

УДК 573.6.086.83:577.21]:[615.373.3+615.277]

## РАСТЕНИЯ – ПРОДУЦЕНТЫ РЕКОМБИНАНТНЫХ ЦИТОКИНОВ (ОБЗОР)

© 2016 г. М. С. Бурлаковский, В. В. Емельянов, Л. А. Лутова

Санкт-Петербургский государственный университет, биологический факультет, Санкт-Петербург, 199034

e-mail: bootika@mail.ru

Поступила в редакцию 12.05.2015 г.

Цитокины – семейство сигнальных полипептидов, участвующих в межклеточном взаимодействии в процессе иммунного ответа, а также в регуляции ряда нормальных физиологических функций организма. Препараты цитокинов используются в медицине при терапии рака, иммунных нарушений, вирусных инфекций и других социально значимых заболеваний, однако масштабы их применения ограничиваются высокой стоимостью получения действующего вещества. Развитие данного направления фармакологии связано с успехами генной инженерии, позволяющей нарабатывать значительные количества белка в трансгенных организмах-продуцентах. В обзоре обсуждаются новейшие достижения в области производства различных цитокинов с применением генетически модифицированных растений.

DOI: 10.7868/S0555109916020033

УДК 557.152.083.13:579.222.6/7

## ИЗОФОРМЫ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ БАКТЕРИЙ *Rhodovulum steppense* A-20s, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ХЕМОТРОФНО В АЭРОБНЫХ УСЛОВИЯХ

© 2016 г. А. Т. Епринцев\*, М. И. Фалалеева\*, М. С. Лященко\*, М. О. Гатаулина\*, Е. И. Компанцева\*\*

\*Воронежский государственный университет, Воронеж, 119071

\*\*Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 117811

e-mail: bc366@bio.vsu.ru e-mail: elenamaxi@mail.ru

Поступила в редакцию 03.08.2015 г.

Из галоалкалофильных пурпурных несерных бактерий *Rhodovulum steppense* штамм А-20s, культивируемых хемотрофно в аэробных условиях роста, выделены и очищены до электрофоретически гомогенного состояния три изоформы малатдегидрогеназы (степень очистки 65, 60 и 71 раз) с удельной активностью 4.23, 3.88 и 4.56 Е/мг белка. Изучены физико-химические свойства и определены кинетические характеристики изоформ малатдегидрогеназы. Определена молекулярная масса, значения констант Михаэлиса и влияние концентрации ионов водорода на прямую и обратную реакции. Показано, что фермент состоит из субъединиц, молекулярная масса субъединиц определена методом электрофореза в ПААГ в присутствии ДДС-Na.

DOI: 10.7868/S0555109916020057

УДК 576.3

**ИССЛЕДОВАНИЕ НАКОПЛЕНИЯ БЕЛКА RecA *Bacillus subtilis* В  
МИТОХОНДРИЯХ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА ДРОЖЖЕЙ *Yarrowia  
lipolytica***

© 2016 г. Е. П. Исакова\*, Ю. И. Дерябина\*, О. А. Леонович\*\*, М. В. Зылькова\*\*, Ю.  
К. Бирюкова\*\*

*Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр  
“Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 119071*

*\*\* Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П. Чумакова РАМН,  
Москва, 142782*

*e-mail: elen\_iss@mail.ru e-mail: kudykina\_yuliya@mail.ru*

Поступила в редакцию 21.09.2015 г.

Получен штамм *Yarrowia lipolytica*, несущий интегративную генетическую конструкцию pQ-SRUS, отвечающую за продукцию белка RecA бактериального происхождения с митохондриальной локализацией. Проведена оценка общего уровня продукции этого белка в рекомбинантных клетках и митохондриях *Y. lipolytica*. Адресация рекомбинантного белка RecA в митохондрии обеспечивалась за счет лидерных последовательностей мРНК гена *SOD2* (5'-UTR и 3'-UTR), обладающих средством к внешней поверхности митохондрий, и обеспечивающих котрансляционный транспорт RecA внутрь митохондрий. Штамм *Y. lipolytica*, несущий конструкцию pQ-SRUS, обладал способностью накапливать белок RecA внутри митохондрий, что показано методом иммуноблоттинга очищенных препаратов митохондрий.

