

**PRODUCTION OF HUMAN ANNEXIN A5 FUSED  
WITH ADENOSINE CATABOLIC ENZYMES**

*A. B. BULATOVSKI, A. I. ZINCHENKO*

*Institute of Microbiology, NAS of Belarus, Minsk, Belarus,  
a.bulatovski@yandex.by*

Submerged culture of bacterial strains *Escherichia coli* BIM B-1411 D and BIM B-1223 G resulted in production of chimeric proteins “Annexin-PNPase” and “Annexin-ADase” consisting of human annexin A5 fused with homologous purine nucleoside phosphorylase and adenosine deaminase of *E. coli*, respectively. Affinity chromatography of ultrasonic cell lysates on Ni<sup>2+</sup>-NTA-agarose enabled to isolate protein preparations of 95 % purity grade (according to the data of polyacrylamide gel electrophoresis). The chimeric proteins “Annexin-PNPase” and “Annexin-ADase” have shown the ability to transform adenosine into adenine and inosine, respectively, making them promising agents for cancer therapy.

*Поступила в редакцию 26.05.2020*

УДК 577.112.083

**КОМПЛЕКСЫ НА ОСНОВЕ  
РЕКОМБИНАНТНОГО ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО  
ЛАКТОФЕРРИНА И МИКРОЭЛЕМЕНТОВ:  
ПОЛУЧЕНИЕ И АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА**

*К. А. ГУБЧИК<sup>1</sup>, А. А. КОСТЕНЕВИЧ<sup>1, 2</sup>, Р. Н. БИРЮКОВ<sup>1</sup>,  
М. А. КАПУСТИН<sup>1</sup>, И. С. СУРДОЛ<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

<sup>2</sup>*Белорусский государственный технологический университет,  
Минск, Беларусь, Gubchikk@gmail.com*

Подобраны условия для получения комплексов белок – металл на основе рекомбинантного человеческого лактоферрина (рчЛФ) и микроэлементов Mn, Zn, Fe. Исследованы спектральные свойства комплексов рчЛФ-Fe, рчЛФ-Zn, рчЛФ-Mn в сравнении с апо-формой рчЛФ, а также сродство ионов металлов микроэлементов к молекуле рчЛФ. Изучена антимикробная активность апо-формы рчЛФ и его комплексов с микроэлементами.

**Введение.** Белки молока обладают не только высокой пищевой ценностью, но и широким спектром биологических активностей, причем их активность можно модулировать путем физической и химической модификации, протеолизом и другими приемами. В качестве субстрата, пригодного для создания белковых препаратов, можно использовать казеины, составляющие основную долю белков молока, а также сывороточные белки. Среди них особого внимания заслуживает лактоферрин (ЛФ) [1, 2].

Согласно анализу литературных данных, проделанному нами ранее [3], ЛФ – глобулярный белок из семейства трансферринов с молекулярной массой 78–80 кДа. Молекула ЛФ включает в свой состав 703–713 аминокислотных остатка и содержит два практически идентичных железосвязывающих сайта, способных обратимо связывать, помимо Fe (II) или Fe (III), ионы Cu, Zn или Mn. Авторами E. N. Baker и H. M. Baker было установлено, что в каждой доле полипептидной цепи молекулы ЛФ атом иона металла связывается с шестью лигандами, четыре из которых представлены цепью полипептида: два остатка тирозина, остаток гистидина и остаток аспарагиновой кислоты [2]. Дополнительно с процессом связывания ионов металлов происходит присоединение аниона (карбоната или гидрокарбоната) остатками аргинина в полипептидной цепи сайта связывания за счет электростатических взаимодействий. Таким образом, нейтрализуется положительный заряд металла и обеспечивается его устойчивое связывание с молекулой ЛФ. Поскольку процесс связывания и высвобождения атомов металла сопровождается конформационными изменениями молекулы ЛФ, способность включать ионы железа и других металлов оказывает влияние на ее биологические свойства [2–6]. Л. С. Самохиной показано, что ЛФ обладает антибактериальным, противовирусным, бифидогенным действием, является фактором роста, переносчиком железа, участвует в метаболических процессах [7].

