

ПЕРОКСИНИТРИТ: ТОКСИЧЕСКИЙ АГЕНТ И СИГНАЛЬНАЯ МОЛЕКУЛА (ОБЗОР)

Ю. В. Абаленихина¹, О. В. Космачевская², А. Ф. Топунов^{2,*}

¹ Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова
390026 Рязань, Россия

² Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук
119071 Москва, Россия

* E-mail: aftopunov@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.05.2020

После доработки 10.06.2020

Принята к публикации 02.07.2020

Аннотация

Активная форма азота – пероксинитрит, является одним из самых сильных окислителей в организме. В зависимости от условий он либо подвергается биотрансформации и детоксикации, либо взаимодействует с различными соединениями (белки, в том числе ферменты, липиды, нуклеиновые кислоты, углеводы), модифицируя их. Наиболее активно подвергаются воздействию тиолы, включая остатки цистеина в белках. Ингибирующее действие пероксинитрита на ферменты в наибольшей степени было описано для оксидоредуктаз, в которых он также чаще всего действовал на цистеин. Модифицированные биомолекулы могут быть токсичны, однако в физиологических концентрациях они способны функционировать как участники сигнальных путей. Описанные данные показывают, что пероксинитрит является не только токсическим агентом, но и компонентом системы мессенджеров и сигнальной молекулой, ответственной за окислительно-восстановительную регуляцию клеточного метаболизма. Важными аспектами его изучения являются пути детоксикации, что может способствовать поиску лекарственных препаратов против заболеваний, сопровождаемых нитрозативным стрессом.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пероксинитрит, пероксинитрозная кислота, оксид азота, цистеин, токсическое действие, сигнальная функция
DOI: 10.31857/S0555109920060021

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ ОТ ВИРУСОВ: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ (ОБЗОР)

И. В. Максимов^{1,}, А. В. Сорокань¹, М. Ю. Шеин¹, Р. М. Хайруллин¹*

¹ Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение
Уфимского федерального исследовательского центра РАН
450054 Уфа, Россия

* E-mail: igor.mak2011@yandex.ru

Поступила в редакцию 31.03.2020

После доработки 24.05.2020

Принята к публикации 02.07.2020

Аннотация

Вирусные заболевания вызывают значительные потери урожая и заметное ухудшение качества сельскохозяйственной продукции. В настоящее время не существует методов защиты растений от циркулирующих в агроэкосистемах вирусов непосредственно какими-либо противовирусными препаратами, а меры борьбы сводятся к селекции устойчивых сортов, оздоровлению культивированием верхушечных меристем, а также к контролю численности насекомых-переносчиков. В обзоре описываются современные подходы в защите растений от вирусных заболеваний редактированием генома, регуляцией экспрессии генов растения-хозяина и/или вируса методами РНК-интерференции и формирования искусственного консорциума растений с ризосферными и/или эндофитными микроорганизмами, обладающими комплексной защитной активностью и иммуномодулирующим потенциалом.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: вирусы, стимулирующие рост растений
микроорганизмы, противовирусная активность, РНКазы, системная
устойчивость растений, биопрепараты
DOI: 10.31857/S0555109920060100

ВОЗМОЖНОСТИ ЭКСПРЕССИОННОЙ СИСТЕМЫ ГРИБА *PENICILLIUM VERRUCULOSUM* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОДУЦЕНТОВ ФЕРМЕНТОВ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ЭФФЕКТИВНУЮ ДЕСТРУКЦИЮ ВОЗОБНОВЛЯЕМОЙ РАСТИТЕЛЬНОЙ БИОМАССЫ (ОБЗОР)

А. П. Синицын^{1,2}, О. А. Синицына², И. Н. Зоров^{1,2}, А. М. Рожкова^{1,2,*}

¹ Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук
119071 Москва, Россия

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
химический факультет
119991 Москва, Россия

