

УДК 577.150

ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ РЕАКЦИИ В ХИМИКОЭНЗИМАТИЧЕСКОМ СИНТЕЗЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ (ОБЗОР)

© 2016 г. А. М. Безбородов, Н. А. Загустина

Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский Центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва 119071
e-mail: zagust@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 25.11.2015 г.

В обзоре рассмотрены ферментативные реакции, используемые при химико-энзиматическом синтезе лекарственных препаратов. Представлены данные об оксидоредуктазах, в частности кеторедуктазе, имеющей наиболее широкое распространение в современных технологических процессах. Показаны реакции, катализируемые альфа- и омега-трансаминазами, липазами, нитрилгидролазой и альдолазой. Обсуждаются перспективы и возможности расширения сферы включения в реакции органического синтеза ферментов, полученных методами биоинженерии.

DOI: 10.7868/S055510991603003X

УДК 577.152.2

КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА D-АМИНОАЦИЛАЗЫ ШТАММА *Rhodococcus armeniensis* AM6.1

© 2016 г. А. А. Амбарцумян, А. В. Мхитарян, А. М. Палоян, С. А. Дадаян, А. С. Сагиян

НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА, Ереван 0056
e-mail: armbiotech@gmail.com; arthambardzumyan@gmail.com

Поступила в редакцию 16.11.2015 г.

Изучена субстратная специфичность бактериальной D-аминоацилазы бактерии штамма *Rhodococcus armeniensis* AM6.1. Показано, что при деацетилировании N-ацетил-аминокислот фермент обладал стереоспецифичностью по отношению к D-стереоизомерам, наиболее эффективно действуя на N-ацетил-D-метионин, ароматические и гидрофобные N-ацетил-аминокислоты, но слабо на основные N-ацетил-аминокислоты. N-ацетил-производные кислых и гидрофильных аминокислот практически не деацетилировались этой D-аминоацилазой. С применением линейного регрессионного анализа рассчитаны константы Михаэлиса (K_m) и максимальные скорости реакции (V_{max}) деацетилирования ферментом N-ацетил-D-метионина, N-ацетил-D-аланина, N-ацетил-D-фенил-аланина, N-ацетил-D-тирозина, N-ацетил-D-валина, N-ацетил-D-оксивалина и N-ацетил-D-лейцина. Показано, что субстраты N-ацетил-D-лейцин ($K_s = 35.5 \pm 28.3$ мМ) и N-ацетил-D,L-тирозин ($K_s = 15.8 \pm 4.5$ мМ) ингибировали активность D-аминоацилазы. Продукт реакции деацетилирования (уксусная кислота) конкурентно ингибировал фермент ($K_i = 104.7 \pm 21.7$ мМ, $K_m = 2.5 \pm 0.5$ мМ, $V_{max} = 25.1 \pm 1.5$ ед./мг).

DOI: 10.7868/S0555109916030028

УДК 579.222:577.15

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГОМО- И ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ РЕПОРТЕРНЫХ БЕЛКОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ АКТИВНОСТИ ПРОМОТОРОВ У *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z

© 2016 г. И. И. Мустахимов* ** , С. Ю. Бут* , А. С. Решетников* , В. Н. Хмеленина* ,
Ю. А. Троценко * **

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Пушкино
142290

**Пуцинский государственный естественно-научный институт, Пушкино 142290

e-mail: trotsenko@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 20.10.2015 г.

На основе плазмиды широкого круга хозяев рМНА200 сконструированы несколько векторов и проведено тестирование промоторов ряда ключевых генов в клетках галоалкалотолерантного метанотрофа *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z. Использование в качестве репортерного гена *gfp* оказалось неэффективным для обнаружения активности промоторных областей генов, кодирующих гексулозофосфатсинтазу, глутаминсинтазу и глюкокиназу или оперона *ectABC-ask*, кодирующего ферменты синтеза осмопротектора эктоина. Глюкокиназа этого метанотрофа и гетерологичный фермент хлорамфеникол-ацетилтрансфераза оказались белковыми маркерами, подходящими для оценки активности тестируемых промоторов. Клетки *M. alcaliphilum* 20Z экспрессировали хлорамфеникол-ацетилтрансферазу с промотора гена метанолдегидрогеназы на более высоком уровне по сравнению с экспрессией глюкокиназы, что, вероятно, обусловлено функционированием механизма, регулирующего уровень гомологичных белков. Введение в 5'-нетранслируемую область мРНК гена *glk* синтетической нуклеотидной последовательности, образующей вторичную структуру, приводило к увеличению активности глюкокиназы.