DOI: 10.7868/S0555109916020070

УДК 575:663.12/14:661.718

**ЭКСПРЕССИЯ ДНК-КОДИРУЕМОГО АНТИДОТА К ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМ  
ТОКСИНАМ В МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖАХ *Pichia pastoris***

© 2016 г. С. С. Терехов\*, Т. В. Бобик\*, Ю. А. Мокрушина\*, А. В. Степанова\*, Н. М.  
Александрова\*\*, И. В. Смирнов\*\* \*\*, А. А. Белогуров\*\* \*\*, Н. А. Пономаренко\*, А. Г.  
Габибов\* \*\*

*\*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
Москва, 117997*

*\*\*Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420000  
e-mail: gabibov@mx.ibch.ru*

Поступила в редакцию 21.09.2015 г.

Впервые представлена платформа по клонированию и экспрессии активной бутирилхолинэстеразы (БуХЭ) человека в дрожжевой системе *Pichia pastoris*. На основе вектора pPICZαA созданы генетические конструкции для экспрессии гена БуХЭ отдельно и совместно с пролинбогатым пептидом (PRAD). Показано, что наибольший уровень продукции достигался при экспрессии гена БуХЭ без PRAD pPICZαA. Установлено, что при оптимальной кислотности среды (рН 7.6), оптической плотности посевной культуры 3 о.е. и оптимального режима добавления метанола (0.5% метанола в первые сутки и начиная со вторых сут по 0.2% каждые последующие) удается получать до 125 мкг активного фермента из 1 л культуральной среды.

DOI: 10.7868/S0555109916020161

УДК 663.12/14:575

## СОЗДАНИЕ СИСТЕМЫ ПРОДУКЦИИ МУТАНТНОГО АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА ЧЕЛОВЕКА В МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖАХ *Pichia pastoris*

© 2016 г. Е. В. Морозкина\*, Е. А. Вавилова\*, С. С. Зацепин\*, Е. В. Клячко\*, Т. А. Ягудин\*, А. М. Чулкин\*, И. В. Дудич\*\*, Л. Н. Семенкова\*\*, И. В. Чурилова\*\*\*, С. В. Беневоленский\*

\*Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр  
“Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 119071

\*\*ОАО “Институт инженерной иммунологии”, Московская обл., Чеховский р-н, пос.  
Любучаны, 142380

\*\*\*ООО “НПП Ферментные технологии”, Санкт-Петербург, 197110  
e-mail: chicelena@yandex.ru

Поступила в редакцию 04.09.2015 г.

Создана система продукции мутантного рекомбинантного альфа-фетопротеина человека (рчАФПО), лишённого сайта гликозилирования, в дрожжах *Pichia pastoris*. Сконструирован штамм метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris* GS115/pPICZαA/rhAFP0 – продуцент негликозилированного рчАФПО, секретирующий белок в культуральную жидкость. Оптимизация и масштабирование ферментационного процесса позволили увеличить выход рчАФПО до уровня 20 мг/л. Разработана схема выделения и очистки биологически активного рчАФПО. Синтезируемый белок обладал противоопухолевой активностью, аналогичной природному эмбриональному альфа-фетопротеину человека.

DOI: 10.7868/S0555109916020124

УДК 573.6:579.222:579.262:579.63

## БИОРАЗЛОЖЕНИЕ ЦЕЛЛЮЛОСОДЕРЖАЩИХ СУБСТРАТОВ МИКРОМИЦЕТАМИ С ПОСЛЕДУЮЩЕЙ БИОКОНВЕРСИЕЙ В БИОГАЗ

© 2016 г. Л. И. Прокудина, А. А. Осмоловский, М. А. Егорова, Д. В. Малахова, А. И. Нетрусов, Е. А. Цавкелова

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический  
факультет, Москва, 119992

e-mail: tsavkelova@mail.ru

Поступила в редакцию 16.06.2015 г.

