

УДК 577.3

ТВЕРДОФАЗНОЕ И ПОВЕРХНОСТНО-МЕМБРАННОЕ ЖИДКОСТНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРОМИЦЕТОВ, ОСОБЕННОСТИ ИХ РАЗВИТИЯ И ОБРАЗОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ (ОБЗОР)

© 2014 г. А. А. Осмоловский*, Н. А. Баранова*, В. Г. Крейер*, А. В. Кураков*, Н. С. Егоров**

* Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991

** Международный биотехнологический центр Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991

e-mail: aosmol@mail.ru

Поступила в редакцию 25.10.2013 г.

Рассмотрены особенности развития микромицетов и биосинтеза ими ферментов, а также условия, обеспечивающие увеличение секреции ферментов микроскопическими грибами при твердофазном (на природных субстратах и инертных носителях) и поверхностно-мембранном жидкостном способах культивирования. Обсуждаются перспективы и преимущества таких способов культивирования микромицетов в сравнении с глубинными условиями с целью получения внеклеточных ферментов.

DOI: 10.7868/S055510991403026X

УДК 577.1+579.8

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ЛЕКТИНЫ САПРОФИТНЫХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ РОДА *Bacillus* (ОБЗОР)

© 2014 г. В. С. Подгорский*, Э. А. Коваленко*, И. С. Карпова**, Е. В. Сашук*, Е. И. Гетьман*

* Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев, 03680

e-mail: kovalenko@serv.imv.kiev.ua

**Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, 03680 Киев

Поступила в редакцию 20.09.2013 г.

Рассмотрены собственные и имеющиеся в литературе данные о синтезе и свойствах внеклеточных сиалоспецифичных лектинов сапрофитных бактерий рода *Bacillus*. Показано, что представители этого рода бацилл, выделенные из разных экологических ниш, обладают различной способностью к синтезу лектинов. Установлены двухфазный характер синтеза лектинов в среде роста и зависимость образования лектинов от условий культивирования. Охарактеризованы преимущества технологической схемы выделения и очистки данных биополимеров. Особое внимание уделено редко встречающейся углеводной специфичности бациллярных лектинов к сиаловым кислотам, как основе широкого спектра их биологической активности. Высказано предположение, что для выживания в постоянно изменяющихся условиях внешней среды сапрофитные бациллы выработали адаптивные механизмы с участием углеводузнающих белков — лектинов.

DOI: 10.7868/S0555109914030283

УДК 577.213.3

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ РЕПАРАЦИИ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ КАЧЕСТВА ДНК-МАТРИЦ ПРИ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ ДЕГРАДИРОВАННОЙ ДНК

© 2014 г. А. П. Довгерд***, Д. О. Жарков*****

* Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, 630090

**ООО "СибАкадемТехнологии", Новосибирск, 630090

***Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, 630090

e-mail: dzharkov@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 25.10.2013 г.

Повреждение ДНК-матриц представляет собой проблему при ПЦР-амплификации сильно деградированных образцов, которые включают древние ДНК, объекты судебно-экспертной практики и пищевые продукты глубокой переработки. Живые организмы обладают набором ферментов репарации, исправляющих повреждения в ДНК. В работе созданы и охарактеризованы модельные системы деградированной высокомолекулярной ДНК с преобладанием различных типов повреждений. Показано, что эффективность ПЦР резко снижается при апуринизации и окислении модельной

плазмидной ДНК-матрицы. Определен состав ферментов, способных осуществлять полный цикл эксцизионной репарации отдельных повреждений. После обработки поврежденных модельных субстратов этим набором ферментов эффективность ПЦР возросла по сравнению с эффективностью ПЦР образца, не подвергнувшегося репарации.

DOI: 10.7868/S0555109914030210

UDC 577.154

MOLECULAR MUTAGENESIS AT Tyr-101 OF THE AMYLOMALTASE TRANSCRIBED FROM A GENE ISOLATED FROM SOIL DNA

© 2014 S. Watanasatitarpa*, P. Rudeekulthamrong**, K. Krusong***, W. Srisimarat***, W. Zimmermann****, P. Pongsawasdi***, J. Kaulpiboon*****

* Biochemistry and Molecular Biology Program, Faculty of Medicine, Thammasat University, Pathumthani 12120 Thailand;

** Department of Biochemistry, Phramongkutklo College of Medicine,
Bangkok 10400 Thailand

*** Starch and Cyclodextrin Research Unit, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University,
Bangkok 10330 Thailand

**** Department of Microbiology and Bioprocess Technology, Institute of Biochemistry, University of Leipzig Leipzig 04130
Germany