DOI: 10.7868/S0555109916030156

УДК 579.22:57.017.3:577.2.04

ДЕЙСТВИЕ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ КИСЛОРОДА И АЗОТА НА *lux*-БИОСЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ *Escherichia coli* И *Salmonella typhimurium*

© 2016 г. Д. Н. Каримова* , И. В. Манухов** , *** , Е. Ю. Гнучих** , И. Ф. Каримов* , Д.
Г. Дерябин****

*Оренбургский государственный университет, Оренбург 460018

**Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции
промышленных микроорганизмов, Москва 117545

***Московский физико-технический институт (МФТИ), Московская обл., Долгопрудный
141700

****Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии, Москва
107076

e-mail: dgderyabin@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.08.2015 г.

Изучено действие активных форм кислорода и азота на *lux*-биосенсоры, сконструированные на основе родительских штаммов *Escherichia coli* K12 MG1655 и *Salmonella typhimurium* LT2. Биоактивность экзогенных свободных радикалов в отношении конститутивно люминесцирующего штамма *E. coli* с плазмидой *pXen7* убывала в ряду $H_2O_2 > OCl^- > NO^\bullet > ROO^\bullet > ONOO^- > O_2^-$, в то время как у трансформированного этой же плазмидой штамма *S. typhimurium* биолюминесценция

снижалась в ряду $\text{NO}^{\bullet} > \text{H}_2\text{O}_2 > \text{ONOO}^- > \text{ROO}^{\bullet} > \text{OCI}^- > \text{O}_2^-$. Показан перекрестный характер ответа индуцируемых *lux*-биосенсоров на активные формы кислорода и азота, пороговая чувствительность и амплитуда которого зависели как от характеристик плазмид, так и природы хозяйского штамма. Биосенсоры с плазмидой *pSoxS':::lux* характеризовались наиболее широким спектром чувствительности, наряду с O_2^- и NO^{\bullet} включающим H_2O_2 и OCI^- . Среди использованных активных форм кислорода и азота наивысшей активирующей способностью обладал H_2O_2 , обуславливающий индукцию плазмид *pKatG':::lux*, *pSoxS':::lux* и *pRecA':::lux*. Индуцибельные *lux*-биосенсоры на основе *S. typhimurium* характеризовались более высокой чувствительностью к активным формам кислорода и азота по сравнению с биосенсорами на основе *E. coli*.

DOI: 10.7868/S0555109916030077

UDC 577.154.3:576.80

CLONING, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A CELLULASE-FREE XYLANASE FROM *Geobacillus thermodenitrificans* AK53

© 2016 M. Irfan^a, H. I. Guler^b, A. O. Belduz^c, A. A. Shah^a, S. Canakci^c

^aDepartment of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Quaid I Azam University, Islamabad, Pakistan

^bDepartment Department of Molecular Biology and Genetic, Faculty of Sciences, Karadeniz Technical University, 61080 Trabzon, Turkey

^cDepartment of Biology, Faculty of Sciences, Karadeniz Technical University, 61080 Trabzon, Turkey

e-mail: belduz@ktu.edu.tr

Received October 26, 2015

Geobacillus thermodenitrificans AK53 *xyl* gene encoding xylanase was isolated, cloned and expressed in *Escherichia coli*. After purifying recombinant xylanase from *G. thermodenitrificans* AK53 (GthAK53Xyl) to homogeneity by ammonium sulfate precipitation and ion exchange chromatography, biochemical properties of the enzyme were determined. The kinetic studies for GthAK53Xyl showed K_M value to be 4.34 mg/mL (for D-xylose) and V_{max} value to be 2028.9 $\mu\text{moles mg}^{-1} \text{min}^{-1}$. The optimal temperature and pH for enzyme activity were found out to be 70°C and 5.0, respectively. The expressed protein showed the highest sequence similarity with the xylanases of *G. thermodenitrificans* JK1 (JN209933) and *G. thermodenitrificans* T-2 (EU599644). Metal cations Mg^{2+} and Mn^{2+} were found to be required for the enzyme activity, however, Co^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{2+} and Cu^{2+} ions caused inhibitor effect on it. GthAK53Xyl had no cellulolytic activity and degraded xylan in an endo-fashion. The action of the enzyme on xylan from oat spelt produced xylobiose and xylopentose. The reported results are suggestive of a xylanase exhibiting desirable kinetics, stability parameters and metal resistance required for the efficient production of xylobiose at industrial scale.

DOI: 10.7868/S0555109916030065

УДК 581.1:633.358:577.13

**ВЛИЯНИЕ N-ФЕНИЛ-2-НАФТИЛАМИНА НА АКТИВНОСТЬ КОМПОНЕНТОВ
АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНОЙ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ И ВИРУЛЕНТНОСТЬ
БАКТЕРИАЛЬНЫХ ФИТОПАТОГЕНОВ И МУТУАЛИСТОВ РАСТЕНИЙ**

© 2016 г. Л. А. Ломоватская, Л. Е. Макарова, О. В. Кузакова, А. С. Романенко, А. М. Гончарова

Сибирский институт физиологии и биохимии растений Иркутского научного центра СО
РАН, Иркутск 664033
e-mail: LidaL@sifibr.irk.ru

Поступила в редакцию 26.10.2015 г.