* E-mail: amrojkoval@yahoo.com

Поступила в редакцию 24.04.2020

После доработки 11.06.2020

Принята к публикации 02.07.2020

Аннотация

В обзоре систематизированы данные по использованию реципиентного штамма *Penicillium verruculosum* В1-537 (Δ niaD) для получения продуцентов, ферментов, вспомогательных по отношению к базовому целлюлазному комплексу, увеличивающих его эффективность – β -глюкозидазы, полисахаридмонооксигеназы, а также ксиланаз. Особенностью штамма *P. verruculosum* является секреция базового комплекса целлюлаз, состоящего из целлобιοгидролаз и эндоглюканаз, которые по своей гидролитической способности превосходят наиболее широко используемые в лабораторной и промышленной практике штаммы *Hypocrea (Trichoderma)*. Использование возможностей экспрессионной системы *P. verruculosum* В1-537 (Δ niaD) позволяет вводить в состав базового комплекса целлюлаз новые ферменты, необходимые для увеличения его общей гидролитической активности, и создавать ферментные препараты адаптированные для конверсии различных видов возобновляемой растительной биомассы (ВРБ). Использование экспрессионной системы на основе гриба *P. verruculosum* позволило увеличить способность базового целлюлазного комплекса к конверсии различных видов ВРБ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: экспрессионная система, целлюлазы, гемицеллюлазы, возобновляемая растительная биомасса, *Penicillium verruculosum*
DOI: 10.31857/S0555109920060161

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМОЗИНА МАРАЛА (*CERVUS ELAPHUS SIBIRICUS SEVERTZOV*) В ПРОКАРИОТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ И ИЗУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСА ЕГО БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ, ВАЖНЫХ ДЛЯ СЫРОДЕЛИЯ

С. В. Беленькая^{1,2}, Д. Н. Щербаков^{1,3}, Д. В. Балабова³, А. Н. Белов⁴, А. Д. Коваль⁴, В. В. Ельчанинов^{4,*}

¹ ГНЦ вирусологии и биотехнологии “Вектор”
630559 Кольцово, Россия

² Новосибирский государственный университет
630090 Новосибирск, Россия

³ Алтайский государственный университет
656049 Барнаул, Россия

⁴ Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, Сибирский
НИИ сыроделия
656016 Барнаул, Россия

* E-mail: ve3636@yandex.ru

Поступила в редакцию 15.05.2020

После доработки 11.06.2020

Принята к публикации 02.07.2020

Аннотация

В системе экспрессии *Escherichia coli* (штамм SHaffle express) получен рекомбинантный химозин марала и изучены его биохимические свойства, важные для сыроделия. Наибольшее содержание в тельцах включения рекомбинантного прохимозина марала наблюдалось при культивировании продуцента в течение 6 ч при 25°C с момента внесения индуктора – 10 мМ изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид. Биохимические свойства полученного фермента сравнивали со свойствами рекомбинантных химозинов коровы и одногорбого верблюда. Показано, что общая протеолитическая активность рекомбинантного химозина марала была сопоставима с активностью фермента коровы, но примерно в 3.8 раза превышала активность фермента одногорбого верблюда. Термостабильность рекомбинантного химозина марала оказалась на 5–10°C выше, чем у химозинов коровы и одногорбого верблюда. Зависимость коагуляционной активности фермента марала от pH и концентрации хлорида кальция в коровьем молоке соответствовала требованиям сыроделия. Высокая протеолитическая активность и термостабильность ограничивают сферу применения

рекомбинантного химозина марала выработкой сыров с короткими сроками созревания и хранения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рекомбинантный химозин марала, молокосвертывающая активность, протеолитическая активность, термостабильность, рН, концентрация хлорида кальция, сыроделие
DOI: 10.31857/S0555109920060033

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМОЗИНА В МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖАХ *KOMAGATAELLA PHAFFII*

С. Ю. Филькин¹, Н. В. Чертова¹, Е. А. Вавилова¹, С. С. Зацепин¹, М. А. Эльдаров², Э. Г. Садыхов¹, А. Н. Фёдоров¹, А. В. Липкин^{1,*}