Способность ЛФ обратимо связывать двухвалентные ионы металлов и ионы с переменной валентностью может быть использована для создания на его основе белковых комплексов, в состав которых будут включены различные микроэлементы [8].

Препараты таких белковых комплексов возможно будет применять в составе функционального питания, косметической и фармацевтической продукции, изделий медицинского назначения.

В литературе приведены данные экспериментов *in vitro* [9], показывающие наличие пребиотической активности комплексов рчЛФ- $Mn^{2+}$ , в частности, стимулирование роста бактерий рода *Lactobacillus* и угнетение роста патогенных микроорганизмов. Также отмечено, что введение больших концентраций комплекса марганца с ЛФ не оказывало негативного воздействия на кишечно-эпителиальный барьер, что делает возможным использование рчЛФ- $Mn^{2+}$  в качестве многофункциональной добавки к основному рациону питания для восстановления естественной микробиоты человека [9].

Рядом авторов приводятся экспериментальные данные селективного ингибирования ВИЧ-1 комплексами ЛФ с ионами металлов Fe, Mn и Zn. Антивирусная активность этих комплексов обусловлена ингибированием взаимодействия вирусных частиц с клетками Т- и В-лимфоцитов на ранних стадиях развития инфекции. Причем степень ингибирования уменьшается в следующем ряду: рчЛФ- $Fe^{3+}$   $\rightarrow$  рчЛФ- $Mn^{2+}$   $\rightarrow$  рчЛФ- $Zn^{2+}$   $\rightarrow$  апо-рчЛФ. Вышеупомянутые данные обосновывают возможность применения таких комплексов в качестве иммуномодулирующих добавок и / или в составе лекарственных средств для коррекции иммунодефицита [10].

Введение в состав белковых молекул ионов различных микроэлементов позволит получить белковые комплексы с модифицированными функциональными свойствами. При образовании комплексов ЛФ с ионами Fe, Zn, Mn будут происходить изменения пространственной структуры молекул белка и конформационные перестройки в кластерах аминокислотных остатков, экспонированных на поверхности субъединиц белка. Такие перестройки могут вызвать не только модификацию физико-химических свойств ЛФ, но и привести к модуляции ряда биологических активностей (антимикробной, антиоксидантной, противовирусной, противораковой, антигипертензивной), установленных для нативного ЛФ. Поэтому такие комплексы можно

потенциально использовать для коррекции дефицита микроэлементов в организме. Часто недостаток микроэлементов является причиной аллергии, бронхиальной астмы, колитов, гастритов, бесплодия и снижения потенции. Симптомами дефицита микроэлементов может быть задержка физического и умственного развития [8].

Таким образом, важное значение имеет качественный оптимизированный подбор рациона питания и биологически активных добавок к пище по их микроэлементному компонентному составу, причем соотношения отдельных микроэлементов должны быть сбалансированы, так как отклонение от нормы может стать причиной развития дисфункциональных процессов, патологических сдвигов в работе отдельных систем органов и организма в целом.

Цель исследования – подбор условий для получения комплексов белок – металл на основе рчЛФ и микроэлементов (Fe, Zn, Mn), а также изучение антимикробной активности комплексов.

**Материалы и методы.** Объекты исследования: рчЛФ, выделенный из молока коз-продуцентов; комплексы рчЛФ с микроэлементами (Mn, Zn, Fe).

Металлоненасыщенную форму рчЛФ (апо-форму) получали инкубируя железонасыщенный белок в системе 0,1 М натрий-фосфатного и 0,1 М натрий-ацетатного буферов, содержащей 0,04 М ЭДТА, рН 4,0 в течение 16 ч при температуре 22 °С.