***** Department of Pre-Clinical Science (Biochemistry), Faculty of Medicine, Thammasat University;
Pathumthani 12120 Thailand

e-mail: jkaulpiboon@yahoo.com

Received September 6, 2013

The wild-type (WT) amyloamaltase gene was directly isolated from soil DNA and cloned into a pET19b vector to express in *E. coli* BL21(DE3). The ORF of this gene consisted of 1,572 bp, encoding an enzyme of 523 amino acids. Though showing 99% sequence identity to amyloamaltase from *Thermus thermophilus* ATCC 33923, this enzyme is unique in its alkaline optimum pH. In order to alter amyloamaltase with less coupling or hydrolytic activity to enhance cycloamylose (CA) formation through cyclization reaction, site-directed mutagenesis of the second glucan binding site involving in CA production was performed at Tyr-101. The result revealed that the mutated Y101S enzyme showed a small increase in cyclization activity while significantly decreased disproportionation, coupling and hydrolytic activities. Mutation also resulted in the change in substrate specificity for disproportionation reaction. The WT enzyme preferred maltotriose, while the activity of mutated enzyme was the highest with maltopentaose substrate. Product analysis by HPAEC-PAD demonstrated that the main CAs of the WT amyloamaltase were CA29-CA37. Y101S mutation did not change the product pattern, however, the amount of CAs formed by the mutated enzyme tended to increase especially at long incubation time.

DOI: 10.7868/S0555109914030325

УДК 579.6

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БИОСИНТЕЗА ПОЛИГИДРОКСИБУТИРАТА *Methylobacterium extorquens* G10 И *Methyloligella halotolerans* C2 НА МЕТАНОЛЕ

© 2014 г. М. Н. Порошина***, Н. В. Доронина***, В. А. Ежов*, Ю. А. Троценко****

* Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН, Пуцино, 142290

** Пуцинский государственный естественно-научный институт, Пуцино, 142290

e-mail: trotsenko@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 21.10.2013 г.

Проведено сравнительное изучение биосинтеза полигидроксibuтирата метилобактериями *Methylobacterium extorquens* G10 и *Methyloligella halotolerans* C2, реализующими сериновый путь C₁-метаболизма. Лимитирование по азоту стимулировало синтез биополимера обеими культурами. Показано, что метилобактерии синтезировали полимеры с разной молекулярной массой, несмотря на сходство путей метаболизма метанола и биосинтеза полигидроксibuтирата. При увеличении содержания остаточного азота в среде для культивирования *M. extorquens* G10 уменьшалась молекулярная масса полимера (250 → 85 кДа), тогда как *M. halotolerans* C2 синтезировал высокомолекулярный полимер (~3000 кДа) независимо от остаточного содержания источника азота. Установлено, что исследуемые метилобактерии использовали метанол-сырец аналогично чистому метанолу, что существенно снижало себестоимость получаемого полигидроксibuтирата.

DOI: 10.7868/S0555109914030295

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА ПОЛИГИДРОКСИБУТИРАТА *Methylobacterium extorquens* G10

© 2014 г. Д. Н. Федоров*, С. А. Замахаева**, В. А. Ежов*, Н. В. Доронина**, Ю. А. Троценко**

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

**Пуццинский государственный естественно-научный институт, Пуццоно, 142290

e-mail: trotsenko@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 21.10.2013 г.

Изучено влияние увеличения копийности генов биосинтеза полигидроксибутирата (ПГБ) у розовоокрашенной метиловобактерии *Methylobacterium extorquens* G10 на свойства биополимера. Показано, что при введении в клетки штамма-продуцента дополнительных копий генов *phaC* и *phaCAB* происходило повышение активности поли-3-гидроксибутирил-синтазы (ПГБ-синтазы) и двукратное снижение молекулярной массы (150 → 79 кДа) синтезируемого ПГБ, тогда как физико-химические свойства пластика изменялись мало. Установлено, что бесцветный мутант *M. extorquens* G10-W с нарушенным синтезом каротиноидного пигмента (дефект по гену *crtI*, кодирующему фитоенолдесатуразу) имел такую же скорость роста и уровень накопления ПГБ, как и исходный штамм G10. Полученный штамм G10-W перспективен как продуцент со сниженной стоимостью очистки и биосинтеза ПГБ.

DOI: 10.7868/S0555109914030222

АДАПТАЦИЯ КОИММОБИЛИЗОВАННЫХ РОДОКОККОВ К НЕФТЯНЫМ УГЛЕВОДОРОДАМ В КОЛОНОЧНОМ БИОРЕАКТОРЕ

© 2014 г. М. К. Серебrenникова*, М. С. Куюкина***, А. В. Криворучко***, И. Б. Ившина***

* Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, 614081

e-mail: kuyukina@iegm.ru

**Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, 614990

Поступила в редакцию 11.11.2013г.

