 б), что указывало на отсутствие влияния присутствия рекомбинантного белка на ростовые характеристики *E. coli*.

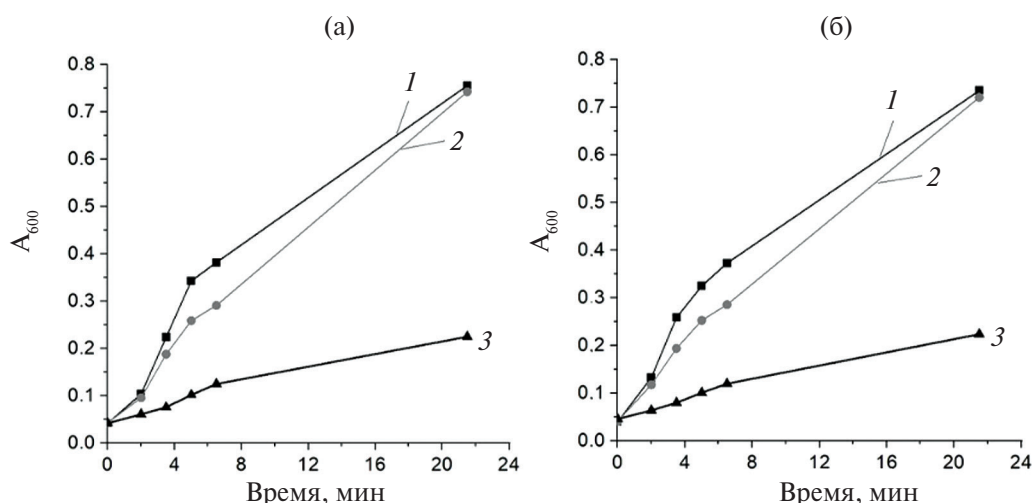


Рис. 1. Кривые роста клеток *E. coli*: (а) — контрольный штамм, (б) — рекомбинантный штамм при различных условиях аэрации: **Кз** = 0.1 (1), **Кз** = 0.2 (2), **Кз** = 0.7 (3)

Fig. 1. Growth curves of *E. coli* cells: control strain (а), recombinant strain (б) at different aeration conditions: Fill level (**Fl**) = 0.1 (1), **Fl** = 0.2 (2), **Fl** = 0.7 (3)

Таким образом, с увеличением **Кз** (снижение уровня аэрации) происходило замедление скорости роста культуры *E. coli*, что подтверждало важную роль кислородного обеспечения в метаболизме бактерий.

Использованный в работе штамм *E. coli* TB-1, трансформированный плазмидой pEMBL18+::SyLba, обладал высоким уровнем экспрессии **Lb** сои (**Lba**). Высокое содержание **Lba** придавало клеткам розовый цвет [14]. Рекомбинантный **Lba** по характеристикам был идентичен легоглобину сои дикого типа.

В отличие от многих экспрессионных систем на основе клеток *E. coli*, система, используемая в настоящей работе, позволяла получать белок в рас-

творимом, физиологически активном состоянии. Из-за высокой концентрации **Lb** внутри бактерий была возможна спектрофотометрическая регистрация его состояния в неразрушенных клетках. На рис. 2а представлены фотографии пробирок с осадком суспензии клеток *E. coli*, отмытых от питательной среды. Отчетливо видны характерные цветовые различия клеток в зависимости от наличия **Lb** и его окислительно-восстановительного состояния. Первая пробирка содержала клетки контрольного штамма (без **Lb**). Осадок имел светло-бежевый оттенок, что соответствовало естественному цвету бактериальной биомассы *E. coli* без рекомбинантного белка. Вторая пробирка содержала клетки, экспрессирующие **Lb**

и содержащие его в оксигенированной форме (LbO_2). Осадок имел интенсивно розовый цвет, что свидетельствовало о высокой концентрации LbO_2 [14]. Этот цвет является характерным признаком корректного встраивания гема в белок и его связывания с кислородом, что наблюдалось при достаточной аэрации культуральной среды. Третья пробирка содержала клетки с модифицированным

Lb (**Lb-Z**). Осадок имел оранжево-коричневый цвет, указывающий на преобладание окисленного Lb или продуктов деградации гема. Этот цветовой оттенок был характерен для клеток, выращенных в условиях низкой аэрации, когда могло происходить автоокисление LbO_2 и/или модификация гемового кармана под действием продуктов анаэробного метаболизма, например, метилгликосяля.

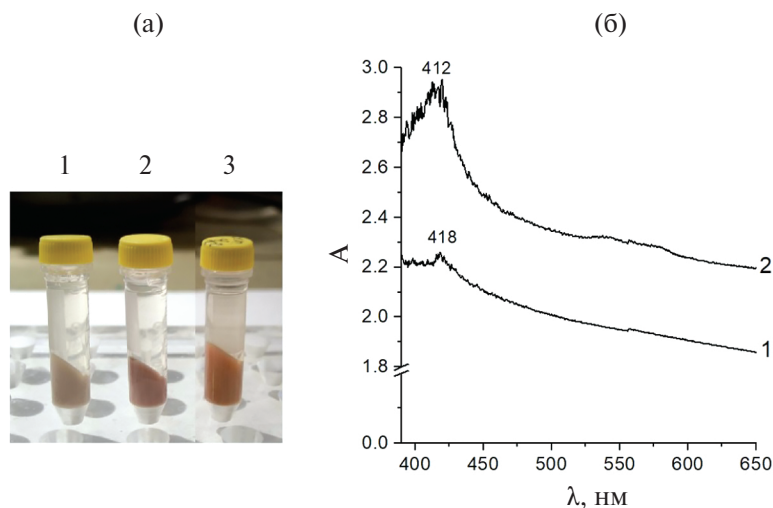


Рис. 2. Фотография осадка суспензии клеток *E. coli* (а) и спектры поглощения суспензии клеток (б). Контрольные клетки без Lb (1); клетки с LbO_2 (2); с Lb-Z (3)

Fig 2. A photograph of the sediment of *E. coli* cells suspension (а) and the absorption spectra of cells suspension (б). Control cells without Lb (1), cells with LbO_2 (2), with Lb-Z (3)

На рис. 2б представлены спектры поглощения суспензии клеток *E. coli* в видимом диапазоне. Спектр контрольных клеток (линия 1) демонстрировал выраженный пик поглощения при 418 нм (полоса Соре), характерный для эндогенных гемсодержащих белков *E. coli* (например, цитохромов). Отсутствие дополнительных пиков в видимой области указывал на низкую концентрацию гемопротеидов в контрольных клетках. Спектр клеток, экспрессирующих Lb (линия 2), характеризовался интенсивным пиком при 412 нм (полоса Соре) и пиками на 540-578 нм, соответствующими α - и β -полосам oxyLb . Такие показатели спектра соответствовали физиологически активной оксигенированной форме LbO_2 , что подтвердили визуальные наблюдения (рис. 2а).