Комплексы белок – металл получали на основе апо-формы рчЛФ путем его инкубирования в буферной системе 50 мМ Трис-НСI, рН 8,0, содержащей ионы металла микроэлемента ( $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ), в течение 16 ч при температуре 22 °С. Для удаления несвязавшихся реагентов полученные образцы диализировали на ячейке Amicon 8400 (селективность мембраны – 20 кДа) против дистиллированной воды. Лиофилизацию образцов проводили на лиофильной сушке Gamma 2-16 LSD plus (Martin Christ, Германия).

Содержание белка в образцах определяли по методу Брэдфорд [11], в качестве стандарта использовали БСА и ЛФ. Кроме того, проводили спектрофотометрический анализ полученных форм рчЛФ.

Исследование антибактериальной и антифунгальной активности комплексов рчЛФ с ионами металлов проводили методом диффузии в агар [12]. В качестве тест-культур в работе применяли 15 бактериальных и 19 грибных штаммов, предоставленных Белорусской коллекцией непатогенных микроорганизмов (табл. 1) [13].

Т а б л и ц а 1. Штаммы микроорганизмов, использованные в исследовании

№	Штамм
Штамм бактерий	
1	<i>Bacillus firmus</i> БИМ В-212
2	<i>Bacillus firmus</i> БИМ В-372
3	<i>Bacillus licheniformis</i> БИМ В-175
4	<i>Bacillus megaterium</i> БИМ В-365
5	<i>Bacillus megaterium</i> БИМ В-368
6	<i>Bacillus sphaericus</i> БИМ В-392
7	<i>Bacillus sphaericus</i> БИМ В-396
8	<i>Bacillus subtilis</i> БИМ В-25
9	<i>Bacillus thuringiensis</i> БИМ В-180
10	<i>Corynebacterium ammoniagenes</i> БИМ В-123
11	<i>Enterobacter cloacea</i> БИМ В-731
12	<i>Enterobacter</i> sp. БИМ В-683
13	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> БИМ В-153
14	<i>Serratia plymuthica</i> БИМ В-162
15	<i>Streptomyces</i> sp. БИМ В-342
Штамм дрожжей и мицелиальных грибов	
1	<i>Absidia griseola</i> БИМ F-377
2	<i>Aspergillus niger</i> БИМ F-18
3	<i>Bulleromyces albus</i> БИМ-У 88
4	<i>Candida kefyr</i> БИМ У-192
5	<i>Candida utilis</i> БИМ У-173
6	<i>Candida utisis</i> БИМ-У 35
7	<i>Cryptococcus laurentii</i> БИМ У-36
8	<i>Cunninghamella echinulate</i> БИМ-F 266
9	<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i> БИМ У-22
10	<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i> БИМ У-23

Окончание табл. 1

№	Штамм
11	<i>Kluyveromyces marxianus</i> БИМ У-48
12	<i>Kluyveromyces marxianus</i> БИМ У-84
13	<i>Mucor racemosus</i> БИМ F-89
14	<i>Penicillium chrysogenum</i> БИМ F-281
15	<i>Penicillium solitum</i> БИМ F-22
16	<i>Penicillium solitum</i> БИМ F-312
17	<i>Penicillium variable</i> БИМ F-314
18	<i>Rhodosporidium toruloides</i> БИМ-У 24
19	<i>Sporotrichum pruinosum</i> БИМ F-252

Культивирование микроорганизмов проводили на следующих средах: бактерии – МПА (мясопептонный бульон – 1000 мл, агар-агар – 20 г; pH 7,2); агаризованная среда LB (глюкоза – 10 г, пептон – 10 г, дрожжевой экстракт – 5 г, NaCl – 5 г, агар-агар – 20 г, H<sub>2</sub>O дистиллированная – до 1000 мл; pH 7,2); дрожжи и мицелиальные грибы – сусло-агар (пивное сусло (8 °Б) – 1000 мл, агар-агар – 20 г; pH 5,5–6,0); агар Чапека – Докса (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,7 г, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×3H<sub>2</sub>O – 0,3 г, MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O – 0,5 г, NaNO<sub>3</sub> – 2,0 г, KCl – 0,5 г, FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O – 0,01 г, сахароза – 30 г, агар-агар – 20 г, H<sub>2</sub>O дистиллированная – до 1000 мл; pH 5,5–6,0).

