

УДК 577153.2

ЛИПАЗЫ В РЕАКЦИЯХ КАТАЛИЗА В ОРГАНИЧЕСКОМ СИНТЕЗЕ (ОБЗОР)

© 2014 г. А. М. Безбородов, Н. А. Загустина

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, 119071

e-mail: zagust@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 25.10.2013 г.

В обзоре рассмотрены проблемы ферментативного катализа в реакциях органического синтеза, в которых катализатором является липаза. Кратко изложены данные о современных методах белковой инженерии и модификации ферментов, позволяющие расширить круг используемых субстратов. Показано участие липазы в получении лекарственных и агрохимических препаратов, лишенных неактивных энантиомеров, а так же в синтезе энантиомеров вторичных спиртов и оптически активных амидов. Обсуждается вопрос об участии липазы в формировании С—С связи в реакции Михаэля. Представлены данные о ферментативном синтезе конструкционных материалов — полиэфиров, силоксанов и др. Приведены примеры реализации процесса ферментативного катализа в промышленности с участием липазы.

DOI: 10.7868/S0555109914040187

УДК 577.122

КОМПАРТМЕНТАЦИЯ САЛИЦИЛАТ-ИНДУЦИРУЕМЫХ БЕЛКОВ (ОБЗОР)

© 2014 г. И. А. Тарчевский

Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, Казань 420111

e-mail: tarchevsky@mail.knc.ru

Поступила в редакцию 16.12.2013 г.

Ключевой фактор иммунитета — салициловая кислота (экзогенная или быстро накапливающаяся при действии на растения биотрофных и полубиотрофных патогенов) вызывает образование не только защитных белков прямого антипатогенного действия, но и многих белков, повышающих устойчивость клеток растения-хозяина. Кодированные ядерными генами и затем образующиеся с помощью цитоплазматических рибосом салицилат-индуцируемые белки осуществляют свои функции или в цитозоле, или доставляются в ядра, вакуоли, пластиды, митохондрии, а также за пределы плазмалеммы. В статье приводится информация о салицилат-индуцируемых белках, не только транспортируемых в различные компартменты, но и участвующих в их трансмембранном переносе.

DOI: 10.7868/S0555109914040278

УДК 577.112:579.861.043:535.31

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО ПЕПТИДНОГО ФАКТОРА *Luteococcus japonicus* subsp. *casei* НА ПРОБИОТИЧЕСКИЕ БАКТЕРИИ

© 2014 г. Л. И. Воробьева*, Е. Ю. Ходжаев*, Н. В. Харченко*, Т. М. Новикова**,
Т. А. Чердынцева*

* Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119899

e-mail: livorobjeva@mail.ru

**Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, Москва, 119899

Поступила в редакцию 17.12.2013 г.

Изучено биологическое действие внеклеточного пептидного реактивирующего фактора (РФ), синтезируемого *Luteococcus casei*, на клетки пробиотических культур. РФ оказывал протекторный и реактивирующий эффект на клетки *Bifidobacterium bifidum*, подверженные действию желчных солей и кислотному стрессу, действовал как криопротектор при лиофилизации и длительном хранении культуры. Показано, что РФ и культуральная жидкость *L. casei* проявляли бифидогенное действие. Степень защиты и реактивации клеток молочнокислых бактерий, подвергнутых действию желчных солей, зависела от природы штамма. Максимальная степень защиты (более, чем в 13 раз) и реактивации (почти в 3 раза) обнаружена у *Lactobacillus casei* и минимальная — у *Lactobacillus reuterii*. Устойчивость лактобацилл к желчи увеличивалась в последовательности *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* и *L. reuterii* и коррелировала со степенью защиты РФ.