Для образования рекомбинантного гемопротеида необходимо достаточное количество кофактора – протопорфирина IX (гема). Поскольку синтез гема в *E. coli* зависит от условий аэрации, было измерено количество гема в клеточном экстракте (рис. 3). Содержание гема в рекомбинантном штамме было в несколько раз выше, чем в контрольном. Больше всего гема синтезировали клетки при $K_z = 0.2$ (умеренная аэрация), особенно отчетливо это наблюдалось в случае рекомбинантного штамма. При $K_z = 0.7$ содержание гема уменьшалось

почти в два раза. Эти результаты показывают, что оптимальными для синтеза гема являются условия умеренной аэрации.

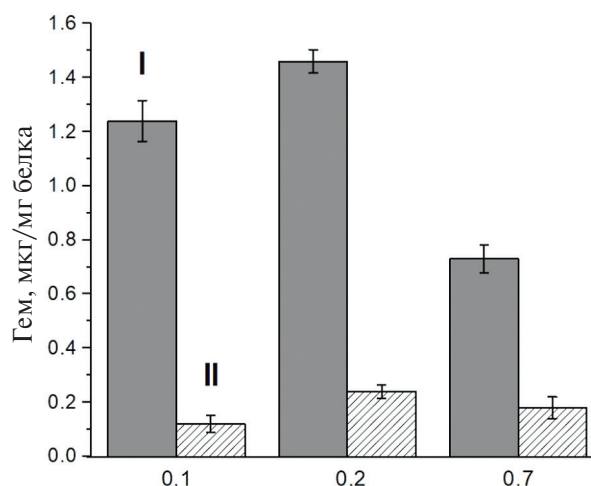


Рис. 3. Содержание гема в клеточных экстрактах из клеток *E. coli*, выращенных при разных условиях аэрации ($K_z = 0.1, 0.2, 0.7$); рекомбинантный штамм (I), контрольный штамм (II)

Fig. 3. Heme content in cell extract from *E. coli* cells grown at different aeration conditions ($K_z = 0.1, 0.2, 0.7$); recombinant strain (I), control strain (II)

Для изучения характеристик рекомбинантного Lb была проведена его очистка. На рис. 4 представлены результаты гель-фильтрации белков клеточного экстракта, выделенных после высаливания сульфатом аммония в диапазоне насыщения 50–90 %. Концентрацию белков в элюате оценивали по оптической плотности при 280 нм. Кривая 1 соответствует профилю элюции белков из клеток, содержащих LbO₂, на кривой видны три пика в порядке убывания молекулярного веса. Lb выходил третьим пиком (~20–27 мл), положение которого на профиле элюции соответствовало молекулярной массе ~16–18 кДа. Высокая интенсивность этого пика указывала на значительное накопление функционального Lb при высокой аэрации. Кривая 2 отражает профиль элюции белков из клеток, содержащих Lb-Z, выращенных при низкой аэрации. Можно отметить наличие одного доминирующего пика (~18–28 мл), совпадающего по положению с

третьим пиком кривой 1. Снижение разрешающей способности колонки для Lb-Z объясняется изменением конформации белка, что, вероятно, влияет на его взаимодействие с матрицей ультрогеля.

Различия в гель-фильтрационных профилях показывают, что при высокой аэрации белок сохранял мономерную форму, тогда как при микроаэробных условиях наблюдалась его агрегация и модификация.

Результаты, представленные на рис. 5, показывают, что основная доля гема в клеточном экстракте приходится на Lb-содержащую фракцию и лишь небольшое количество – на первую фракцию (рис. 5, кривая 2). Также на первую и вторую белковые фракции приходится активность каталазы (рис. 5, кривая 3). Это свидетельствует о том, что в состав первой фракции входят гемовые каталазы и пероксидазы, а каталазная активность второй фракции, вероятно, обусловлена легоглобином [15, 26].

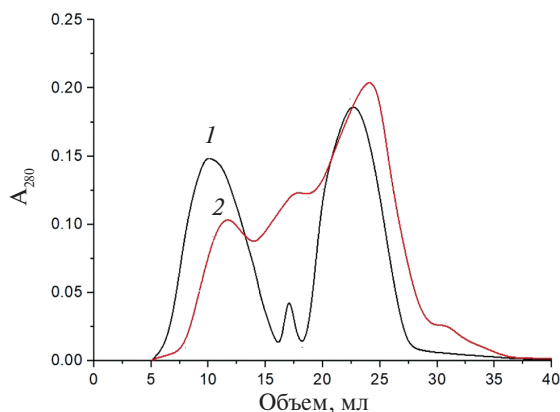


Рис. 4. Профили элюции белков клеточных экстрактов *E. coli* с колонки Ultrogel AcA-54 после высаливания сульфатом аммония в пределах насыщения 50–90%. Клетки с LbO₂ (1), клетки с Lb-Z (2)

Fig. 4. Proteins elution profiles of *E. coli* cell extracts from Ultrogel AcA-54 column after salting out with ammonium sulfate within saturation range 50–90%. Cells with LbO₂ (1), cells with Lb-Z (2)

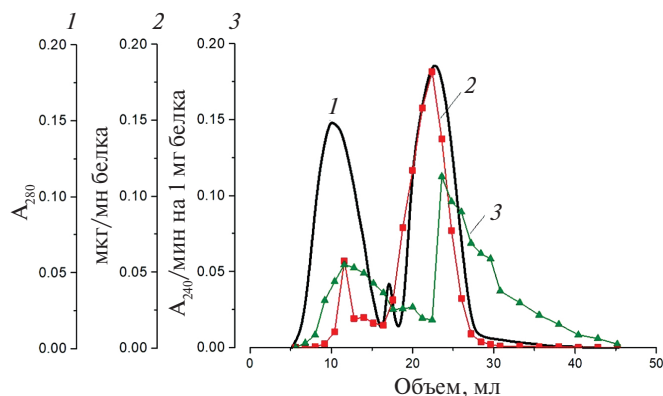


Рис. 5. Характеристики белков клеточных экстрактов *E. coli* (содержащих LbO₂) с колонки Ultrogel AcA-54 после высаливания сульфатом аммония в диапазоне насыщения 50–90%: белок, поглощение при 280 нм (1); гем, мкг/мг белка (2); каталазная активность, A₂₄₀/мин на 1 мг белка (3)

Fig. 5. Characteristics of proteins from *E. coli* cell extracts (with LbO₂) from Ultrogel AcA-54 column after salting with ammonium sulfate within saturation range 50–90%: protein, absorption at 280 nm (1); heme, µg/mg of protein (2); catalase activity, A₂₄₀/min per 1 mg protein (3)

На рис. 6 представлены спектры поглощения Lb-Z. Белок был восстановлен дитионитом натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) для перевода железа гема в восстановленную форму. На спектре 2 виден максимум поглощения при 416 нм, характерный для гемсодержащих белков в низкоспиновом восстановленном состоянии, в то время, как у Lb в высокоспиновом восстановленном состоянии полоса Соре расположена при ~430 нм. На низкоспиновую структуру Lb-Z указывает и наличие на спектре

α - и β -полос при 523 нм (плечо 512 нм) и 552 нм. Смещение максимумов в сторону коротких длин волн свидетельствует о структурных изменениях в гемовом кармане, таких, как изменение координации железа, например, в результате образования бис-гистиდიлового комплекса, или связывание гетероциклического лиганда. Бис-гистидиловая координация (гемихром) часто сопровождается частичной денатурацией глобина и изменением электростатического окружения гема.