Штаммы микроорганизмов для засева на агаризованные питательные среды культивировали глубинным способом при постоянном перемешивании 200 об/мин на вышеперечисленных средах, не содержащих агар-агар.

Инкубирование тестируемых штаммов-микроорганизмов проводили в температурном диапазоне 20–37 °С в течение 16–18 ч (для бактерий), 24–48 ч (для дрожжей и мицелиальных грибов) в зависимости от условий культивирования тестируемых штаммов.

При исследовании антимикробной активности в качестве положительного контроля применяли антибиотик (ампициллин, 50 мг/мл) или антимикотик (нистатин, 500 ед.); в качестве отрицательного контроля – буферный раствор, в котором растворяли исследуемые образцы комплексов белок – металл. Исследуемые образцы рчЛФ, ненасыщенных и насыщенных ионами металлов (Fe, Zn, Mn) растворяли в 0,1 М Трис-HCl (pH 7,0) в concentra-

ции 50 мг/мл. Исследуемые растворы вносили в лунки диаметром 7 мм по 100 мкл.

**Результаты и обсуждение.** Образование комплексов рчЛФ с ионами металлов определяли спектрофотометрически в УФ-диапазоне при длине волны 200–1100 нм. Полученные данные сравнивали с литературными данными спектров поглощения отдельных ионов и комплексов при длинах волн: для железа – 220, 350, 465 нм; марганца – 210, 285, 635 и 960 нм; цинка – 205, 220, 280, 900 нм [2, 10, 14]. Образцы для анализа растворяли в 0,1 М Трис-НСl, рН 7,0.

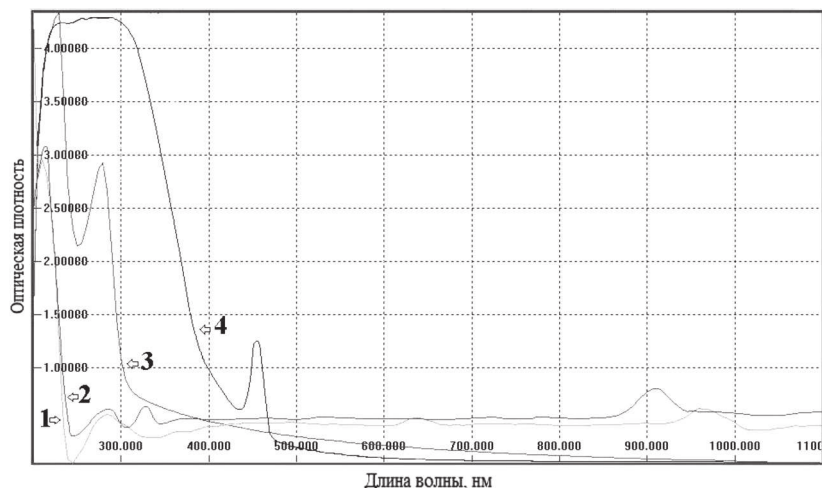
Согласно данным литературы [14], апо-ЛФ обладает максимальным поглощением при 295 нм. Комплекс ЛФ-Fe<sup>3+</sup>, кроме пика при 295 нм, имел максимум поглощения в диапазоне длин волн 400–500 нм.

Результаты исследования спектральных свойств полученных комплексов рчЛФ с ионами Fe<sup>3+</sup> и Mn<sup>2+</sup>, а также апо-ЛФ показали, что при образовании комплексов белок – металл наблюдаются изменения в характеристике поглощения электромагнитного излучения. По литературным данным, изменения в спектре поглощения белка при образовании комплексов с ионами металлов связаны с изменением конформации белковых молекул [14].

Согласно полученным результатам, апо-ЛФ (рисунок, линия 3) с концентрацией белка 0,2 мг/мл выражен двумя пиками в УФ-диапазоне длин волн 200–250 и 250–340 нм с максимумами поглощения при 205 и 280 нм соответственно.