¹ Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук
119071 Москва, Россия

² Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук
117312 Москва, Россия

* E-mail: lipus57@yahoo.com

Поступила в редакцию 15.05.2020

После доработки 30.06.2020

Принята к публикации 02.07.2020

Аннотация

Получен эффективный рекомбинантный штамм *Komagataella phaffii*, с высоким выходом продуцирующий прохимозин *Bos taurus*. Разработан метод выделения и очистки рекомбинантного химозина, включающий двухстадийную очистку методами ионнообменной и гидрофобной хроматографии. Получен препарат высокоочищенного (~90%) рекомбинантного химозина с концентрацией 4 мг/мл (1000 ИМСУ/мл) с выходом 62%. Разработанная методика может быть использована при промышленном производстве фермента.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: химозин, метилотрофные дрожжи, *Pichia pastoris*, *Komagataella phaffii*
DOI: 10.31857/S0555109920060057

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИРОДЫ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ НУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗ ИЗ ПРОКАРИОТ

Н. Н. Мордкович¹, А. Н. Антипов¹, Н. А. Огорокова¹, Т. Н. Сафонова¹, К. М. Поляков², В. П. Вейко^{1,*}

¹ Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук
11907 Москва, Россия

² Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук
119991 Москва, Россия

* E-mail: vladveiko@yahoo.com

Поступила в редакцию 09.06.2020

После доработки 26.06.2020

Принята к публикации 02.07.2020

Аннотация

На основе клеток *Escherichia coli* сконструирована библиотека штаммов-продуцентов рекомбинантных нуклеозидфосфорилаз (NP), их мутантных и гибридных форм из различных мезофильных и экстремофильных микроорганизмов. Показано, что субстраты стабилизируют структуру NP при воздействии температуры, при этом именно неорганический фосфат-ион является решающим в этом процессе. С использованием биоинформатических методов анализа сделано предположение, что N-концевая структура белков во многом определяет термостабильность NP. Сконструирован гибридный белок тимидинфосфорилазы (TRP) из *E. coli*, в котором N-концевой фрагмент (1-62 а. о.) заменен на соответствующий фрагмент TRP из термофильной бактерии *Geobacillus stearothermophilus*, показано, что термостабильность полученной гибридной формы TRP повысилась. В первичной структуре уридинфосфорилазы (UDP) из *E. coli* выявлена высококонсервативная аминокислотная последовательность 25-Pro-Gly-Asp-Pro-30 для этих ферментов из мезофильных микроорганизмов. Сконструирована мутантная форма (Asp27Gly) UDP из *E. coli*, которая также характеризовалась повышенной термостабильностью по сравнению с исходной формой. Сделано предположение, что именно архитектура строения фосфат-связывающего сайта у UDP и особенности его функционирования, имеют решающее значение в придании этому ферменту термостабильности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нуклеозидфосфорилаза, сайт-направленный мутагенез, термостабильность
DOI: 10.31857/S0555109920060124

ОДНОСТАДИЙНАЯ ОЧИСТКА CRISPR-НУКЛЕАЗЫ CAS13A МЕТОДОМ МЕТАЛЛ-ХЕЛАТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ПОСЛЕ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ ЭКСПРЕССИИ С СОХРАНЕНИЕМ КОЛЛАТЕРАЛЬНОЙ РИБОНУКЛЕАЗНОЙ АКТИВНОСТИ

Л. К. Курбатов^{1,*}, С. П. Радько^{1,**}, С. В. Кравченко², О. И. Киселёва¹, Н. Д. Дурманов², А. В. Лисица^{1,2}

¹ Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича
119121 Москва, Россия

² Тюменский государственный университет, Западно-Сибирский межрегиональный научно-образовательный центр
625003 Тюмень, Россия

* E-mail: kurbatov1@mail.ru

** E-mail: radkos@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.04.2020

После доработки 24.06.2020

Принята к публикации 02.07.2020

Аннотация

CRISPR/Cas13a-нуклеаза рассматривается сегодня как основа для создания нового поколения биосенсоров для ультрачувствительной, в том числе полевой детекции бактериальных и вирусных патогенов. Получена рекомбинантная Cas13a-нуклеаза с функциональной активностью в результате гетерологической экспрессии в *E. coli* с помощью простой одностадийной очистки металл-хелатной хроматографией с использованием N-концевой полигистидиновой метки. Упрощение процедуры очистки Cas13a-нуклеазы расширяет возможности разработки и практического использования диагностических биосенсорных систем на её основе. Масс-спектрометрическая идентификация показала, что неохарактеризованный ранее белок U2PWF1 *Leptotrichia wadei* является Cas13a-нуклеазой.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: CRISPR-Cas, рибонуклеаза Cas13a, очистка, металл-хелатная хроматография, коллатеральная активность