Изучена способность микромицетов *Trichoderma viride* и *Aspergillus terreus* к разложению целлюлозосодержащих субстратов. Наиболее гидролизуемыми оказались офисная бумага, картон, а также смесь бумаг. Целлюлозолитическая активность *T. viride* в 2-3 раза превышала таковую *A. terreus*, наибольшие значения 0.80 и 0.73 ед./мл были получены на офисной бумаге и на смеси бумаг соответственно. Оптимизированы условия культивирования микромицетов (состав питательной среды, добавление косубстрата сахарозы, способ засева) и обработки грибной биомассы для ее последующей биоконверсии в биогаз анаэробным микробным сообществам. Показано, что предобработка повышала эффективность образования биогаза из лигноцеллюлозных материалов при засеве микробными сообществами из навоза крупного рогатого скота. После предобработки фитомассы (стебли и листья) топинамбура и его последующей биоконверсии в биогаз метаногенным сообществом выход биогаза увеличивался в 1.5 раза.

DOI: 10.7868/S0555109916020136

УДК 579.2:579.6:581.1:58.084.1

## ПОВЫШЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ ГОРОХА К ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ, ВЫЗВАННОМУ ПАРАКВАТОМ, ПРИ КОЛОНИЗАЦИИ АЭРОБНЫМИ МЕТИЛОБАКТЕРИЯМИ

© 2016 г. Н. В. Агафонова\*, Н. В. Доронина\*\*, Ю. А. Троценко\*\*

\*Пушчинский государственный естественно-научный институт, Пушкино, Московская обл., 142290

\*\*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушкино, Московская обл., 142290

e-mail: trotsenko@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 24.07.2015 г.

Изучено влияние колонизации гороха (*Pisum sativum* L.) аэробными метиловыми бактериями пяти различных видов (*Methylophilus flavus* Ship, *Methylobacterium extorquens* G10, *Methylobacillus arboreus* Iva, *Methylopila musalis* MUSA, *Methylopila turkiensis* Side1) на устойчивость растений к стрессовым воздействиям, индуцированным гербицидом паракватом. В нормальных условиях при колонизации метиловыми бактериями у гороха снижались активности антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы и пероксидазы), концентрация эндогенного H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, пролина и малонового диальдегида – продукта перекисного окисления липидов и индикатора повреждения клеточных мембран растений, повышалась активность фотосинтетического аппарата (содержание хлорофиллов a, b и каротиноидов). В присутствии параквата колонизированные растения обладали более высокими активностями антиоксидантных ферментов, стабильными фотосинтетическими показателями и менее интенсивным накоплением продуктов перекисного окисления липидов по сравнению с неколонизированными растениями. Таким образом, колонизация метиловыми бактериями существенно повышала адаптивную защиту и устойчивость растений гороха к окислительному стрессу, вызванному обработкой паракватом.

DOI: 10.7868/S0555109916020021

УДК .581.1:633.358:577.13

## ВЫДЕЛЕНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ЭКССУДАТЫ КОРНЕЙ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА ПРИ ИНОКУЛЯЦИИ *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* и *Pseudomonas* *siringae* pv. *Pisi*

© 2016 г. Л. Е. Макарова, Л. В. Дударева, И. Г. Петрова, Г. Г. Васильева

Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения РАН, Иркутск, 664033

e-mail: makarova@sifibr.irk.ru

Поступила в редакцию 23.08.2015 г.

Определено содержание апигенина, нарингенина, пизатина, дибутил-орто-фталата и N-фенил-2-нафтиламина в экссудатах корней проростков гороха (*Pisum sativum* L.) через 1 сут после их инокуляции *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* и *Pseudomonas* *siringae* pv. *pisi*, различающихся стратегией взаимоотношений с растением-хозяином (мутуалист и антагонист). Показано, что содержание апигенина и пизатина в корневых экссудатах гороха после инокуляции обеими бактериями было одинаковым, а нарингенина и N-фенил-2-нафтиламина различным, при этом содержание дибутил-орто-фталата оставалось неизменным. Высказано предположение, что фенольные соединения играют

определенную роль при формировании симбиотических отношений бактерий с растением-хозяином.

