

## **ГЕТЕРОТАЛЛИЗМ МУКОРОВЫХ ГРИБОВ: БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИИ (ОБЗОР)**

© 2006 г. Е.П.Феофилова

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва, 117811;

[e-mail: feofilov@inmi.host.ru](mailto:feofilov@inmi.host.ru)

Обзор посвящен гетероталлизму мицелиальных грибов. Центральной частью статьи является обсуждение гормональной регуляции репродукции гетероталлических штаммов муковоксовых грибов. Этот процесс рассматривается с позиций современных представлений о тесном общении клеток грибов с помощью специального "языка" - химических соединений, называемых гормонами, или феромонами. Впервые на примере *Blakeslea trispora* на основании собственных экспериментальных данных приводятся физиолого-биохимические критерии, позволяющие четко различать разнополюсные штаммы и проводить аналогию с высшими эукариотами. Рассматривается путь синтеза, связь с каротиноидами и биологическая функция зигогенического полового гормона Mucorales - триспорных кислот. Обсуждается сходство в химическом строении и биологической функции гормонов грибов, растений и животных. Рассматриваются современные представления о значении терпеноидных соединений в эволюции процессов половой коммуникации и дается экскурс в новое направление биологии - микробную эндокринологию. В заключительной части обзора приводятся данные о значении в современной биотехнологии феномена гетероталлизма для получения ряда изопреноидных соединений -  $\beta$ -каротина, ликопина, с высокой антиоксидантной активностью, а также стероидов и триспорных кислот.

## **ПЦР "В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ": ПОДХОДЫ К АНАЛИЗУ ДАННЫХ (ОБЗОР)**

© 2006 г. Д.В.Ребриков, Д.Ю.Трофимов

ЗАО "НПФ ДНК-Технология", Москва 115478 [e-mail: denis@dna-technology.ru](mailto:denis@dna-technology.ru)

Для регистрации накопления продуктов полимеразной цепной реакции в процессе амплификации (ПЦР "в реальном времени") используют специальное оборудование - детектирующие амплификаторы, способные регистрировать уровень флуоресценции в реакционной пробирке во время амплификации. По окончании реакции исследователь получает графики накопления ДНК. Обсуждаются наиболее перспективные современные алгоритмы анализа результатов ПЦР "в реальном времени", возможные ошибки используемых компьютерных программ и самого экспериментатора при анализе полученных кривых. Обобщены данные литературы, позволяющие исследователям разобраться в особенностях метода и получать более качественные результаты.

## **РЕГУЛЯТОРНЫЙ БЕЛОК, ВЫДЕЛЕННЫЙ ИЗ МОЛОКА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

© 2006 г. П.А.Назарова\*, М.С.Краснов\*, В.П.Ямскова\*, И.А.Ямсков\*\*

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

\*\*Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва,  
[e-mail: yamskov@mail.ru](mailto:yamskov@mail.ru)

В цельном молоке коровы был идентифицирован регуляторный белок, проявляющий биологическую активность в сверхмалых дозах. Значение изоэлектрической точки белка находится в интервале рН 4.48-5.59, а молекулярная масса не превышает 10 кДа. Исследование вторичной структуры показало преимущественное присутствие в молекуле регуляторного белка  $\beta$ -структур, особенно антипараллельных, а также участков, описываемых в терминах статистического клубка. Исследование локализации белка демонстрирует его внеклеточное расположение в эпителии протоков молочной железы. Было показано, что в цельном молоке регуляторный белок присутствует в активной форме, но он не был обнаружен в сухом молоке и молочной смеси для детского питания. На основании полученных результатов выдвинуто предположение об идентичности регуляторного белка молока, охарактеризованного в работе, и сывороточного низкомолекулярного гликопротеина - одного из ранее изученных белков, биологически активных в сверхмалых дозах.

## **ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОГО ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА АТФ-ЗАВИСИМОЙ ФОСФОФРУКТОКИНАЗЫ ИЗ ПЛОДОВ ЯБЛОНИ *Pyrus domestica* BORKH**

© 2006 г. С.Г.Гюльяхмедов, Я.А.Омаров, З.М.Мамедов, А.А.Кулиев

Бакинский государственный университет, Баку, AZ-1073/1 [e-mail: biochem@mail.az](mailto:biochem@mail.az)

Определена активность АТФ-зависимой фосфофруктокиназы в субэпидермальных тканях плодов яблони. При оптимальных условиях выделения активность фермента была стабильна в течение 14 ч при комнатной температуре. Частично очищенный препарат был специфичен к АТФ, УТФ, ЦТФ и ингибировался АДФ, ФЭП, 2-ФГК, 1,3-ДФГ. В присутствии фосфатной группы ингибирующие эффекты последних ослаблялись. Ионы  $Mg^{2+}$  стимулировали активность фермента. Активность АТФ-зависимой фосфофруктокиназы в плодах яблони сорта Антоновка была в 1.3 раза выше активности данного фермента, наблюдающейся в плодах сорта Ренет Симиренко.

**СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ И РЕАКЦИИ БИОТРАНСФОРМАЦИИ  
СТЕРОИДОВ, ОСУЩЕСТВЛЯЕМЫЕ РЕКОМБИНАНТНЫМИ  
МИКРООРГАНИЗМАМИ *Saccharomyces cerevisiae* И *Yarrowia lipolytica*,  
ЭКСПРЕССИРУЮЩИМИ ЦИТОХРОМ P450c17**

© 2006 г. В.М.Шкуматов\*, Н.С.Фролова\*, Е.В.Рудая\*, Я.В.Фалетров\*,  
Ш.Мауерсбергер\*\*, Г.Барт\*\*

\*Научно-исследовательский институт физико-химических проблем, Белгосуниверситет,  
220050, Минск, Беларусь, e-mail: [biopharm@bsu.by](mailto:biopharm@bsu.by)

\*\*Институт микробиологии Технического университета, 01062, Дрезден, Германия

Изучено соотношение реакций 17 $\alpha$ -гидроксилирования и 20-окисления-восстановления прогестерона и некоторых его производных в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* YEp51 $\alpha$  и *Yarrowia lipolytica* E129A15, экспрессирующих цитохром P450c17. Ключевые метаболиты определены как 17 $\alpha$ -гидроксипрогестерон и 17 $\alpha$ ,20( $\alpha$ ,  $\beta$ )-дигидроксипрегн-4-ен-3-оны и установлены схемы биотрансформации прегн-4-ен-20( $\alpha$ ,  $\beta$ )-ол-3-онов, включающие циклы 20-окисления, 17 $\alpha$ -гидроксилирования и стереоспецифичного 20-восстановления. Определены эффективность и кинетические параметры биотрансформации стероидов рекомбинантными микроорганизмами и обсуждается роль дрожжевых аналогов дегидрогеназ стероидов млекопитающих. В результате установлена принципиальная возможность получения из исходного прогестерона 17 $\alpha$ -гидроксипрогестерона или 17 $\alpha$ ,20( $\alpha$ ,  $\beta$ )-диолов прогестерона.

**BIOTRANSFORMATION OF CORTEXOLONE TO HYDROCORTISONE BY MOLDS  
USING A RAPID COLOR DEVELOPMENT ASSAY**

© 2006 г. J.Manosroi\*, Y.Chisti\*\*, A.Manosroi\*

\*Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University,  
Chiang Mai 50200, Thailand; e-mail: [pmpti006@chiangmai.ac.th](mailto:pmpti006@chiangmai.ac.th)

\*\* Institute of Technology and Engineering, Massey University, Private Bag 11 222, Palmerston  
North 5320, New Zealand

Capabilities of 22 molds were assessed for 11  $\beta$ -hydroxylation of cortexolone (Reichstein's compound S) to hydrocortisone. The biotransformation capability was compared for solid-state and submerged monocultures of the molds under otherwise identical conditions. A novel rapid color development assay and thin layer chromatography were used to qualitatively establish the ability of the fungi to convert cortexolone to hydrocortisone. These assays were validated and supplemented with data from high performance liquid chromatography to obtain quantitative information on the biotransformation. Nearly all the fungi consumed a significant fraction of the cortexolone fed, but only four (i.e. two isolates of *Cunninghamella blakesleeana*, *C. echinulata* and *Curvularia lunata*) yielded measurable quantities of hydrocortisone. Submerged cultures generally gave significantly greater yield of hydrocortisone compared to equivalent solid-state cultures.

## РАСПРОСТРАНЕНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ФУКОИДАНГИДРОЛАЗ СРЕДИ МОРСКИХ БАКТЕРИЙ СЕМЕЙСТВА *Flavobacteriaceae*

© 2006 г. А.М.Урванцева\*, И.Ю.Бакунина\*, О.И.Недашковская\*, С.Б.Ким\*\*,  
Т.Н.Звягинцева\*

\*Тихоокеанский институт биоорганической химии, Владивосток;

[e-mail: Angela76@yandex.ru](mailto:Angela76@yandex.ru)

\*\*Чангнамский Национальный Университет, Дайджон, Республика Корея

Проведен поиск ферментов, деградирующих фукоидан, и других О-гликозилгидролаз среди 51 штамма морских бактерий семейства *Flavobacteriaceae*, изолированных из красных, зеленых и бурых водорослей, а также из морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* и голотурии *Apostichopus japonicus*. Более 40% исследованных штаммов синтезировали фукоиданазы. Морские бактерии *Mesonia algae* КММ 3909т - изолят зеленой водоросли *Acrosiphonia sonderi*, *Maribacter* sp. КММ 6211 и *Gramella* sp. КММ 6054 - ассоцианты морского ежа *S. intermedius* отмечены как лучшие продуценты фукоиданаз. Ксилоза являлась эффективным индуктором биосинтеза фукоиданаз в этих штаммах. Ни один из 15 штаммов морских бактерий рода *Arenibacter* не продуцировал каких-либо полисахаридгидролаз.