DOI: 10.31857/S0555109920060070

ПРЕПАРАТИВНАЯ ОЧИСТКА БАКТЕРИОФАГОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* КОМБИНАЦИЕЙ ГЕЛЬ-ПРОНИКАЮЩЕЙ И АНИОНООБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Н. Н. Ландышев¹, Я. Г. Воронько¹, Е. Е. Куликов², Н. Н. Сыкилинда³, К. А. Мирошников^{3,*}

¹ Российский университет дружбы народов, Медицинский институт
117198 Москва, Россия

² Институт микробиологии им. Виноградского ФИЦ “Биотехнологии” РАН
117312 Москва, Россия

³ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
117997 Москва, Россия

* E-mail: kmi@ibch.ru

Поступила в редакцию 15.06.2020

После доработки 30.06.2020

Принята к публикации 02.07.2020

Аннотация

Разработана и описана схема очистки бактериофагов *Pseudomonas aeruginosa*, состоящая из последовательных этапов гель-фильтрационной и анионообменной хроматографии. Испытание схемы на пяти фагах различных размеров и морфологии показало одинаковые результаты, что позволяет рассматривать предложенный подход как универсальный и хорошо масштабируемый.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: бактериофаги, *Pseudomonas aeruginosa*, анионообменная хроматография, стекло с контролируемым размером пор
DOI: 10.31857/S0555109920060094

**БИОСИНТЕЗ ТАКРОЛИМУСА
ШТАММОМ *STREPTOMYCES TSUKUBENSIS* ВКМ АС-2618Д В
ПРИСУТСТВИИ ПОЛИМЕРНЫХ СОРБЕНТОВ И РАЗРАБОТКА
МЕТОДА ЕГО ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ**

Д. С. Салионов^{1,2}, В. Ю. Пошихонцева^{3,4}, В. В. Фокина^{3,4,*}, А. А. Шутов^{3,4}, В. М. Николаева^{3,4}, Г. Г. Васяров², Е. В. Титова², В. С. Карасев², С. М. Староверов^{1,2}, М. В. Донова^{3,4}

¹ Химический факультет, Московский Государственный университет имени М. В. Ломоносова
119234 Москва, Россия

² АО “БиоХимМак СТ”
119234 Москва, Россия

³ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, ФИЦ “Пушкинский научный центр биологических исследований РАН”
142290 Московская обл., Пушкино, Россия

⁴ ООО “Фарминс”
142290 Московская обл., Пушкино, Россия

* E-mail: fokina@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 14.05.2020

После доработки 14.06.2020

Принята к публикации 02.07.2020

Аннотация

Такролимус, признанный мировой медициной как наиболее эффективный иммуносупрессивный агент, синтезируется актинобактериями рода *Streptomyces*, однако процесс сопровождается нежелательным образованием близких структурных аналогов. Разработан оригинальный метод его биосинтеза штаммом актинобактерий *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д с применением бромированного стирол-дивинилбензолного сорбента SP-207. Этот подход позволил предотвратить нежелательную деструкцию такролимуса, упростить процедуру его выделения из культуральной среды и повысить его выход. Оптимизирована стадия предварительной очистки за счет использования регенерируемых сорбентов на основе метилметакрилата (HP2MG) и химически модифицированного силикагеля (Диасорб-100-Диол). При реализации технологического процесса применение сорбентов с привитыми к силикагелю сульфогруппами и ионами серебра при конечной очистке такролимуса позволило значительно увеличить производительность данной стадии. При этом выход такролимуса-сырца

составил 60–70%. Полученные результаты могут быть использованы при создании полного цикла производства фармацевтической субстанции такролимуса.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: биосинтез, такролимус, *Streptomyces tsukubensis*, сорбент SP-207, хроматография, выделение, очистка, аскомицин, 8-пропил-аналог такролимуса