DOI: 10.7868/S0555109916020094

УДК 577.15:581.1

### СОДЕРЖАНИЕ ОСМОЛИТОВ И ФЛАВОНОИДОВ У РАСТЕНИЙ *Arabidopsis thaliana*, ДЕФЕКТНЫХ ПО ЖАСМОНАТНОМУ СИГНАЛИНГУ, ПРИ СОЛЕВОМ СТРЕССЕ

© 2016 г. Т. О. Ястреб\*, Ю. Е. Колупаев\*, А. А. Луговая\*, А. П. Дмитриев\*\*

\*Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева, Харьков, 62483, Украина

\*\*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, 03143, Украина

e-mail: plant\_biology@mail.ru e-mail: dmyt@voliacable.com

Поступила в редакцию 04.08.2015 г.

Изучено влияние солевого стресса (200 мМ NaCl) и экзогенной жасмоновой кислоты на содержание осмолитов и флавоноидов в листьях четырехнедельных растений *Arabidopsis thaliana* (L.) дикого типа *Columbia-0* (*Col-0*) и мутантов *jin1* (jasmonate insensitive 1) с нарушенным жасмонатным сигналингом. У растений *Col-0* увеличение содержания пролина, вызываемое солевым стрессом, было более значительным по сравнению с мутантом *jin1*. Особенно заметными эти различия оказались при предварительной обработке растений 0.1 мкМ экзогенной жасмоновой кислотой. Содержание сахаров в растениях дикого типа, обработанных жасмоновой кислотой, увеличивалось в ответ на солевой стресс, в то время как у мутантов *jin1* снижалось. Обработка жасмоновой кислотой растений дикого типа, но не мутантов с нарушенным жасмонатным сигналингом, вызывала также увеличение содержания в листьях антоцианов и флавоноидов, поглощающих в области УФ-В. Наблюдали повышение солеустойчивости растений *Col-0* в присутствии жасмоновой кислоты, что проявлялось в меньшем накоплении продуктов пероксидного окисления липидов и ингибировании роста после действия NaCl. Жасмоновая кислота в условиях солевого стресса практически не оказывала положительного влияния на растения *jin1*. Сделано заключение о том, что при солевом стрессе белок JIN1/MYC2 участвует в регуляции протекторных систем.

DOI: 10.7868/S0555109916020185

УДК 582.251.72:57.017.7:577.355.4

### НАКОПЛЕНИЕ $\alpha$ -ТОКОФЕРОЛА И $\beta$ -КАРОТИНА В КЛЕТКАХ *Euglena gracilis* ПРИ АВТОТРОФНОМ И МИКСОТРОФНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

© 2016 г. В. М. Мокросноп, А. В. Полищук, Е. К. Золотарёва

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, Киев, 01004

e-mail: membrana@ukr.net

Поступила в редакцию 03.08.2015 г.

Подобраны условия культивирования одноклеточной микроводоросли *Euglena gracilis*, при которых в клетках одновременно накапливались  $\alpha$ -токоферол и  $\beta$ -каротин. Клетки выращивали фотоавтотрофно и фотогетеротрофно с добавлением в среду 100 мМ этанола, или 40 мМ глутамата, или их смеси. Экзогенные субстраты стимулировали светозависимый рост *E. gracilis*. Наибольший прирост биомассы, который после 20 сут

оказался ~ в 7 раз выше по сравнению с автотрофным контролем, наблюдался при внесении в среду смеси этанола и глутамата. В миксотрофной культуре *E. gracilis* содержание  $\beta$ -каротина и хлорофилла в пересчете на клетку было в 2–3 и 1.6–2 раза, соответственно, выше по сравнению с контролем. В то же время накопление  $\alpha$ -токоферола в автотрофных клетках (контроль) превышало в 2–7 раз содержание этого антиоксиданта в клетках миксотрофных культур. Общий выход токоферолов в пересчете на единицу объема культуральной жидкости был наибольшим при добавлении в среду выращивания смеси этанола и глутамата. Изучена взаимосвязь между накоплением антиоксидантов и равновесной концентрацией кислорода в питательной среде, зависящей от интенсивностей фотосинтеза и дыхания.