Изучено влияние N-фенил-2-нафтиламина, негативного аллелопатического соединения, выделенного из экссудатов корней гороха (*Pisum sativum* L.), на рост, активность аденилатциклазной сигнальной системы и факторов вирулентности (эндогенных целлюлазы и пектиназы) бактерий *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* и *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*. Показано, что при физиологических концентрациях N-фенил-2-нафтиламин неспецифически подавлял рост этих бактерий, как в планктонной культуре, так и в биопленках. Одной из причин этого является снижение содержания внутри- и внеклеточного цАМФ, вследствие более сильной активации растворимой формы фосфодиэстеразы, разрушающей цАМФ, по сравнению с растворимой аденилатциклазой, его синтезирующей. При этом N-фенил-2-нафтиламин не оказывал влияния на активность, как мембранной аденилатциклазы, так и факторов вирулентности бактерий.

DOI: 10.7868/S0555109916030107

УДК 576.858.9

**ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ НА ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНОК
ШТАММАМИ *Pseudomonas aeruginosa***

© 2016 г. Т. Г. Габисония*, М. Ж. Лоладзе*, М. М. Надирадзе*, Н. К. Чахунашвили*,
М. Г. Алибегашвили*, Н. Г. Тамарашвили***, В. А. Пушкина**

*Институт бактериофагии, микробиологии и вирусологии им. Г. Элиава, Тбилиси 0160,
Грузия

**Украинский научно-исследовательский противочумный институт им. И.И. Мечникова,
Одесса 65082, Украина

***Тбилисский государственный университет им. И. Джавахишвили, Тбилиси 0179,
Грузия

e-mail: ntarashvili@gmail.com

Поступила в редакцию 27.11.2015 г.

Изучено влияния двух бактериофагов *Pseudomonas aeruginosa* vB-Pa 4 и vB-Pa 5 на формирование и развитие биопленок 6 полирезистентных госпитальных штаммов *P. aeruginosa*. Предварительное внесение бактериофагов препятствовало формированию полноценных биопленок или практически полностью предотвращало их рост. Добавление фагов к уже сформированным биопленкам приводило к их частичной или полной деструкции. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения выделенных бактериофагов *P. aeruginosa* для деструкции биопленок и предупреждения их образования.

DOI: 10.7868/S0555109916030041

УДК 579.69

ПОЛУЧЕНИЕ ПРОТОПЛАСТОВ ГРИБА *Trametes hirsuta* 072 И ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ АНТИОКСИДАНТОВ НА ИХ ФОРМИРОВАНИЕ И РЕГЕНЕРАЦИЮ

© 2016 г. О. В. Мосунова, Д. В. Васина, Т. В. Тяжелова, Е. О. Ландесман, О. В. Королёва

Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва 119071
e-mail: koroleva@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 25.11.2015 г.

Для получения протопластов из базидиального гриба *Trametes hirsuta* необходимо последовательное использование гомогенизации и ферментативной обработки. Максимальный выход протопластов ($\sim 2.5 \times 10^7$ /мл) достигался при использовании мицелия в экспоненциальной фазе роста (60 ч), максимальная стабильность наблюдалась в MES⁺ буфере в течение 4 ч инкубации, снижение титра при этом составило 5–7%. Исследования влияния антиоксидантов с различной антиоксидантной емкостью, выраженной в мМоль эквивалентов тролокса (аскорбат – 0.99, α -токоферол – 1.0, β -каротин – 2.14, кверцетин – 3.98) показало, что выход протопластов увеличивался в присутствии β -каротина и кверцетина на 18–24%. Исследованные антиоксиданты не оказывали влияния на стабильность протопластов. Степень регенерации протопластов коррелировала с антиоксидантной емкостью исследованных антиоксидантов и была максимальной в присутствии β -каротина и кверцетина (0.4%), в присутствии MES⁺ – 0.1%. Скорость роста протопластов была в 2 раза выше в присутствии β -каротина и кверцетина.

DOI: 10.7868/S0555109916030144

УДК 547.92

ПОИСК МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ С НАПРАВЛЕННОЙ ГИДРОКСИЛАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ДЛЯ СИНТЕЗА СТЕРОИДНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

© 2016 г. Н. В. Карпова*, В. А. Андрияшина*, Т. С. Стыщенко*, А. В. Дружинина*, Т. Д. Феофанова **, А. В. Кураков**

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

**Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва 119991
e-mail: andryushina@rambler.ru

Поступила в редакцию 20.10.2015 г.