DOI: 10.7868/S0555109914040291

ВЛИЯНИЕ АЛКИЛОКСИБЕНЗОЛОВ НА ИНДУЦИРУЕМЫЕ ГОМОСЕРИНАКТОНАМИ ПРОЯВЛЕНИЯ КВОРУМ СЕНСИНГА У БАКТЕРИЙ

© 2014 г. Д. Г. Дерябин*, А. А. Камаева*, А. А. Толмачева*, Г. И. Эль-Регистан**

* Оренбургский государственный университет, 460018, Оренбург

**Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, 117312, Москва

e-mail: dgderyabin@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.09.2013 г.

Исследовано влияние 4 гомологов алкилоксибензолов (АОБ) с различной длиной углеводородной цепи на индуцируемый C_6 -гомосеринактоном (ГСЛ) синтез пигмента виолацеина и образование биопленки у *Chromobacterium violaceum* NCTC 13274, а также биолюминесценцию *Escherichia coli* pAL103, развивающуюся в присутствии C_6 -оксо-ГСЛ. Установлено ингибирующее воздействие алкилоксибензолов на рост *C. violaceum*, увеличивающееся в ряду C_5 -АОБ \rightarrow C_{12} -АОБ при отсутствии данной активности у C_1 АОБ. Субингибиторные концентрации АОБ с различной интенсивностью снижали продукцию виолацеина и подавляли образование биопленки, что было представлено в виде индивидуальных и групповых регрессионных зависимостей между анализируемыми параметрами. С использованием биолюминесцентной модели показано, что регуляторные эффекты АОБ не связаны с их прямой конкуренцией с ГСЛ и развиваются в результате изменения чувствительности бактериальных клеток к действию соответствующего индуктора кворум сенсинга.

DOI: 10.7868/S0555109914040199

ЭФФЕКТИВНАЯ СХЕМА ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОЙ УРАЦИЛ-ДНК-ГЛИКОЗИЛАЗЫ *Escherichia coli* ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ПЦР-ДИАГНОСТИКЕ

© 2014 г. А. Е. Дмитроченко, О. М. Туриянская, А. А. Гилеп, С. А. Усанов, А. В. Янцевич

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, 220141

e-mail: dmitrochenko@iboch.bas-net.by

Поступила в редакцию 8.11.2013 г.

Разработана эффективная схема получения рекомбинантной урацил-ДНК-гликозилазы *Escherichia coli* штамм K12, предназначенной для использования в ПЦР-диагностике, которая позволила добиться высокого выхода целевого продукта при использовании двух стадий его очистки. Ген, кодирующий этот фермент, клонирован в вектор pCWOg1 в одной рамке считывания с шестью остатками гистидина в С-концевой последовательности. С использованием данного вектора и *E. coli* штамм DH5a создана экспрессионная система "хозяин-вектор" и оптимизированы условия синтеза белка. Для очистки белка использовали металло-аффинную хроматографию с последующим диализом для удаления имидазола. Выход фермента составлял не менее 60 мг целевого белка на 1 л культуральной среды. Соответствие аминокислотной последовательности рекомбинантного и нативного ферментов подтверждено методами "пептидного фингерпринта" и масс-спектрометрического анализа. Предложен экспресс-метод определения активности ферментного препарата. Установлено, что активность 1.0 мг рекомбинантного белка составляла не менее 3×10^3 ед. Рекомбинантный фермент проявлял наибольшую стабильность при pH 8.0 и ионной силе раствора, равной 200 мМ, и полностью терял активность за 10 мин при 60°C. Хранение в течение 1 г при -20°C приводило к потере не более 30% активности. В ферментном препарате отсутствовала активность ДНКазы. Свободная энергия разворачивания белковой глобулы рекомбинантной урацил-ДНК-гликозилазы равна 23.1 ± 0.2 кДж/моль. Полученные данные свидетельствуют о том, что рекомбинантный фермент можно рекомендовать к использованию в ПЦР-диагностике для предотвращения появления ложных положительных результатов, обусловленных загрязнением реакционной смеси продуктами предшествующих реакций.