Изучена возможность адаптации иммобилизованной на модифицированных опилках ассоциации штаммов *Rhodococcus ruber* и *Rhodococcus opacus* к нефтяным углеводородам в колоночном биореакторе. Установлено, что в условиях биореактора повышалась устойчивость бактериальной популяции к углеводородам и антибиотикам, сопровождаемая изменением поверхностных свойств клеток (гидрофобности, электрокинетического потенциала), а также содержания клеточных липидов и биосурфактантов. Показана возможность применения адаптированных родококков для очистки нефтезагрязненной воды в биореакторе.

DOI: 10.7868/S0555109914030301

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОБНОГО ПОТЕНЦИАЛА ДЛЯ ОЧИСТКИ ЗАМАСЛЕННОЙ ОКАЛИНЫ

© 2014 г. И. А. Борзенков*, М. В. Журина*, А. Л. Тарасов*, С. С. Беляев*, В. Г. Дюбанов**

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

**Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, Москва, 119991

e-mail: inmiran@yandex.ru

Поступила в редакцию 7.11.2013 г.

Исследована возможность использования микробных процессов для очистки замасленной окалины металлургического производства с целью ее рекуперации. Из образца замасленной окалины, полученной непосредственно с металлургического завода, была получена устойчивая ассоциация микроорганизмов, способная развиваться на минеральном масле, как единственном источнике углерода. Из этой ассоциации выделены культуры микроорганизмов, определено их таксономическое положение, охарактеризованы основные морфологические и культуральные признаки. Полученные микроорганизмы принадлежали к родам *Luteimonas*, *Alcanivorax*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*. Проведенные исследования показали, что в состав ассоциаций, окисляющих минеральное масло, входят также микроорганизмы, неспособные к его утилизации, но существенно активизирующие углеводородоксилирующую микрофлору. При использовании выделенных и коллекционных штаммов микроорганизмов снижение остаточного содержания масла в образцах замасленной окалины достигало 58%.

DOI: 10.7868/S0555109914030180

UDC 577.156

BIODEGRADATION OF FEATHER WASTES AND THE PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A CONCOMITANT KERATINASE FROM *Paecilomyces lilacinus*

©2014 Q. Y. Wang and M. D. Liao

Key Lab of Natural Pesticide and Chemical Biology of Ministry of Education, College of Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong, 510642 China
e-mail: meideliatg@163.com; qywtg66@163.com

Received April 21, 2013

Paecilomyces lilacinus strain PL-HN-16 was found to have the ability to degrade feathers. During the degradation process, the broth initially turned as sticky as gelatin and then turned into fluid that means the feathers can be hydrolyzed completely. Keratinolytic protein (Ker) of aforementioned strain was purified using ammonium sulphate precipitation, HiTrap™ Butyl FF chromatography and Sephacryl S-200 gel filtration. The Ker of *P. lilacinus* PL-HN-16 had molecular mass of 33 kDa, the optimum pH 8.0 and temperature optimum at 40°C. It used the soluble keratin as substrate. The enzyme showed high activity and stability over a wide range of pH (6.0 to 10.0) and temperature (30°C to 60°C) values but was completely inhibited by PMSF. Ker of *P. lilacinus* PL-HN-16 exhibited stability toward SDS. These promising properties make the enzyme a potential candidate for future applications in biotechnological processes as keratin hydrolysis and dehairing during leather processing.

DOI: 10.7868/S0555109914030313

УДК 579.24+579.222

ВЛИЯНИЕ ЛИГНИНА И КИСЛОРОДА НА РОСТ И ЛИПИДООБРАЗОВАНИЕ *Lentinus tigrinus*

© 2014 г. А. А. Ивашечкин*, Я. Э. Сергеева*, В. В. Лунин****, В. И. Богдан****, И. С. Мысякина*, Е. П. Феофилова*

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

** Институт органической химии им. И.Д. Зелинского РАН, Москва, 119991

*** Химический факультет, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, 119991

e-mail: feofilov@inmi.host.ru, biolog100@bk.ru

Поступила в редакцию 13.08.2013 г.

При выращивании мицелиального гриба *Lentinus tigrinus* на среде с лигнином повышенное содержание кислорода стимулировало рост гриба и увеличивало выход липидов. В составе фосфолипидов впервые обнаружено высокое содержание фосфатидной кислоты и уменьшение уровня фосфатидилэтаноламина и фосфатидилсерина. В составе нейтральных липидов происходили изменения в соотношении этерифицированных и свободных стериннов: количество эфиров стериннов уменьшалось, одновременно снижалось содержание свободных жирных кислот. На основании полученных данных обсуждается возможная роль фосфатидной кислоты как вторичного мессенджера в процессе потребления лигнина грибом *Lentinus tigrinus*.