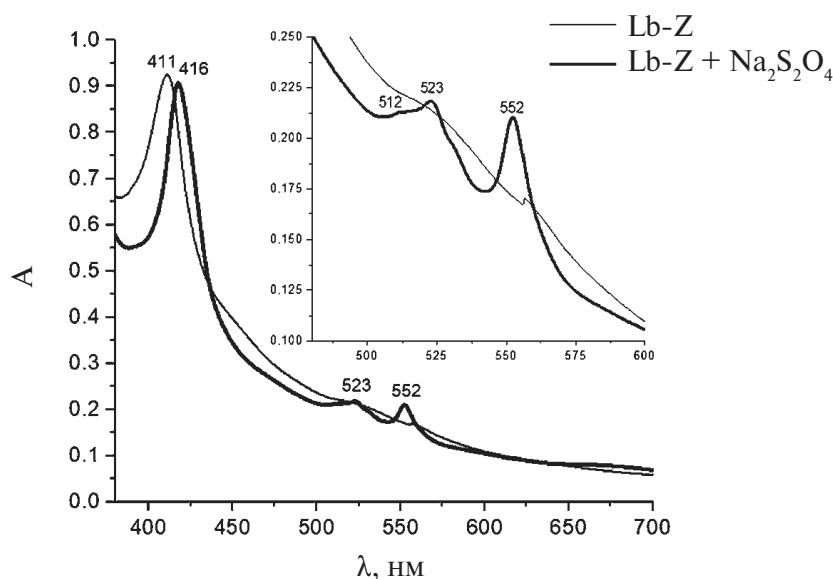


Рис. 6. Спектры поглощения модифицированного Lb-Z после гель-фильтрации на колонке Ultrogel AcA-54: окисленный Lb-Z (1), восстановленный Lb-Z (2). На врезке приведен фрагмент спектра для детализации α - и β -полос
Fig. 6. The absorption spectra of modified Lb-Z after gel filtration on Ultrogel AcA-54 column: oxidized Lb-Z (1), reduced Lb-Z (2). The inset shows a fragment of the spectrum for detailed visualization of α - and β -bands

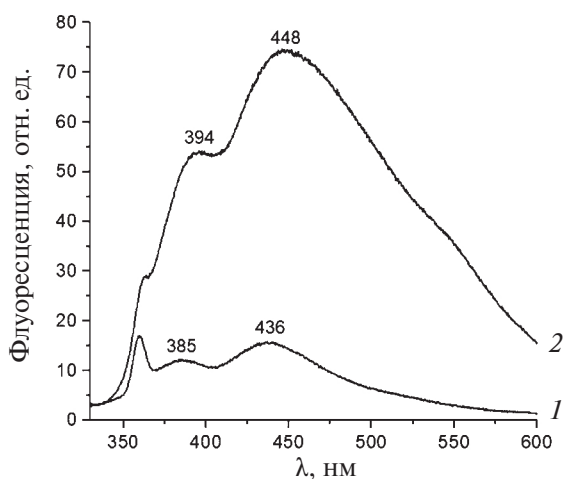


Рис. 7. Спектры флуоресценции Lb, записанные при длине волны возбуждения 320 нм: LbO₂ (1), Lb-Z (2)
Fig. 7. The fluorescence spectra of Lb recorded at excitation wavelength 320 nm: LbO₂ (1), Lb-Z (2)

На рис. 7 приведены спектры флуоресценции LbO₂ и Lb-Z, зарегистрированные при длине волны возбуждения 320 нм. Спектр LbO₂ имеет максимумы испускания флуоресценции при 351 нм, 385 и 436 нм, в то время как Lb-Z имеет более интенсивную флуоресценцию в диапазоне 350–600 нм с максимумом при 448 нм и плечом при 394 нм. За флуоресценцию LbO₂ при возбуждении светом в УФ-диапазоне отвечают в основном триптофановые остатки белка. Флуоресценция Lb-Z может быть вызвана как неправильным фолдингом белка и присутствием холо-формы, так и образованием конъюгата белка с продуктами окислительной деградации гема или продуктами реакции Майяра.

Влияние режима аэрации на общую пероксидазную и каталазную активность. *E. coli* обладает мощной ферментативной системой защиты от окислительного стресса, которая прежде всего включает антиоксидантные ферменты — каталазы (HPI и HPII) и пероксидазу (AhpCF) [5, 9]. Эти системы могут влиять на стабильность рекомбинантных гемо-

протеидов, снижая концентрацию органических гидропероксидов и H_2O_2 и предотвращая окисление гема. Таким образом, антиоксидантный статус клетки определяет качество синтезируемого белка. Кроме этого, Lb сам проявляет пероксидазную активность, которую часто называют псевдопероксидазной [14, 15, 26]. Была исследована общая пероксидазная и каталазная активность клеточных экстрактов *E. coli*.

При высокой аэрации штамм с рекомбинантным Lb демонстрировал более высокую пероксидазную активность, чем контрольный. При низкой аэрации большую активность (1.4 против 0.8) обнаруживал контрольный штамм, что указывало на повышенную устойчивость его антиоксидантных систем.

Пероксидазная активность рекомбинантного штамма при высокой и умеренной аэрации была

в три раза выше, чем при низкой (рис. 8а). Каталазная активность уменьшалась при снижении аэрируемости среды. При $K_3 = 0.7$ она составляла 17% от активности клеток при $K_3 = 0.1$ (рис. 8б). Это можно объяснить тем, что снижение аэрации приводило к уменьшению количества АФК и снижению потребности в защитном действии пероксидаз и каталаз. Пероксидазная активность контрольного штамма была ниже, чем у рекомбинантного, что может быть связано с вкладом Lb в элиминацию гидропероксидов (рис. 8а). Однако контрольный штамм демонстрировал более стабильный антиоксидантный ответ при изменении условий аэрации. Каталазная активность при высокой аэрации практически не отличалась от активности рекомбинантного штамма (рис. 8б). При умеренной и низкой аэрации она была выше.