DOI: 10.7868/S0555109914030209

УДК 579.253+579.812.11

ПРОЦЕСС РАСЩЕПЛЕНИЯ ПОПУЛЯЦИИ БАКТЕРИЙ НА ДИССОЦИАНТЫ И ДЛИТЕЛЬНОЕ ПЕРИОДИЧЕСКОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ БАКТЕРИЙ

© 2014 г. Е. С. Милько, Д. М. Милько

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119899
e-mail: esmilko@mail.ru

Поступила в редакцию 16.01.2014г.

Изучены рост и состав популяции при длительном периодическом культивировании (до 50 сут) моно- и смешанных культур S- и M-диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* или R- и M-диссоциантов *Rhodobacter sphaeroides* без дополнительного внесения питательных веществ. При выращивании *P. aeruginosa* на минеральной среде с глюкозой периодический лизис и последующее возобновление роста поликультуры в позднюю стационарную фазу происходили за счет M-диссоцианта, изменение численности которого соответствовало изменению общего количества клеток ассоциации. Показано, что периодическое появление в среде редуцирующих сахаров предшествовало возобновлению роста поликультуры.

Периодический вторичный рост смешанной культуры фотосинтезирующих бактерий *R. sphaeroides* происходил за счет быстрорастущих R-клеток, следовавший за лизисом части популяции R-диссоцианта. В монокультуре M-диссоцианта *R. sphaeroides* R-клетки обнаруживались в течение всего времени культивирования, составляя 1—10% популяции вне зависимости от ее численности, что, вероятно, соответствовало частоте возникновения этого диссоцианта. В монокультуре R-диссоцианта M-клетки выявлялись только после 26 сут, при этом их количество постепенно увеличивалось и к концу культивирования составляло половину популяции. Совместный рост диссоциантов по сравнению с монокультурами приводил к увеличению биомассы и ускорению роста бактерий, что важно в природных условиях для быстрого освоения новых мест обитания. Клетки обоих видов бактерий лизировались при длительном культивировании экзопротеиназами, выделяемыми тонкостенными клетками M-диссоциантов.

DOI: 10.7868/S0555109914040254

УДК 579.222.2:54.022

АНАЛИЗ ПУТЕЙ ДЕГРАДАЦИИ ФУНКЦИОНАЛИЗОВАННЫХ АРЕНОВ В УСЛОВИЯХ ВОДНО-ОРГАНИЧЕСКИХ МОДЕЛЬНЫХ СРЕД

© 2014 г. А. С. Лебедев, В. Ю. Орлов

Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова, 150057, Ярославль
e-mail: logos2012@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.09.2013 г.

Показано, что деградация функционализированных арен под воздействием смешанной культуры хемоорганогетеротрофных микроорганизмов проходит преимущественно по пути окислительной интрадиольной дециклизации ароматического кольца. Методом квантово-химического моделирования рассчитаны характеристики пространственной структуры каталитического центра интрадиольдиоксигеназы, а также комплексов каталитического центра с пирокатехином и протокатеховой кислотой. Впервые выявлены зависимости полной энергии фермент-субстратных комплексов от длины связи железо-гидроксильная группа (Fe-4-OH и Fe-1-OH) субстратов до и после отделения воды и аминокислотного остатка тирозина (Тир) от каталитического центра.

DOI: 10.7868/S0555109914040230

УДК 577.11:579.66

ДЕПОЛИМЕРИЗАЦИЯ ХИТОЗАНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА, ПРОДУЦИРУЕМОГО *Myceliophthora* sp.

© 2014 г. Л. М. Хасанова*, А. В. Ильина*, В. П. Варламов*, О. А. Сеницына**,
А. П. Сеницын**, ***

* Центр "Биоинженерия" РАН, Москва, 117312

**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, 119991

*** Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071 Москва,

e-mail: varlamov@biengi.ac.ru

Поступила в редакцию

Получены образцы низкомолекулярного хитозана с выходом 50—80% и молекулярной массой 8—24 кДа, с одинаковой степенью дезацетилирования (85%) и одинаковым индексом полидисперсности, растворимые в диапазоне рН 5—7. Подобраны условия для проведения ферментативного гидролиза с максимальным выходом с использованием ферментного препарата из мицелиального гриба *Myceliophthora fergusonii*, — рН 5.6, температура 37°C и соотношение фермент—субстрат — 1 : 800.