Спектр поглощения комплекса ЛФ-Mn<sup>2+</sup> не имеет значительных отличий от спектра поглощения апо-ЛФ, кроме дополнительных максимумов поглощения при 210, 285, 635 и 960 нм (рисунок, линия 1). Для данного образца характерно появление в спектре незначительного плеча в области 230–260 нм и слабо выраженного гиперхромного эффекта в этом диапазоне длин волн. Также в спектре поглощения присутствует незначительный батохромный сдвиг второго пика и смещение максимума поглощения на длину волны 285 нм.

При образовании комплекса апо-рчЛФ с ионами Fe<sup>3+</sup> наблюдается значительное изменение спектральных свойств образца в сравнении с апо-формой белка: появляется более выраженное



Спектрометрический профиль комплексов ЛФ с металлами : 1 – комплекс ЛФ- $Mn^{2+}$ ; 2 – комплекс ЛФ- $Zn^{2+}$ ; 3 – апо-ЛФ; 4 – комплекс ЛФ- $Fe^{3+}$

плечо в диапазоне длин волн 200–220 и 295–440 нм, а также более выраженный гиперхромный эффект в диапазоне длин волн 230–395. Для железонасыщенной формы отмечены два максимума поглощения: первый – широкий пик в диапазоне 220–295 нм, второй – с максимумом электромагнитного поглощения 460 нм (рисунок, линия 4).

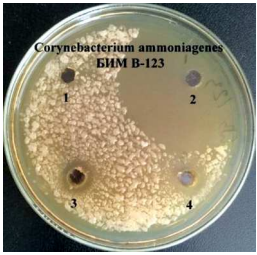
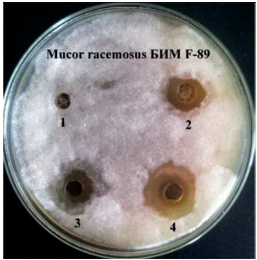


Комплекс ЛФ- $Zn^{2+}$  (рисунок, линия 2) обладает тремя выраженными максимумами поглощения в УФ-диапазоне: 285, 330, 905 нм.

Сродство ионов металлов к молекуле ЛФ изучали при инкубировании полученных комплексов рчЛФ в буфере 0,1 М Трис-НСI при значениях активной кислотности в диапазоне от 8,0 до 3,0. Установлена общая тенденция: при значении рН ниже 6,5 сродство белка к металлу уменьшается, что облегчает высвобождение иона металла из С-доли ЛФ, тем самым снижая степень насыщения металлами. При рН 4,0 степень насыщения ЛФ металлами составляет в среднем 1–3 %.



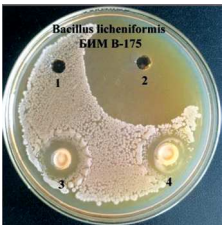

Изучение антимикробной активности апо-рчЛФ и комплексов рчЛФ- $Fe^{3+}$ , рчЛФ- $Mn^{2+}$ , рчЛФ- $Zn^{2+}$  проводили в отношении 15 бактериальных и 19 грибных тест-штаммов. Результаты исследования антимикробной активности приведены в табл. 2.



Т а б л и ц а 2. Антимикробная активность апо-рчЛФ и полученных на его основе комплексов с микроэлементами (Fe, Zn, Mn)

Антимикробная активность	Штамм	Зона подавления роста тест-культуры, мм	Рост культуры
Апо-рчЛФ			
Антибактериальная	<i>C. ammoniagenes</i> БИМ В-123	15,50 ± 0,78	
Антифунгальная	<i>M. racemosus</i> БИМ F-89	17,50 ± 0,88	
рчЛФ-Fe <sup>3+</sup>			
Антибактериальная	<i>Streptomyces</i> sp. БИМ В-342	10,50 ± 0,53	
Антифунгальная	<i>S. pruinosum</i> БИМ F-252	15,50 ± 0,78	