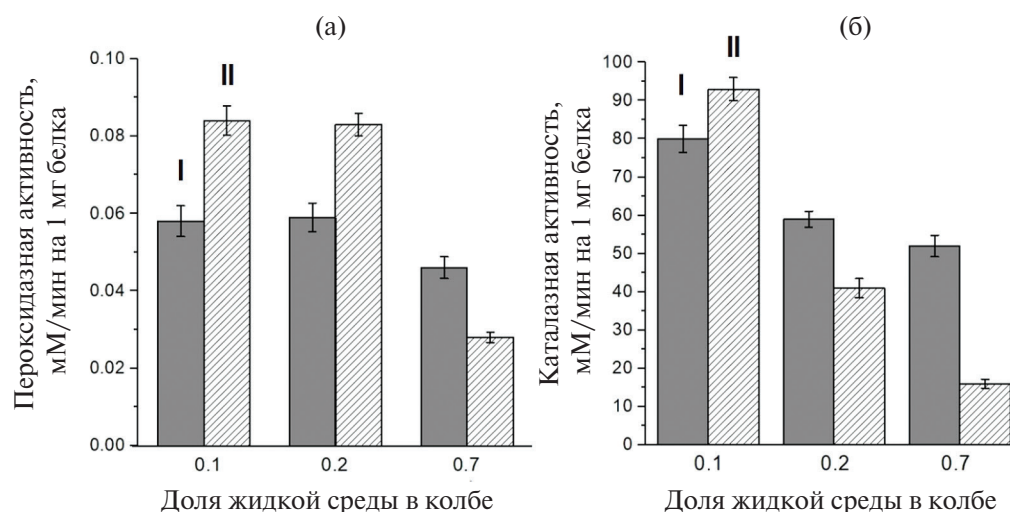


Рис. 8. Общая пероксидазная (а) и каталазная (б) активности экстракта клеток *E. coli*, выращенных при разных условиях аэрации. Контрольный штамм *E. coli*, без Lb (I), *E. coli* с рекомбинантным Lb (II); *E. coli* с LbO₂ (I), *E. coli* с Lb-Z (II)

Fig. 8. Total peroxidase (a) and catalase (b) activities of the extract of *E. coli* cell grown at different aeration conditions. Control *E. coli* strain, without Lb (I), *E. coli* with recombinant Lb (II); *E. coli* with LbO₂ (I), *E. coli* with Lb-Z (II)

Снижение аэрации приводило к снижению как общей пероксидазной, так и общей каталазной активности, что отражало ослабление действия окислительного стресса при микроаэробных условиях. Следует отметить, что при низкой аэрации контрольный штамм демонстрировал более высокий уровень антиоксидантной активности. Потерю антиоксидантной активности рекомбинантного штамма можно объяснить недостатком метаболических ресурсов для одновременного синтеза Lb, каталазы и пероксидаз, которые также являются гемовыми белками, конкурирующими за кофактор — железопорфирин IX.

Влияние бензилвиологена на рост *E. coli* и синтез легоглобина. Для моделирования окислительного стресса в *E. coli* был использован искусственный редокс-медиатор бензилвиологен (Bv), который добавляли в питательную среду в начале логарифмической фазы роста клеток. Bv забирает электроны от гидрогеназы и формиадегидрогеназы, активирующихся при дефиците кислорода. В присутствии кислорода восстановленный Bv генерирует супероксид-анион радикал ($O_2^{\cdot-}$) [27], вызывая окислительный стресс.

На рис. 9а представлены кривые роста рекомбинантного штамма *E. coli* (LbO₂) с добавлением Bv. Клетки были предварительно выращены при высокой аэрации. Кривая роста без Bv (рис. 9а, кривая 1) характеризовалась активным ростом, максимальная плотность культуры достигала ~0.75 при A₆₀₀ к 24 ч. Bv, добавленный в разных концентрациях, замедлял рост с момента его внесения в питательную среду, плотность культуры достигала ~0.2 A₆₀₀ к 24 ч.

Кривые на рис. 9б отражают рост рекомбинантного штамма *E. coli* (Lb-Z), предварительно выращенного при низкой аэрации, с добавлением аналогичных концентраций Bv. Кривая роста без Bv (рис. 9б, кривая 1) показывает типичную динамику (максимум ~0.75 A₆₀₀ к 24 ч) аналогично *E. coli* с LbO₂. Bv в разных дозах начинал ингибировать рост клеток только через 5 ч после внесения в пи-

тательную среду. При 125 мМ Bv клетки сохраняли способность к росту (рис. 9б, кривая 2). При других концентрациях редокс-медиатора происходил лизис клеток.

На рис. 10 представлена зависимость содержания Lb от концентрации Bv в клетках *E. coli*, предварительно выращенных при высокой и низкой аэрации. Bv в обоих типах культур дозозависимо снижал содержание Lb. При 125 мМ Bv количество Lb в клетках *E. coli* (LbO₂) уменьшалось на 67%, в то время как в *E. coli* (Lb-Z) только на 36%. Разница в динамике снижения Lb между разными вариантами подтверждает, что *E. coli* (LbO₂) теряет рекомбинантный Lb из-за окислительного стресса, вызванного Bv в присутствии кислорода. Это согласуется с данными о резком ингибировании роста клеток *E. coli* (LbO₂) при добавлении Bv (рис. 9а).

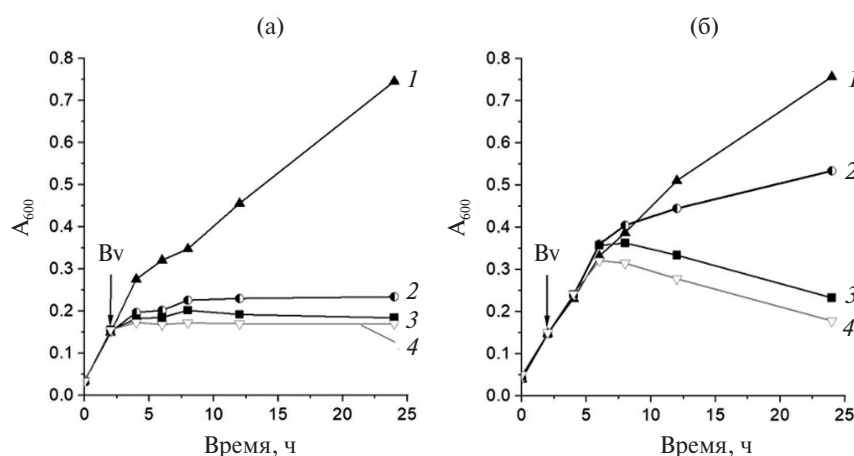


Рис. 9. Кривые роста клеток *E. coli* с LbO₂ (а), с Lb-Z (б) при добавлении разных концентраций бензилвиологена (Bv): 0 мМ (1); 125 мМ (2); 250 мМ (3); 375 мМ (4). Стрелкой отмечено время добавления Bv