DOI: 10.7868/S0555109914040229

УДК 579.66/615.375

СИНТЕЗ МОДИФИЦИРОВАННЫХ, УСТОЙЧИВЫХ К ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ ДЕГРАДАЦИИ ИНТЕРФЕРОНОВ - ГАММА

В ДРОЖЖАХ Pichia pastoris

© 2014 г. М. А. Цыганков, А. Е. Зобнина, М. В. Падкина

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034

e-mail: tsygankov@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.11.2013 г.

Получены модифицированные гены бычьего и куриного гамма-интерферона, кодирующие белки, лишённые в С-концевой части потенциальных сайтов расщепления протеазами. Созданы штаммы дрожжей *Pichia pastoris* — продуценты укороченных форм бычьего и куриного гамма-интерферона. Показано, что рекомбинантные белки с привнесёнными модификациями обладают повышенной стабильностью и при этом сохраняют биологическую активность. Это позволяет использовать созданные штаммы для получения очищенных препаратов бычьего и куриного гамма-интерферона для их применения в ветеринарии.

DOI: 10.7868/S055510991404028X

УДК 577.158+581.19

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ НА СТАДИИ ЗАВЯЛИВАНИЯ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ЧЕРНОГО ЧАЯ

© 2014 г. Н. Т. Омиадзе*, Н. И. Мchedlishvili*, Х. Н. Родригез-Лопез**, М. О. Абутидзе*, Т.
А. Садунишвили*, Н. Г. Пруидзе*

* Институт биохимии и биотехнологии им. С. В. Дурмишидзе Аграрного университета Грузии, 0159, Тбилиси,
Грузия

**Университет Мурсии, 30100, Мурсия, Испания

e-mail: nino.omiadze@agruni.edu.ge

Поступила в редакцию 9.12.2013 г.

Определены молекулярные массы и некоторые свойства множественных форм фенолоксидазы листьев чая и еще 4 других многолетних растений. Показано, что высокомолекулярные и низкомолекулярные множественные формы фенолоксидазы различались субстратной специфичностью. Низкомолекулярные формы фермента большей частью проявляли гидроксигирующую активность, высокомолекулярные — катехолоксидазную. Установлено, что на стадии завяливания при производстве черного чая происходит образование именно высокомолекулярных форм фенолоксидазы, обладающих преимущественно катехолоксидазной активностью, участвующей в подготовке основных для технологического процесса окислительных преобразований, определяющих качественные показатели готовой продукции.

DOI: 10.7868/S0555109914040266

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ БИОРЕГУЛЯТОРА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

© 2014 г. А. П. Ильина*, А. А. Молявка*, В. П. Ямскова**, А. К. Буряк***, И. А. Ямсков*

* *Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, 119991*

e-mail: Yamskov@mail.ru

***Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, 119334*

e-mail: Yamskova-vp@yandex.ru

****Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, 119991*

e-mail: AKBuryak@ipc.rssi.ru

Поступила в редакцию 22.10.2013 г.

Из ткани мозга крысы линии Wistar выделен биорегулятор, действующий в сверхмалых дозах. С помощью метода ВЭЖХ в обращенной фазе получен гомогенный полипептид с молекулярной массой 4749 ± 2 Да, который отвечает за проявление биологической активности биорегулятора. Методами КД-спектроскопии рассчитано процентное содержание канонических элементов вторичной структуры полипептида в растворе. Методами протеомных исследований установлено, что структура изученного полипептида идентична N-концевой последовательности фрагмента гуанин-нуклеотидсвязывающего C₀-белка (субъединица α -1).

DOI: 10.7868/S0555109914030234