Окончание табл. 2

Антимикробная активность	Штамм	Зона подавления роста тест-культуры, мм	Рост культуры
рчЛФ-Mn <sup>2+</sup>			
Антибактериальная	<i>C. ammoniagenes</i> БИМ В-123	13,50 ± 0,68	
Антифунгальная	<i>A. griseola</i> БИМ F-377	12,50 ± 0,63	
рчЛФ-Zn <sup>2+</sup>			
Антибактериальная	<i>B. licheniformis</i> БИМ В-175	19,00 ± 0,95	
Антифунгальная	<i>A. griseola</i> БИМ F-377	12,50 ± 0,63	

Примечание. Варианты опыта: 1 – отрицательный контроль: буфер 0,1 М Трис-НСl (рН 7,0); 2 – положительный контроль: антибиотик (ампициллин, 50 мг/мл) или антимикотик (нистатин, 500 ед.); 3, 4 – исследуемые образцы (50 мг/мл).

Было установлено, что апо-форма рчЛФ обладает антимикробной активностью в отношении 8 бактериальных тест-штаммов (*B. firmus* БИМ В-212, *B. firmus* БИМ В-372, *B. licheniformis* БИМ В-175, *B. megaterium* БИМ В-365, *B. megaterium* БИМ В-368, *C. ammoniagenes* БИМ В-123, *Streptomyces* sp. БИМ В-342, *B. subtilis* БИМ В-25) и 7 грибных тест-штаммов (*A. niger* БИМ F-18, *P. variable* БИМ F-314, *A. griseola* БИМ F-377, *M. racemosus* БИМ F-89, *P. chrysogenum* БИМ F-281, *C. utilis* БИМ Y-173, *C. echinulate* БИМ-F 266), среди которых максимальная антибактериальная активность была идентифицирована в отношении штамма *C. ammoniagenes* БИМ В-123 (диаметр зоны ингибирования – 15,50 мм), максимальная антифунгальная активность наблюдалась в отношении штамма *M. racemosus* БИМ F-89 (диаметр зоны ингибирования – 17,50 мм) (табл. 2).

По результатам исследования была выявлена антимикробная активность рчЛФ-Fe<sup>3+</sup> в отношении четырех бактериальных тест-штаммов (*B. megaterium* БИМ В-368, *B. sphaericus* БИМ В-396, *Streptomyces* sp. БИМ В-342, *Enterobacter* sp. БИМ В-683) и трех грибных тест-штаммов (*P. solitum* БИМ F-22, *P. solitum* БИМ F-312, *S. pruinosum* БИМ F-252), среди которых максимальный показатель наблюдался в отношении штамма *Streptomyces* sp. БИМ В-342 (диаметр зоны ингибирования – 10,50 мм), а максимальная антифунгальная активность обнаружена в отношении штамма *S. pruinosum* БИМ F-252 (диаметр зоны ингибирования – 15,50 мм) (табл. 2).

Исследование антимикробной активности комплекса рчЛФ-Mn<sup>2+</sup> показало наличие антимикробной активности в отношении 10 бактериальных тест-штаммов (*P. solitum* БИМ F-22, *P. solitum* БИМ F-312, *S. pruinosum* БИМ F-252, *B. firmus* БИМ В-212, *B. firmus* БИМ В-372, *B. subtilis* БИМ В-25, *C. ammoniagenes* БИМ В-123, *Streptomyces* sp. БИМ В-342, *S. plymuthica* БИМ В-162, *Enterobacter* sp. БИМ В-683) и 5 грибных тест-штаммов (*P. variable* БИМ F-314, *A. griseola* БИМ F-377, *M. racemosus* БИМ F-89, *S. pruinosum* БИМ F-252, *C. laurentii* БИМ Y-36), среди которых максимальная антибактериальная активность выявлена в отношении штамма *C. ammoniagenes* БИМ В-123 (диаметр зоны ингибирования – 13,50 мм), максимальная антифунгальная

активность обнаружена в отношении штамма *A. griseola* БИМ F-377 (диаметр зоны ингибирования – 12,50 мм) (табл. 2).