DOI: 10.7868/S0555109916020100

УДК 579.61:579.62:547.917

### **АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ АЛКИЛИРОВАННЫХ И АЦИЛИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ХИТОЗАНА**

© 2016 г. Б. Ц. Шагдарова, А. В. Ильина, В. П. Варламов

*Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 119071*

*e-mail: varlamov@biengi.ac.ru*

Поступила в редакцию 04.09.2015 г.

Получен ряд алкилированных (кватернизированных) и ацилированных производных низкомолекулярного хитозана. Структура и состав соединений подтверждены данными ИК-, ПМР-спектроскопии и кондуктометрическим титрованием. Исследовано влияние ацильного заместителя и степени замещения N-(2-гидрокси-3-триметиламмоний)пропильным фрагментом по аминок группам при C2 атоме в звеньях биополимера на проявляемую антибактериальную активность в отношении типичных представителей грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов – *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*. Наибольшей активностью обладал N-[(2-гидрокси-3-триметиламмоний)пропил]хитозан хлорид максимально замещенный (98%). Минимальная ингибирующая концентрация производного в отношении *S. epidermidis* – 0.48 мкг/мл, *E. coli* – 3.90 мкг/мл.

DOI: 10.7868/S0555109916020148

УДК 543.544:547.913

### **СВЯЗЫВАНИЕ ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ПИЩЕВЫМИ БИОПОЛИМЕРАМИ**

© 2016 г. Т. А. Мишарина\*, \*\*, М. Б. Теренина\*, Н. И. Крикунова\*, И. Б. Медведева\*

*\*Институт биохимической физики им. Н.М. Эммануэля РАН, Москва, 119334*

*\*\*Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова, Москва, 117997*

*e-mail: tmish@rambler.ru*

Поступила в редакцию 09.07.2015 г.

Методом капиллярной газовой хроматографии исследовано влияние состава и строения различных пищевых биополимеров – полисахаридов, растительных волокон и животного белка желатина на связывание компонентов эфирных масел. Показано, что удерживание летучих органических соединений биополимерами зависело от структуры молекулы, от наличия, типа и расположения функциональной группы. В наибольшей степени

связывались неполярные терпеновые и сесквитерпеновые углеводороды, в наименьшей степени – спирты. Удерживание компонентов эфирных масел осуществлялось в основном за счет гидрофобных взаимодействий. Показано, что на связывание влияли состав и строение полимера, его физико-химическое состояние, наличие функциональных групп. Максимальное связывание неполярных соединений наблюдалось гуммиарабиком, полярных – гуаровой камедью. Найдено, что наименьшей сорбционной активностью по отношению ко всем классам исследованных соединений обладала камедь рожкового дерева.

DOI: 10.7868/S0555109916020112

УДК 577

## **ВЛИЯНИЕ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ НА КАТАЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ**

© 2016 г. А. В. Дубровский\*, Е. В. Мусин\*, \*\*, А. Л. Ким\*, \*\*, С. А. Тихоненко\*

*\*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Московская обл., г. Пущино, 142290*

*\*\*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991  
e-mail: tikhonenkosa@gmail.com*

Поступила в редакцию 17.09.2015 г.

Методами флуоресцентной и оптической спектроскопии исследовано взаимодействие алкогольдегидрогеназы (АДГ) с отрицательно заряженными полистиролсульфонатом (ПСС) и декстрансульфатом (ДС) и положительно заряженным полидиаллилдиметиламмонием (ПДАДМА). Установлено, что ДС и ПДАДМА не влияли на структурные и каталитические свойства фермента, ПСС за 1 ч инкубации незначительно снижал величину собственной флуоресценции белка, что связано с частичным разрушением его четвертичной структуры (глобулярности). Изучение активности АДГ в свободном состоянии и в присутствии ПСС показало, что она зависела как от времени инкубации, так и от влияния ПСС. Добавление в реакционную смесь хлорида натрия (2.0, 0.2 М) или сульфата аммония (0.1 М) не уменьшало разрушающего действия ПСС на четвертичную структуру белка. В то же время присутствие сульфата аммония или 0.2 М хлорида натрия стабилизировало фермент и частично снимало негативное влияние ПСС.

DOI: 10.7868/S0555109916020045