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ НОВЫХ НИЗИНОБРАЗУЮЩИХ ШТАММОВ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ИЗ МОЛОКА

© 2006 г. Л.Г.Стоянова, Т.Д.Сультимова, С.Г.Ботина, А.И.Нетрусов

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, биологический  
факультет, Москва, 119992; [e-mail: stoyanovamsu@mail.ru](mailto:stoyanovamsu@mail.ru)

Разработан метод выделения активных низинообразующих штаммов мезофильных лактококков. Из свежего коровьего молока молочных ферм в различных территориальных зонах России выделены 55 штаммов мезофильных молочнокислых бактерий, 36 из них обладали низинсинтезирующей активностью. Наиболее активные 3 штамма были изучены по морфологическим, культуральным, физиолого-биохимическим признакам и идентифицированы как *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Видовая принадлежность изучаемых штаммов была подтверждена на основании определения сходства нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК. Нуклеотидные последовательности генов 16S рНК депонированы в базу данных GenBank под номерами: DQ255951-DQ255954. Установлены различия штаммов по физиолого-биохимическим признакам и спектрам бактерицидного действия на микроорганизмы, способные развиваться в сельскохозяйственном сырье и пищевой продукции. Выделенные штаммы обладали значительно более широким спектром действия, отличным от спектра действия низинпродуцирующего штамма МГУ, а также коммерческого препарата низина (Nisaplin), используемого в качестве биологического консерванта.

## EFFECT OF SILICONE OIL ON THE GIBBERELIC ACID PRODUCTION BY

### *Gibberella fujikuroi* AND *Aspergillus niger*

© 2006 г. S.Ates, S.Ozenir, M.Gokdere

Gazi University, Faculty of Art and Science, Department of Chemistry, 06500, Teknikokullar, Ankara, Turkey [e-mail: sates@gazi.edu.tr](mailto:sates@gazi.edu.tr)

The effect of silicone oil on gibberellic acid production was investigated using *Gibberella fujikuroi* and *Aspergillus niger* fungi. Silicone oil was used as an oxygen vector in the gibberellic acid production process. When silicone oil was used, gibberellic acid concentration increased with respect to the control run having *A. niger* and *G. fujikuroi* microorganisms 4.6 and 6.7 times, respectively.

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРИРОДНЫХ ИНГИБИТОРОВ ИЗ РАСТЕНИЙ С ЭКЗОПРОТЕИНАЗАМИ ГРИБА-ВОЗБУДИТЕЛЯ РИЗОКТОНИОЗА

© 2006 г. Е.Л.Гвоздева\*, А.В.Волоцкая\*\*, А.В.Софьин\*, Н.Н.Кудрявцева\*,  
Т.А.Ревина\*, Т.А.Валуева\*

\*Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, 119071 [e-mail: valueva@inbi.ras.ru](mailto:valueva@inbi.ras.ru)

\*\* Кубанский государственный университет, Краснодар, 350040 [e-mail: bioch@mail.kubsu.ru](mailto:bioch@mail.kubsu.ru)

Фитопатогенный гриб *Rhizoctonia solani* Kuhn. при выращивании на среде, содержащей термостабильные белки из клубней картофеля, продуцировал комплекс протеиназ, активных в слабощелочной области рН. С помощью метода ДДС-ПААГ-электрофореза в присутствии желатины показано, что комплекс внеклеточных протеиназ состоял из четырех компонентов с различными значениями молекулярных масс. Изучение специфичности действия экзоферментов на различные синтетические субстраты свидетельствовало о том, что в культуральной жидкости *R. solani* присутствовали преимущественно трипсиноподобные протеиназы. Активность экзопротеиназ практически полностью подавлялась белками-ингибиторами трипсина, выделенными из клубней картофеля и семян ряда растений семейства бобовых. Полученные результаты позволили предположить, что внеклеточные протеиназы, секретируемые *R. solani*, играют существенную роль в инфицировании растительной ткани, а природные ингибиторы осуществляют защитную функцию при поражении растений семейств пасленовых (Solanaceae) и бобовых (Leguminosae) этим фитопатогенным грибом.