DOI: 10.7868/S0555109914030246

UDC 582.282.23

ERYTHRITOL PRODUCTION WITH MINIMUM BY-PRODUCT USING *Candida magnoliae* MUTANT

© 2014 G. R. Ghezlbash*, I. Nahvi*, and A. Malekpour**

* Department of Biology, Faculty of Science, University of Isfahan, 81746-73441, Iran

** Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan 81746-73441, Iran

e-mail: gh.r.ghezlbash@gmail.com

Received 26.09.2013

In order to enhance erythritol production, mutants of *Candida magnoliae* DSM70638 were generated by ultraviolet and chemical mutagenesis. Erythritol productivity of samples was analyzed by TLC and HPLC with the refractive index detector. One of the mutants named mutant 12-2 gave a 2.4-fold increase in erythritol (20.32 g/L) and a 5.5-fold decrease in glycerol production compared to the wild strain. A sequence-based map of erythrose reductase gene in this mutant showed a replacement of the A³²¹ by G³²¹ that did not cause any amino acid exchange in protein structure. Therefore, the reason of higher erythritol

production in *C. magnoliae* mutant 12-2 is probably the increase in expression of the open reading frame gene. This study revealed that a mutation or minor change in the sequence of genes involved in a production pathway can lead to a significant increase in protein translation.

DOI: 10.7868/S0555109914030192

UDC 543.42,543.544:581.573.4

GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY CHARACTERISATION OF THE ANTI-*Listeria* COMPONENTS OF *Garcinia kola* SEEDS

© 2014 D. Penduka*, K. A. Basson**, B. Mayekiso*, L. Buwa* and I. A. Okoh*

* Applied and Environmental Microbiology Research Group (AEMREG), Department of Biochemistry and Microbiology,
University of Fort Hare, P. Bag X1314 Alice, 5700, South Africa

** Department of Biochemistry and Microbiology, University of Zululand, P/Bag XI001, KwaDlangezwa, 3886,
KwaZulu-Natal Province, South Africa

e-mail: aokoh@ufh.ac.za

Received September 9, 2013

Adsorption chromatography was used to separate the bioactive constituents of the crude n-hexane extract of *Garcinia kola* seeds. The silica gel 60 column fractions were eluted using the solvent combination of benzene : ethanol: ammonium hydroxide (BEA) in the ratio combination of 36 : 4 : 0.4 v/v. The fractions were tested for anti-*Listeria* activities by determining their MIC₅₀, MIC₉₀ or MIC against 4 *Listeria* isolates. The fractions were labelled BEA1 to BEA5 and 3 out of the 5 fractions eluted were active against the test *Listeria* species with MIC's ranging from MIC 0.157 mg/mL to MIC₅₀ 0.625 mg/mL. The most active fractions, BEA2 and BEA3, were subjected to gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) to identify their composition. Fraction BEA2 constituted of 18 compounds mostly sterols and the BEA3 fraction contained 27 compounds with the most abundant compounds being fatty acids derivatives. The BEA2 fraction's interactions with antibiotics proved to be 100% synergistic with ciprofloxacin and ampicillin whilst it exhibited 50% additivity and 50% synergism with penicillin G. However, all the interactions of the BEA2 fraction with each of the conventional antibiotics used were synergistic against the human listeriosis causative bacteria *Listeria monocytogenes*.

DOI: 10.7868/S0555109914030271

УДК 578.81:578.7

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ СЕЛЕКЦИИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ РОДОВ *Pseudomonas* И *Staphylococcus*

© 2014 г. К. А. Мирошников*, Е. Е. Куликов**, О. С. Дарбеева***, К. А. Лыско****,
Г. М. Игнатъев*****

* Институт биоорганической химии им. академ. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997
e-mail: kmi@ibch.ru

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

*** Научный центр экспертизы средств медицинского применения "Минздрава России, Москва, 119002

**** НПО "Микроген" Минздрава России, Москва, 127473

e-mail: kmi@ibch.ru

Поступила в редакцию 25.11.2013 г.

Состав экспериментально подобранных смесей бактериофагов, промышленно выпускаемых НПО "Микроген" для профилактики и лечения стафилококковых и псевдомонадных инфекций, был проверен с помощью просвечивающей электронной микроскопии негативного контрастирования. Результаты биоинформационного анализа геномов известных фагов *Pseudomonas* и *Staphylococcus* показали, что основная популяция бактериофагов в смесях принадлежит группам, пригодным для использования в терапевтических целях. Однако поскольку результаты изучения морфологии фаговых частиц не всегда позволяли сделать однозначный вывод о соответствии фага конкретной группе, требуется генотипирование бактериофагов на основе консервативного генетического локуса, которое даст возможность определить их принадлежность к определенной генетической группе.

DOI: 10.7868/S0555109914030258