Охарактеризована гидроксилазная активность новых штаммов *Curvularia lunata*, *C. geniculata*, *C. eragrostidis*, *C. prasadii*, *Ulocladium botrytis*, *Alternaria tenuis* и *Fusarium oxysporum* на трех стероидных субстратах – андростендионе (АД), кортексолоне (S) и ацетате дегидроэпиандростерона (АДА). Впервые показана 9 α -гидроксилазная активность клеток *C. lunata* 1011 в отношении кортексолон (S) с образованием 9 α -гидрокси-S. Обнаружено, что штаммы *C. geniculata* 837 и *F. oxysporum* 11dn1, способны к гидроксилированию с образованием фармакологически перспективных 7 α -гидрокси-стероидов. Клетки *C. geniculata* 837 селективно гидроксилировали АД в 7 α -гидрокситестостерон, а *F. oxysporum* 11dn1 осуществляли трансформацию АДА в 7 α -гидроксидегидроэпиандростерон.

DOI: 10.7868/S0555109916030089

УДК 579:582.26

ПРОДУКЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КУЛЬТУРЫ *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ НА СРЕДЕ С ИСКУССТВЕННОЙ МОРСКОЙ ВОДОЙ

© 2016 г. А. С. Лелеков*, Р. Г. Геворгиз**, Я. Д. Жондарева**

*Севастопольский государственный университет, Севастополь 299053

**Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН,
Севастополь 299011

e-mails: a.lelekov@yandex.ru; r-gevorgiz@yandex.ru; janochka-kerch@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.10.2015 г.

Исследован рост морской диатомовой водоросли *Phaeodactylum tricornutum* на среде, приготовленной на искусственной морской воде, в условиях искусственного и естественного освещения. В лабораторных условиях при искусственном освещении максимальная удельная скорость роста была 0.7 сут⁻¹, продуктивность – 0.8 г/л · сут, максимальная биомасса – 3.86 г/л. При естественном освещении в открытом фотобиореакторе (бассейн) в условиях Крыма максимальная продуктивность *P. tricornutum* составила 6 г/м² · сут. Полученные результаты по выращиванию *P. tricornutum* в бассейнах в условиях естественного освещения на искусственной морской воде могут послужить основой для разработки технологии промышленного культивирования водоросли.

DOI: 10.7868/S0555109916030090

УДК 543.544:547.913

ИНГИБИРОВАНИЕ ОКИСЛЕНИЯ МЕТИЛОВЫХ ЭФИРОВ НЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ЭФИРНЫМИ МАСЛАМИ

© 2016 г. Т. А. Мишарина, Е. С. Алинкина, А. К. Воробьёва, М. Б. Теренина, Н. И. Крикунова

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва 119334

e-mail: tmish@rambler.ru

Поступила в редакцию 25.11.2015 г.

Исследовано ингибирование автоокисления метиловых эфиров полиненасыщенных жирных кислот, выделенных из льняного масла, эфирными маслами 16 различных пряно-ароматических растений. Оценка антиоксидантной эффективности эфирных масел (ЭМ) проведена по содержанию метилолеата, метиллинолеата и метиллиноленоата через 1, 2 и 4 мес автоокисления. Через 4 мес в модельной системе окислялось 92% метиллиноленоата и 79% линолеата. Найдено, что самыми эффективными антиоксидантами были эфирные масла гвоздики, листьев корицы и орегано, они ингибировали автоокисление эфиров линоленовой кислоты на 60–82%, линолевой – на 76–85%. Антиоксидантные свойства этих ЭМ обеспечивали фенолы – эвгенол, карвакрол и тимол. ЭМ кориандра не содержало фенолов, при этом оно ингибировало окисление метиллиноленоата на 38%. Эффективность ингибирования окисления метиловых эфиров ненасыщенных кислот ЭМ тимьяна, чабера, мациса, лимона и чайного дерева составляла 15–24%, остальные ЭМ после 4 мес в этой системе не проявили антиоксидантных свойств.

DOI: 10.7868/S0555109916030120

УДК 577.112.7

БИОРЕГУЛЯТОР ИЗ ТКАНИ ПЕЧЕНИ КРЫС

© 2016 г. Д. И. Мальцев*, В. П. Ямскова**, А. П. Ильина*, Б. Б. Березин*, И. А. Ямсков*

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

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

e-mails: mal-dima@yandex.ru; yamskova-vp@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.06.2015 г.

Показано, что в состав мембранотропного гомеостатического тканеспецифического биорегулятора, выделенного из ткани печени крыс, входит наноразмерный пептидо-белковый комплекс, состоящий из низкомолекулярных пептидов с молекулярной массой от 1 до 6.5 кДа и белка, относящегося к семейству сывороточных альбуминов, который модулировал биологическую активность пептидов и определял тканевую специфичность.

DOI: 10.7868/S0555109916030119