## ДЕПОЛИМЕРИЗАЦИЯ ГАЛАКТОМАННАНОВ СЕМЯН БОБОВЫХ ЦЕЛЛОВИРИДИНОМ Г20х

© 2006 г. А.В.Ильина\*, Н.М.Местечкина\*\*, В.Д.Щербухин\*\*, В.П.Варламов\*

\* Центр "Биоинженерия" РАН, Москва, 117312 [e-mail: varlamov@biengi.ac.ru](mailto:varlamov@biengi.ac.ru)

\*\* Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН, Москва, 119071 [e-mail: mestnm@inbi.ras.ru](mailto:mestnm@inbi.ras.ru)

Исследована деполимеризация галактоманнанов бобовых промышленным ферментным препаратом Целловиридин Г20х с целью получения фрагментов макромолекул неизмененного состава. Проведен гидролиз четырех галактоманнанов: галеги (*Galega orientalis* Lam) Ман : Гал 1.1; гуара (*Cyamopsis tetragonoloba*) Ман : Гал 1.6; гледичии

(*Gleditsia triacanthos f. inermis* L.) Ман : Гал 2.4 и софоры (*Styphonolobium japonicum* (L.) Schott.) Ман : Гал 5.1, представляющих весь диапазон соотношений мономеров для этого класса фитополисахаридов. С высоким выходом (75-80%) получены фрагменты, сохранявшие близкое к исходным полисахаридам соотношение мономеров. Степень замещения 1,4- $\beta$ -D-маннопиранозной цепи по С-6 остатками  $\alpha$ -галактозы влияла на величину молекулярной массы предельного продукта.

### **ГЕМИЦЕЛЛЮЛОЗЫ ДРЕВЕСИНЫ ДУБА, ЭКСТРАГИРУЕМЫЕ ВОДНО-СПИРТОВЫМИ СРЕДАМИ**

© 2006 г. А.Ф.Писарницкий, Т.Ю.Рубеня, А.О.Рутицкий

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, 119071 e-mail: [vap@inbi.ras.ru](mailto:vap@inbi.ras.ru)

Из этанольных экстрактов (40-90%) древесины дуба выделяли фракции гемицеллюлоз. Для выяснения их состава проводили гидролиз и в виде триметилсилильных производных анализировали продукты гидролиза ГЖХ-МС. В зависимости от содержания этанола из древесины экстрагировались гемицеллюлозы различного состава. В спиртах, выдерживаемых в контакте с древесиной дуба и предназначенных для производства бренди, и виски, содержание гемицеллюлоз в зависимости от срока выдержки увеличивалось. Предполагается, что это придает напиткам "полноту" и "мягкость" во вкусе.

### **ОПТИМИЗАЦИЯ СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ КАПУСТЫ БЕЛОКОЧАННОЙ *Brassica oleracea var. capitata***

© 2006 г. Т.Н.Грибова, А.М.Камионская, К.Г.Скрябин

Центр "Биоинженерия" РАН, Москва, 117312 e-mail: [akatio@biengi.ac.ru](mailto:akatio@biengi.ac.ru)

Для генетической трансформации четырех линий белокочанной капусты Гэс-2, Дрв-2, Зму 7, Мег 2 использован штамм *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, содержащий вектор pBar с геном фосфинотрицинацетилтрансферазы (*bar*) под контролем 35SCMoV промотора и NOS 3' терминатора. Изучено влияние различных концентраций и сочетаний фитогормонов, в результате чего подобраны условия культивирования, при которых эффективность регенерации достигала 63-87%. Показано, что для изучаемых линий необходимо совместное действие природных и синтетических цитокининов. На основе оптимизированной методики агробактериальной трансформации получено 26 трансгенных растений. Трансгенная природа растений подтверждена методами ПЦР и дот-блот гибридизации.

## ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ МЕТОД ИЗМЕРЕНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И КОЛИЧЕСТВА КЛЕТОК

© 2006 г. Б. А. Кузнецов, М. Е. Хлупова, С. В. Шлеев, А.С.Капрельянц, А.И.Ярополов  
Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, 119071 [e-mail: Kuzn-BA@yandex.ru](mailto:Kuzn-BA@yandex.ru)  
[e-mail: dave80@yandex.ru](mailto:dave80@yandex.ru)

Предложен экспрессный электрохимический метод определения метаболической активности живых клеток, основанный на возможности электронного обмена между электродом и элементами биологической цепи электронного переноса в присутствии медиатора. Предлагаемый метод пригоден для исследования любых живых клеток (животные, растения, микроорганизмы), включая анаэробные, dormantные или споровые клетки. Подготовка образца и измерение занимают не более 30 мин. При объеме 15 мл предел обнаружения составляет 10<sup>5</sup> кл/мл. Показана возможность применения метода для оценки уровня метаболической активности в процессе перехода бактерий *Mycobacterium smegmatis* в некультивируемое, dormantное состояние. Особую ценность данный метод представляет для медицины и контроля окружающей среды при детекции латентных форм патогенов. Предлагается оптимальное сочетание методов для экспресс-анализа латентных форм патогенов.