Комплекс рчЛФ-Zn<sup>2+</sup> обладает антибактериальной активностью в отношении 12 бактериальных тест-штаммов (*B. firmus* БИМ В-212, *B. firmus* БИМ В-372, *B. licheniformis* БИМ В-175, *B. megaterium* БИМ В-365, *B. megaterium* БИМ В-368, *B. sphaericus* БИМ В-392, *B. sphaericus* БИМ В-396, *B. thuringiensis* БИМ В-180, *C. ammoniagenes* БИМ В-123, *Streptomyces* sp. БИМ В-342, *S. plymuthica* БИМ В-162, *Enterobacter* sp. БИМ В-683) и двух грибных тест-штаммов (*A. griseola* БИМ F-377, *S. pruinosum* БИМ F-252), причем максимальная антибактериальная активность выявлена в отношении штамма *B. licheniformis* БИМ В-175 (диаметр зоны ингибирования – 19,00 мм), максимальная антифунгальная активность обнаружена в отношении штамма *A. griseola* БИМ F-377 (диаметр зоны ингибирования – 12,50 мм) (табл. 2).

Таким образом, в результате изучения антимикробной (антибактериальной и антифунгальной) активности апо-форм рекомбинантного человеческого ЛФ, их комплексов с микроэлементами (Fe<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>) установлено, что активность ЛФ зависит от степени его насыщения ионами металлов и уменьшается в следующем ряду: рчЛФ-Zn<sup>2+</sup> → рчЛФ-Mn<sup>2+</sup> → рчЛФ-Fe<sup>3+</sup> → апо-рчЛФ.

**Заключение.** Получены ненасыщенные и насыщенные микроэлементами (Fe, Zn, Mn) формы рчЛФ.

Показано сродство ионов металлов к молекуле ЛФ при различных значениях активной кислотности. Установлена общая тенденция: при значениях рН ниже 6,5 сродство белка к металлу понижается, что облегчает высвобождение иона металла из С-доли ЛФ, тем самым снижая степень насыщения металлами.

Ненасыщенная микроэлементами форма ЛФ обладает максимумом поглощения электромагнитного излучения в диапазонах 200–250 и 250–340 нм с максимумами поглощения при 205 и 280 нм соответственно. Комплекс ЛФ-Mn<sup>2+</sup> обладает максимумом поглощения электромагнитного излучения при 210, 285, 635 и 960 нм. Для ЛФ-Fe<sup>3+</sup> отмечены два максимума поглощения: диапазоны 220–295 и 460 нм. Комплекс ЛФ-Zn<sup>2+</sup> имеет три пика: при 285, 330, 905 нм.

Наличие антимикробной активности было показано как у апо-формы рчЛФ, так и у комплексов с микроэлементами ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ), причем последние обладают антимикробной активностью в отношении более широкого спектра микроорганизмов по сравнению с апо-формой рчЛФ.

Установлено, что антимикробная активность ЛФ зависит от степени его насыщения ионами металлов и уменьшается в следующем ряду: рчЛФ- $\text{Zn}^{2+}$   $\rightarrow$  рчЛФ- $\text{Mn}^{2+}$   $\rightarrow$  рчЛФ- $\text{Fe}^{3+}$   $\rightarrow$  апо-рчЛФ.

Дальнейшие исследования будут включать изучение пребиотической и антиоксидантной активности комплексов ЛФ с микроэлементами.