Fig. 9. Growth curves of *E. coli* cells with LbO₂ (a) and with Lb-Z (b) after addition of benzyl viologen (Bv) at different concentrations: 0 mM (1); 125 mM (2); 250 mM (3); 375 mM (4). The arrow shows the time of Bv addition

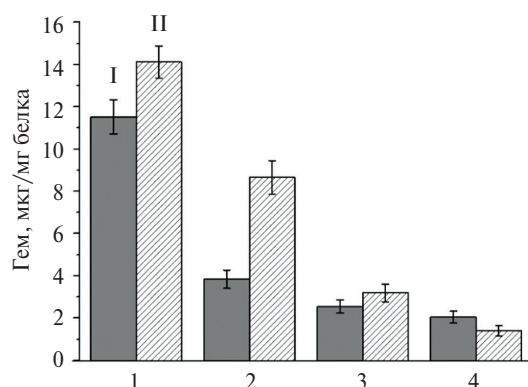


Рис. 10. Количество Lb в клетках *E. coli*, выращенных при разных концентрациях Bv: 0 мМ (1), 125 мМ (2), 250 мМ (3), 375 мМ (4). *E. coli* с LbO₂ (I), *E. coli* с Lb-Z (II)

Fig. 10. Lb amount in *E. coli* cells grown at different Bv concentrations: 0 mM (1), 125 mM (2), 250 mM (3), 375 mM (4). *E. coli* with LbO₂ (I), with Lb-Z (II)

На следующем этапе была сопоставлена способность клеток, адаптированных к разным уровням аэрации, к восстановлению Bv, как показателя функционального состояния анаэробных ферментных систем (рис. 11). При восстановлении Bv образуется катион-радикал сине-фиолетового цвета, поглощающий при 550 нм. Отмытые от компонентов питательной среды клетки помещали в кювету для регистрации кинетики накопления катион-радикала Bv. Клетки *E. coli* (Lb-Z) восстанавливали Bv при его концентрации 125 мМ, в то время как *E. coli* (LbO₂) такой способностью не обладали. При более высоких концентрациях Bv его восстановление также наблюдалось хотя и в существенно меньшей степени, что можно объяснить токсическим действием редокс-медиатора на клетки.

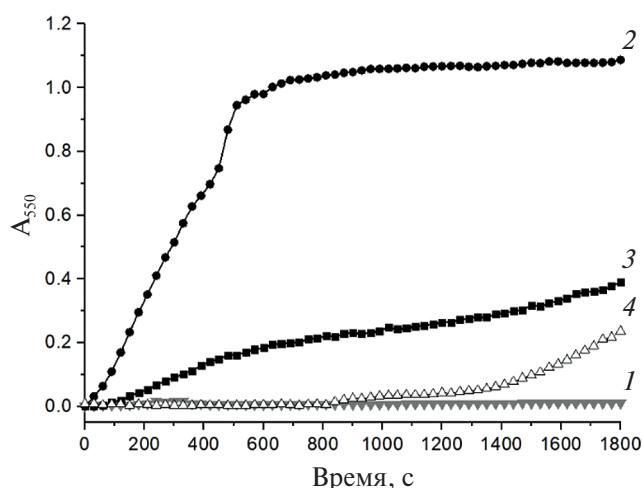


Рис. 11. Восстановление Bv клетками *E. coli*, выращенными при разных концентрациях Bv: 0 мМ (1), 125 мМ (2), 250 мМ (3), 375 мМ (4). Показано изменение оптического поглощения при 550 нм

Fig. 11. The reduction of Bv by *E. coli* cells grown at different Bv concentrations: 0 mM (1), 125 mM (2), 250 mM (3), 375 mM (4). The changes in optical absorption at 550 nm are shown

Синтетические редокс-медиаторы — виологены: метилвиологен и бензилвиологен, применяют для исследования редокс-метаболизма бактерий. *E. coli*, адаптированная к микроаэробным условиям, синтезировала ферменты, восстанавливающие виологены, при этом аэробно выращенные клетки имели низкую восстанавливающую активность [13].

Виологены способны непосредственно перехватывать электроны от железосерных кластеров [Fe-S] форматдегидрогеназы (FDH-H) и форматгидрогеназы (FDL) [27], которые являются частью комплекса формат-водород-лиазной

системы (FHL). При восстановлении виологены меняют цвет: в окисленном состоянии (дикатион) они бесцветны, а в восстановленном (катион-радикал) приобретают сине-фиолетовую окраску, что делает их удобными маркерами для индикации активности FHL [27], восстанавливающего CO₂ и участвующего в поддержании окислительно-восстановительного баланса. Экспрессия ферментов FHL начинается только при падении концентрации кислорода. Адаптированная к гипоксии клетка готова к быстрому сбросу электронов, чтобы предотвратить токсичное накопление формата. Отметим, что Bv токсичен для *E. coli* и подавляет их рост [27]. Токсичность Bv связана с генерацией O₂^{•-} в ходе реакций, катализируемых системой FHL

ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез рекомбинантного Lb в бактериях зависит от многих факторов: правильного сворачивания апопротеида, доступности железа, биосинтеза гема, его встраивания в белок, и окислительно-восстановительного статуса клетки. Штамм *E. coli* TB-1, трансформированный плазмидой pEMBL18+::SyLba, синтезировал Lb в активной оксигенированной форме при достаточной аэрации питательной среды, что согласуется с данными предыдущих исследований [14]. При низкой аэрации Lb в клетках находился в состоянии бис-гистицилового гемихрома. Назовем наиболее вероятные причины потери Lb нативной конформации и трансформации в гемихром.

Окисление железа гема. При нормальной аэрации клетка поддерживает восстановительную среду, стабилизирующую связь Fe-O₂. Часть комплекса Fe-O₂ постоянно подвергается автоокислению [30]. При недостатке систем восстановления накапливается окисленная мет-форма Lb, которая нестабильна и может трансформироваться в гемихром.

Закисление среды. При переходе от аэробного дыхания к микроаэробным условиям *E. coli* переключает метаболизм на менее эффективное смешанное кислотное брожение. Накопление органических кислот понижает pH как в цитоплазме, так и в питательной среде [6]. Снижение pH способствует протонированию дистального гистидина, облегчая его координацию с железом гема. Кроме того, понижение pH усиливает автоокисление LbO₂ и последующее образование H₂O₂ [29, 30].

Нарушение биосинтеза гема. Синтез гема в *E. coli* представляет собой сложный девятиступенчатый метаболический путь превращения глутамил-tP-НК в протопорфирин IX [39]. *E. coli* синтезирует 5-аминолевулинат из глутамата, который является первым ключевым предшественником пути C5. Данная стадия является лимитирующей при синтезе гема.