DOI: 10.31857/S055510992006015X

ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОПОРАЦИИ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ И АДГЕЗИЮ К *n*-ГЕКСАДЕКАНУ КЛЕТОК *RHODOCOCCLUS RUBER* ИЭГМ 231

М. С. Куюкина^{1,2,*}, А. М. Варушкина^{1,2}, И. Б. Ившина^{1,2}

¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов, Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН
614081 Пермь, Россия

² Пермский государственный национальный исследовательский университет
614990 Пермь, Россия

* E-mail: kuyukina@iegm.ru

Поступила в редакцию 30.04.2020

После доработки 12.06.2020

Принята к публикации 02.07.2020

Аннотация

Изучено влияние электропорации на жизнеспособность, чувствительность к антибиотикам и адгезивную активность по отношению к *n*-гексадекану клеток *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231. Установлено, что после электропорации при напряжении 9 и 12.5 кВ/см жизнеспособность родококков снижалась на 85–96%, а их чувствительность к бензилпенициллину, гентамицину, клотримазолу, неомицину и цефазолину повышалась на 8–46%. При этом динамика повышения чувствительности зависела от природы антибиотика и времени восстановления клеток после электропорации. Наиболее высокая антибиотикочувствительность, коррелирующая с повышением степени адгезии к углеводороду, была зарегистрирована для электропорированных клеток после 24-часового периода восстановления, соответствующего переходу культуры в стационарную фазу роста. Отмечено появление

спонтанных мутантов *R. ruber* ИЭГМ 231, устойчивых к воздействию 200 мкг/мл канамицина и характеризующихся пониженной гидрофобностью клеточной стенки. Полученные результаты могут быть использованы при подборе оптимального режима электротрансформации родококков, в частности, повышения выживаемости клеток и сокращения периода их восстановления после электропорации, а также снижения концентрации антибиотика в селективной среде для эффективного отбора рекомбинантных клонов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: актинобактерии, *Rhodococcus*, электропорация, антибиотикочувствительность, гидрофобность, клеточная адгезия
DOI: 10.31857/S0555109920060082

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДВУХФАЗНОГО АНАЭРОБНОГО СБРАЖИВАНИЯ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ОРГАНИЧЕСКОЙ ФРАКЦИИ ТВЕРДЫХ КОММУНАЛЬНЫХ ОТХОДОВ, ПРЕДОБРАБОТАННЫХ В АППАРАТЕ ВИХРЕВОГО СЛОЯ

Э. Р. Михеева¹, И. В. Катраева², Д. Л. Ворожцов¹, Ю. В. Литти^{3,*}, А. Н. Ножевникова³

¹ Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского
603950 Н. Новгород, Россия

² Нижегородский государственный архитектурно-строительный университет
603950 Н. Новгород, Россия

³ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”
Российской академии наук
119071 Москва, Россия

* E-mail: litty-yuriy@mail.ru

Поступила в редакцию 20.03.2020

После доработки 19.06.2020

Принята к публикации 02.07.2020

Аннотация

Предварительная обработка органической фракции твердых коммунальных отходов (ОФ-ТКО) – необходимая стадия процесса для ускорения анаэробного сбраживания, которая позволяет избежать быстрого закисления и ингибирования метаногенеза. Впервые показано влияние предобработки в аппарате вихревого слоя (АВС) на физико-химические свойства и характеристики анаэробного термофильного двухфазного сбраживания ОФ-ТКО. Предобработка в АВС приводила к снижению содержания жира, увеличению рН, небольшому увеличению содержанию белка в расчете на сухое вещество, изменению плотности и содержания сухих веществ. Обработка ОФ-ТКО в АВС в течение 2 мин позволяла увеличить удельный выход биогаза и метана на 11.6 и 15.8% соответственно.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: органическая фракция твердых коммунальных отходов, аппарат вихревого слоя, предварительная обработка, двухфазная анаэробная ферментация, термофильный процесс, биогаз

DOI: 10.31857/S0555109920060112