### Литература

1. Milk exploration of potential angiotensin converting enzyme inhibitory peptides generated from enzymatic hydrolysis of goat milk proteins / S. Rani [et al.] // *Biocatal. Agricult. Biotechnol.* – 2017. – Vol. 11. – P. 83–88.
2. Baker, E. N. A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin / E. N. Baker, H. M. Baker // *Biochimie.* – 2009. – Vol. 91, № 1. – P. 3–10.
3. Мировая практика получения рекомбинантного человеческого лактоферрина (обзор) / И. С. Агиевич [и др.] // *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты* : сб. науч. тр. – Минск, 2017. – Т. 9. – С. 9–30.
4. Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview / I. A. García-Montoya [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA).* – 2012. – Vol. 1820. – P. 226–236.
5. Moguilevsky, N. Comparison on human lactoferrins from milk and neutrophilic leucocytes. Relative molecular mass, isoelectric point, iron-binding properties and uptake by the liver / N. Moguilevsky, L. Retequi, P. Masson // *Biochem. J.* – 1985. – Vol. 229, № 2. – P. 353–359.
6. Baker, E. N. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin / E. N. Baker, H. M. Baker // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2005. – Vol. 62, № 22. – P. 2531–2539.
7. Самохина, Л. С. Биологическое действие пептидов лактоферрина и  $\alpha$ -лактальбумина на желудочно-кишечный тракт : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.01.06 / Л. С. Самохина ; Ин-т биохимии им. А. Н. Баха РАН, Моск. гос. ун-т пищевых производств. – М., 2013. – 26 с.
8. Falah Al-Fartusie, S. Essential Trace Elements and Their Vital Roles in Human Bod / S. Falah Al-Fartusie, Saja N. Mohssan // *Indian J. Adv. Chem. Sci.* – 2017. – № 3. – P. 127–136.
9.  $\text{Mn}^{3+}$ -saturated bovine lactoferrin as a new complex with potential prebiotic activities for dysbiosis treatment and prevention – On the synthesis, chemical charac-

terization and origin of biological activity / K. Śpiewak [et al.] // *J. Functional Foods*. – 2017. – Vol. 38 – P. 264–272.

10. Antiviral effect of bovine lactoferrin saturated with metal ions on early steps of human immunodeficiency virus type 1 infection / P. Puddu [et al.] // *Int. J. Biochem. & Cell Biology*. – 1998. – Vol. 30, № 9. – P. 1055–1063.

11. Walker, J. M. *The protein protocols handbook* / J. M. Walker. – Totowa : Humana Press, 2002. – 15 p.

12. Кулешова, С. И. Определение активности антибиотиков методом диффузии в агар / С. И. Кулешова // *Ведомости Науч. центра экспертизы средств мед. применения*. – 2015. – Вып. 3. – С. 13–17.

13. Характеристика пептидного комплекса, полученного при гидролизе рекомбинантного человеческого лактоферрина трипсином / У. В. Фальковская [и др.] // *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты* : сб. науч. тр. – Минск, 2018. – Т. 10. – С. 391–402.

14. Spectroscopic studies on metal complexes of *Aspergillus awamori*-derived recombinant human lactoferrin / J. C. Swarts [et al.] // *Inorganica Chimica Acta*. – 2000. – Vol. 298, № 2. – P. 187–194.

**COMPLEXES BASED ON RECOMBINANT  
HUMAN LACTOFERRIN AND MICROELEMENTS:  
PRODUCTION AND ANTIMICROBIAL PROPERTIES**

*K. A. HUBCHYK<sup>1</sup>, A. A. KASTSIANEVICH<sup>1, 2</sup>, R. N. BIRUKOU<sup>1</sup>,  
M. A. KAPUSTIN<sup>1</sup>, I. S. SURDAL<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Institute of Microbiology, NAS of Belarus, Minsk, Belarus*

<sup>2</sup>*Belarusian State Technological University, Minsk, Belarus,  
Gubchikk@gmail.com*

Conditions for protein-metal complexing based on recombinant human lactoferrin (rhLF) and microelements Mn, Zn, Fe were chosen. Spectral characteristics of rhLF-Fe, rhLF-Zn, rhLF-Mn complexes were compared with apo-form of rhLF; affinity of metal ions to rhLF molecule was studied. Antimicrobial activity of rhLF apo-form and the derived complexes with microelements against bacterial and fungal strains was investigated.

*Поступила в редакцию 29.04.2020*