В *E. coli* есть два метаболических пути синтеза порфиринового кольца: аэробный и анаэробный. В первом случае кислород выступает прямым акцептором электронов для протопорфириноген IX-оксидазы (HemG) на стадии образования протопорфирина IX из предшественника. Затем феррохелатаза встраивает железо в протопорфирин IX. В анаэробном пути копропорфириноген III-дегидрогеназа (CgdH) катализирует декарбоксилирование двух пропионатных боковых цепей копропорфириногена III до соответствующих винильных групп протопорфириногена IX. Кофактор-зависимая дегидрогеназа (HemN) катализирует окисление копропорфириногена III в протопорфириноген IX, используя в качестве акцептора электронов S-аденозилметионин (SAM) и железосерные кластеры [4Fe-4S] ферментов класса «Radical SAM» [19].

Использование анаэробного пути синтеза гема в биотехнологии сопряжено с рядом проблем. Во-первых, этот путь энергетически менее выгоден и протекает значительно медленнее аэробного. Гемового кофактора может не хватать для насыщения сверхэкспрессированного рекомбинантного белка [8], что приводит к включению дефектного гема или нестабильной сборке холо-белка. Нестабильный белок склонен к разворачиванию и образованию гемихрома для стабилизации гема внутри кармана, поэтому получение функциональных гемопротейдов обычно представляет собой сложную задачу, в основном из-за недостаточного поступления внутриклеточного гема.

Было описано создание высокоэффективной платформы для производства различных гемопротейдов на основе *E. coli* [8]. Методами генной инженерии получен высокопродуктивный штамм Ec-M13, синтезирующий гем с незначительным накоплением промежуточных продуктов. Экспрессия гемопротейдов в этом штамме увеличилась на 42–107% по сравнению со штаммом дикого типа. А в работе [38] было показано, что экспрессия в *E. coli* растворимого цитохрома b_5 крысы приводила к увеличению содержания гема. Из этого можно сделать вывод, что *E. coli* реагирует на появление чужеродного «гемового резервуара» усилением синтеза гема [38]. Подобная ситуация возможна и в случае экспрессии Lb.

Образующийся в наших опытах модифицированный гемихромный Lb-Z имеет характеристики флуоресценции, отличные от LbO₂. Если LbO₂ не обладает выраженной флуоресценцией при облучении ближним УФ-светом ($\lambda_{\text{возб.}}$ = 320 нм), то для Lb-Z регистрируется пик при 390 нм и выраженная полоса при 445 нм. Такое различие указывает на наличие в Lb-Z дополнительных флуорофоров.

Анаэробная среда индуцирует накопление активных карбонильных соединений (глиоксаля, метилглиоксаля и др.) [3, 22, 40]. Метилглиоксаль

способен модифицировать аминокислотные остатки Lb, индуцируя переход в гемихром, и тем самым нарушая способность связывать кислород [16, 17, 26]. В работах [11, 12] показано, что продукты реакции Майяра, связываясь с внешним участком тетрамерного гемоглобина вблизи фрагмента β -37 Trp, индуцируют переход в гемихром. Аналогичный эффект показан и для миоглобина [11]. Кроме этого, продукты реакции Майяра легко образуют внутри- и межмолекулярные ковалентные сшивки или продукты гликоокисления [11, 12].

За флуоресценцию в зеленой области спектра (465–525 нм) отвечают тетрапирролы и продукты их деградации [35]. При окислительной деструкции гем теряет атом железа, а его кольцо разрывается с образованием преимущественно дипирролов. В ходе автоокисления оксигемоглобина, а также реакции оксигемоглобинов и феррилгемоглобинов с H₂O₂ образуются флуоресцирующие соединения 1 и 2 [23, 24]. Соединение 1 (синяя флуоресценция, $\lambda_{\text{возб.}}$ = 320 нм, $\lambda_{\text{исп.}}$ = 465 нм) представляет собой наиболее ранний и массовый продукт разрушения порфиринового кольца под действием пероксида водорода. Соединение 2 (зеленая флуоресценция, $\lambda_{\text{возб.}}$ = 460 нм, $\lambda_{\text{исп.}}$ = 525 нм) является продуктом более глубокого или специфического окисления, часто связанного с модификацией боковых цепей порфирина или его взаимодействием с аминокислотами. Считается, что это биливердин-подобные соединения или конъюгаты продуктов распада гема с белками или глутатионом. Зеленую флуоресценцию также иногда связывают с образованием хелеглобина (промежуточного продукта распада гемоглобина).

E. coli способна расти как в аэробных, так и в анаэробных условиях, получая энергию за счет разных дыхательных и ферментативных процессов. Переключение метаболических режимов регулируется механизмами, обеспечивающими выбор наиболее энергетически выгодного пути в данной среде [34]. Адаптация *E. coli* к анаэробной среде происходит за счет увеличения экспрессии генов ферментов брожения [28], что затрагивает более 20% генома. Переход к микроаэробным условиям влияет не только на транскрипты, кодирующие белки основного метаболизма, но и белки, участвующие в гомеостазе редокс-активных металлов (Fe и Cu) и в ответе на стресс клеточной оболочки [28]. Ответ на снижение доступности кислорода включает различные транскрипционные регуляторы. Это прямой датчик кислорода FNR (регулятор восстановления фумарата и нитрата – Fumarate Nitrate Reduction) и непрямой датчик кислорода ArcA/ArcB (Aerobic Respiration Control) – двухкомпонентную регуляторную систему. При анаэробии восстановленные хиноны активируют ArcB, который запускает фосфорилирование ArcA, подавляющий гены аэробного метаболизма и активирующий гены брожения. Эти датчики различаются

по скорости реакции на кислород. В ответе на снижение доступности O_2 также участвуют быстро и медленно реагирующие датчики стресса клеточной оболочки RpoE и CpxR.

Хотя использование кислорода позволяет клеткам генерировать больше энергии, кислород может оказывать и токсическое действие, восстанавливаясь с образованием АФК [10]. Окислительный стресс активирует антиоксидантные системы *E. coli*: каталазы (HPI и HPII), пероксидазы (AhpCF), супероксиддисмутазы (SodA, SodB) и глутатион-зависимые ферменты [5, 9]. Они не только защищают клетку от повреждения, но могут влиять на стабильность рекомбинантных гемопротеидов. Пероксидазы и каталазы, снижая концентрацию органических гидропероксидов и H_2O_2 , предотвращают окисление гема, что влияет на качество синтезируемого гемопротеида. Регулятор антиоксидантных генов OxyR, помимо регуляции синтеза каталаз и пероксидаз, управляет экспрессией двух ферментов пути биосинтеза гема: феррохелатазы (HemH) и копропорфириноген III-оксидазы (HemF) [21]. Индукция гена hemH при окислительном стрессе повышается в 11 раз. Нарушение синтеза HemH и HemF приводит к накоплению тетрапиррольных промежуточных продуктов. Синтез гема необходим и для функционирования гемопротеидов в электронтранспортной цепи, работы гемсодержащих ферментов и защиты клетки от окислительного стресса.

Как было отмечено выше, Lb, как и другие гемоглобины, проявляет пероксидазную (псевдопероксидазную) активность [14, 15, 26]. Скорость пероксидазной реакции у Lb из клубеньков бобов (*Vicia faba* L.), была в 6 раз выше, чем у миоглобинов, и в 10–13 раз выше, чем у эритроцитарных гемоглобинов [26]. Благодаря высокому содержанию, Lb может осуществлять дополнительную антиоксидантную защиту инфицированных клеток клубенька. Однако при экспрессии в *E. coli* этот

эффект практически не наблюдается. Напротив, Lba сои повышал чувствительность клеток *E. coli* к окислительному стрессу [14].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Интенсивная аэрация стимулирует рост клеток, синтезирующих рекомбинантный Lb, и их антиоксидантную защиту, но повышает риск образования телец включения и окислительного повреждения белка. Низкая аэрация вызывает энергетический дефицит и закисление среды, подавляя синтез Lb. Дефицит кислорода также приводит к накоплению апопротеида и активных карбонильных соединений, участвующих в реакции Майяра, при которой нативный Lb переходит в нефункциональный гемихром. Оптимальной является умеренная аэрация ($K_3 = 0.2$), дающая большую биомассу, стабильный гемопротеид и активные антиоксидантные системы.

Полученные результаты расширяют понимание метаболических сложностей при синтезе рекомбинантного Lb в *E. coli* и могут быть использованы для оптимизации биотехнологических процессов получения функциональных белков, в том числе и других гемоглобинов. При их синтезе могут проходить два противоположных по направленности процесса, как это было показано для Lb [14]. Они могут проявлять пероксидазную активность, которой обладают все гемоглобинподобные белки, и, тем самым, ослаблять действие окислительного стресса. В то же время при синтезе и функционировании гемоглобины могут образовывать супероксидную феррильную/перферрильную форму, которая является очень сильным окислителем. Дальнейшее изучение особенностей баланса между этими процессами и возможностей его смещения в благоприятную для клетки сторону является интересной для исследования и практически важной задачей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.*, 1984. vol. 105, P. 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
2. Appleby C.A. Leghemoglobin and Rhizobium respiration. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 1984. vol. 35, P. 443–478. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.35.060184.002303>
3. Boteva E., Mironova R. Maillard reaction and aging: can bacteria shed light on the link? *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, 2019. vol. 33, no. 1, P. 481–497. <https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1590160>
4. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976. vol. 72, no. 1–2, P. 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
5. Choudhary D., Foster K.R., Uphoff S. The master regulator OxyR orchestrates bacterial oxidative stress response genes in space and time. *Cell Syst.*, 2024. vol. 20, no. 11, P. 1033–1045. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2024.10.003>
6. Förster A.H., Gescher J. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of mixed-acid fermentation end products. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2014. vol. 2, no. 16. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2014.00016>

7. Fraser R.Z., Shitut M., Agrawal P., Mendes O., Klapholz S. Safety evaluation of soy leghemoglobin protein preparation derived from *Pichia pastoris*, intended for use as a flavor catalyst in plant-based meat. *Int. J. Toxicol.*, 2018. vol. 37, no. 3, P. 241-262. <https://doi.org/10.1177/1091581818766318>
8. Ge J., Wang X., Bai Y., Wang Y., Wang Y., Tu T., Qin X., Su X., Luo H., Yao B., Huang H., Zhang J. Engineering *Escherichia coli* for efficient assembly of heme proteins. *Microb. Cell Fact.*, 2023. vol. 22, no. 1, P. 59. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02067-5>
9. Gu M., Imlay J.A. The SoxRS response of *Escherichia coli* is directly activated by redox-cycling drugs rather than by superoxide. *Mol. Microbiol.*, 2011. vol. 79, no. 5, P. 1136-1150. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07520.x>
10. Imlay J.A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2013. vol. 11, no. 7, P. 443-454. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3032>
11. Ioannou A., Varotsis C. Modifications of hemoglobin and myoglobin by Maillard reaction products (MRPs). *PLoS One*, 2017. vol. 12, no. 11, P. e0188095. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188095>
12. Ioannou A., Varotsis C. Probing hemoglobin glyco-products by fluorescence spectroscopy. *RSC Adv.*, 2019. vol. 9, no. 64, P. 37614-37619. <https://doi.org/10.1039/c9ra05243g>
13. Jones R.W., Garland P.B. Sites and specificity of the reaction of bipyridylum compounds with anaerobic respiratory enzymes of *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, 1977. vol. 164, no. 1, P. 199-211. <https://doi.org/10.1042/bj1640199>
14. Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Shumaev K.B., Topunov A.F. Expressed soybean leghemoglobin: effect on *Escherichia coli* at oxidative and nitrosative stress. *Molecules*, 2021. vol. 26, no. 23, P. 7207. <https://doi.org/10.3390/molecules26237207>
15. Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Topunov A.F. Peroxidase activity of leghemoglobin of bean (*Vicia faba* L.) nodules in relation to *tert*-butyl hydroperoxide. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2022. vol. 58, no. 1, P. 44-52. <https://doi.org/10.1134/S0003683822010045>
16. Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F. Existence of glycated leghemoglobin – hemoglobin of legume plants. *IMARS Highlights*, 2009. vol. 4, no. 5, P. 10-13.
17. Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F. Formation of glycated recombinant leghemoglobin in *Escherichia coli* cells. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2010. vol. 46, no. 3, P. 297-302. <https://doi.org/10.1134/S0003683810030089>
18. Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F. Method of determination of the content of hemoglobin-like proteins in heterogenic mixtures. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2007. vol. 43, no. 3, P. 313-319. <https://doi.org/10.1134/S0003683807030123>
19. Layer G., Jahn M., Moser Ju., Jahn D. Radical SAM enzymes involved in tetrapyrrole biosynthesis and insertion. *ACS Bio Med. Chem.*, 2022. vol. 2, P. 196-204.
20. Lebedeva O.V., Ugarova N. N., Berezin I.V. Kinetic study of oxidation of o-dianisidine by hydrogen peroxide in presence of horseradish peroxidase. *Biochemistry (Moscow)*, 1977. vol. 42, no. 8, pp. 1070-1076.
21. Mancini S., Imlay J.A. The induction of two biosynthetic enzymes helps *Escherichia coli* sustain heme synthesis and activate catalase during hydrogen peroxide stress. *Mol. Microbiol.*, 2015. vol. 96, no. 4, P. 744-763. <https://doi.org/10.1111/mmi.12967>
22. Mironova R., Niwa T., Hayashi H., Dimitrova R., Ivanov I. Evidence for non-enzymatic glycosylation of *Escherichia coli* chromosomal DNA. *Mol. Microbiol.*, 2005. vol. 55, P. 1801-1811. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04493.x>
23. Nagababu E., Rifkind J.M. Formation of fluorescent heme degradation products during the oxidation of hemoglobin by hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998. vol. 247, P. 592-596. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8846>
24. Nagababu E., Rifkind J.M. Heme degradation during autoxidation of oxyhemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000. vol. 273, P. 839-845. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3025>
25. Nagababu E., Rifkind J.M. Reaction of hydrogen peroxide with ferrylhemoglobin: superoxide production and heme degradation. *Biochemistry*, 2000. vol. 39, P. 12503-12511. <https://doi.org/10.1021/bi992170y>
26. Nasybullina E.I., Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F. Glycation of leghemoglobin by methylglyoxal in comparison with other hemoglobins and the influence on peroxidase activity. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2025. vol. 61, no. 5, P. 824-833. <https://doi.org/10.1134/S0003683825601416>
27. Panwar A., Martins B.M., Sommer F., Schroda M., Dobbek H., Iobbi-Nivol C., Jourlin-Castelli C., Leimkühler S. Purification and electron transfer from soluble c-type cytochrome TorC to TorA for trimethylamine N-oxide reduction. *Int. J. Mol. Sci.*, 2024. vol. 25, no. 24, P. 13331. <https://doi.org/10.3390/ijms252413331>
28. Partridge J.D., Sanguinetti G., Dibden D.P., Roberts R.E., Poole R.K., Green J. Transition of *Escherichia coli* from aerobic to micro-aerobic conditions involves fast and slow reacting regulatory components. *J. Biol. Chem.*, 2007. vol. 282, no. 15, P. 11230-11237. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700728200>
29. Pladys D., Barthe P., Rigaud J. Changes in intracellular pH in French-bean nodules induced by senescence and nitrate treatment. *Plant Sci.*, 1988. vol. 56, no. 2, P. 99-106. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(88\)90021-0](https://doi.org/10.1016/0168-9452(88)90021-0)

30. Puppo A., Rigaud J., Job D. Role of superoxide anion in leghemoglobin autoxidation. *Plant Sci. Lett.*, 1981. vol. 22, no. 4, P. 353-360. [https://doi.org/10.1016/0304-4211\(81\)90081-X](https://doi.org/10.1016/0304-4211(81)90081-X)
31. Reyes T.F., Agrawal P., Chan T., Green R., Matulka R.A. The safety of soy leghemoglobin protein preparation derived from *Pichia pastoris* expressing a soy leghemoglobin gene from *Glycine max*: *in vitro* and *in vivo* studies. *J. Toxicol.*, 2023. vol. 2023, P. 7398724. <https://doi.org/10.1155/2023/7398724>
32. Sandoval-Basurto E.A., Gosset G., Bolívar F., Ramírez O.T. Culture of *Escherichia coli* under dissolved oxygen gradients simulated in a two-compartment scale-down system: metabolic response and production of recombinant protein. *Biotechnol. Bioeng.*, 2005. vol. 90, no. 4, P. 453-463. <https://doi.org/10.1002/bit.20383>
33. Sikorski M.M., Topunov A.F., Strozycki P., Vorgias C.E., Wilson K.S., Legocki A.B. Cloning and expression of plant leghemoglobin cDNA of *Lupinus luteus* in *Escherichia coli* and purification of the recombinant protein. *Plant Sci.*, 1995. vol. 108, no. 1, P. 109-117. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(95\)04125-E](https://doi.org/10.1016/0168-9452(95)04125-E)
34. Spiro S., Guest J.R. Adaptive responses to oxygen limitation in *Escherichia coli*. *Trends Biochem. Sci.*, 1991. vol. 16, no. 8, P. 310-314. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(91\)90125-f](https://doi.org/10.1016/0968-0004(91)90125-f)
35. Taniguchi M., Lindsey J.S. Absorption and fluorescence spectra of open-chain tetrapyrrole pigments—bilirubins, biliverdins, phycobilins, and synthetic analogues. *J. Photochem. Photobiol. C*, 2023. vol. 55, P. 100585.
36. Topunov A.F. Leghemoglobin and its role in regulation of oxygen concentration in nitrogen-fixing legume nodules. *Biochemistry (Moscow)*, 1995. vol. 60, no. 1, P. 45-49.
37. von Wulffen J., Nice-Team R., Sawodny O., Feuer R. Transition of an anaerobic *Escherichia coli* culture to aerobiosis: balancing mRNA and protein levels in a demand-directed dynamic flux balance analysis. *PLoS One*, 2016. vol. 11, no. 7, P. e0158711. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158711>
38. Woodard S.I., Dailey H.A. Regulation of heme biosynthesis in *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1995. vol. 316, no. 1, P. 110-115. <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1016>
39. Zhang J., Kang Z., Chen J., Du G. Optimization of the heme biosynthesis pathway for the production of 5-aminolevulinic acid in *Escherichia coli*. *Sci. Rep.*, 2015. vol. 5, P. 8584. <https://doi.org/10.1038/srep08584>
40. Zhu M.M., Skraly F.A., Cameron D.C. Accumulation of methylglyoxal in anaerobically grown *Escherichia coli* and its detoxification by expression of the *Pseudomonas putida* glyoxalase I gene. *Metab. Eng.*, 2001. vol. 3, no. 3, P. 218-225. <https://doi.org/10.1006/mben.2001.0186>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Космачевская Ольга Владимировна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Российская Федерация
E-mail: rizobium@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9965-093X>

Насыбуллина Эльвира Ильгизовна — кандидат биологических наук, научный сотрудник, Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Российская Федерация
E-mail: lvirus198709@rambler.ru
<https://orcid.org/0000-0002-3638-2827>

Топунов Алексей Федорович — доктор биологических наук, заведующий лабораторией, Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Российская Федерация
E-mail: aftopunov@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6625-7373>

Поступила в редакцию 30.04.2026

После доработки 18.05.2026

Принята к публикации 25.05.2026

AUTHOR INFORMATION

Kosmachevskaya, Olga V. — Ph. D. in Biology, Senior Research Scientist, Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
E-mail: rizobium@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9965-093X>

Nasybullina, Elvira I. — Ph. D. in Biology, Research Scientist, Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
E-mail: lvirus198709@rambler.ru
<https://orcid.org/0000-0002-3638-2827>

Topunov, Alexey F. — Dr. Sci. in Biology, Head of Laboratory, Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
E-mail: aftopunov@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6625-7373>

Received April 30, 2026

Revised May 18, 2026

Accepted May 25, 2026