

ИНГИБИТОРЫ ПРОТЕИНАЗ В БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ (ОБЗОР)

© 2008 г. В.В.Мосолов, Т.А.Валуева

Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Москва 119071, e-mail: valueva@inbi.ras.ru

Рассмотрена возможность применения природных ингибиторов протеолитических ферментов в биотехнологии растений. Помимо получения трансгенных растений, обладающих повышенной устойчивостью к насекомым и другим вредителям, ингибиторы протеиназ могут быть использованы для защиты рекомбинантных белков от деградации протеиназами.

ПОЛУЧЕНИЕ И БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТРИПСИНА, ИММОБИЛИЗОВАННОГО НА КРИОГЕЛЕ ПОЛИВИНИЛОВОГО СПИРТА

© 2008 г. Е.Н.Лысогорская*, Т.В.Рослякова**, А.В.Беляева**, А.В.Бачева*, В.И.Лозинский**, И.Ю.Филиппова*

**Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова Химический факультет, Москва, 119992 e-mail: irfilipp@genebee.msu.su*

***Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, 119991 e-mail: ioz@ineos.ac.ru*

Коммерческие препараты трипсина различной активности были иммобилизованы на криогеле поливинилового спирта, активированном диальдегидами (терефталевым, янтарным и глутаровым) или дивинилсульфоном. Все полученные препараты иммобилизованного фермента проявляли гидролитическую активность и были стабильны в течение 8 мес. Образцы иммобилизованного трипсина в средах органических растворителей катализировали синтез п-нитроанилида трипептида N-карбобензоксид-L-фенилаланил-L-аргинил-L-лейцина из метилового эфира N-карбобензоксид-L-фенилаланил-L-аргинина (или N-карбобензоксид-L-фенилаланил-L-аргинина) и п-нитроанилида L-лейцина, а также образование п-нитроанилида тетрапептида N-карбобензоксид-L-аланил-L-аланил-L-аргинил-L-фенилаланина из метилового эфира N-карбобензоксид-L-аланил-L-аланил-L-аргинина и п-нитроанилида L-фенилаланина. Показана необходимость присутствия небольших количеств воды в среде органического растворителя для проявления биокатализаторами синтазной активности в реакциях образования пептидных связей.

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА ГЛУТАТИОНПЕРОКСИДАЗЫ

© 2008 г. К.К.Шульгин, Т.Н.Попова, Т.И.Рахманова

Воронежский государственный университет, Воронеж, 394006 e-mail: tropova@bio.ysu.ru, rtyana@mail.ru

С помощью разработанной схемы очистки получен электрофоретически гомогенный ферментный препарат глутатионпероксидазы из печени крысы с удельной активностью 1.46Е/мг белка и выходом 7.2%. Значения K_m для восстановленного глутатиона и пероксида водорода составляют 0,033 и 0.208 мМ соответственно. Температурный оптимум ферментативной реакции - 32°C pH_{opt} 7.4, $E_{акт}$ - 29.1 кДж/моль. Молекулярная масса фермента- 88 кДа.

ГЛИКОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА ИЗ ГЕПАТОПАНКРЕАСА КАМЧАТСКОГО КРАБА *Paralithodes camtschaticus*

© 2008 г. К.С.Рысакова*, В.Ю.Новиков*, В.А.Мухин*, Е.М.Серафимчик**

**Полярный научно-исследовательский институт морского рыбного хозяйства и океанографии им. И.М.Книповича, Мурманск. 183038 e-mail: nowit@pinro.ru*

***Мурманский государственный технический университет, Мурманск, 183010*

Из гепатопанкреаса камчатского краба получен ферментный препарат и выявлена его гликолитическая активность, приводящая к образованию наряду с N-ацетил-D-глюкозамином хитоолигосахаридов. Результаты подтверждают наличие эндохитиназной и экзохитиназной активности ферментного препарата. Методом ВЭЖХ в продуктах гидролиза хитина и хитозана не обнаружен D(+)-глюкозамин, что указывает на отсутствие деацетилазной и, по-видимому, экзохитозаназной активности. Сравнение зависимости активности ферментного препарата от температуры и рН инкубационной среды позволило предположить, что за хитиназную и протеазную активность ферментного препарата отвечают различные ферменты.

ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКА В23/НУКЛЕОФОЗМИНА ИЗ ЯДЕР КЛЕТОК HeLa

© 2008 г. Е.Н.Сауткина*, Н.А.Потапенко*, Т.И.Булычёва**, Н.М.Владимирова*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997; e-mail: vla.ibch@mail.ru* *Гематологический научный центр РАМН, Москва, 125167*

Впервые проведено выделение и оценено структурное состояние эндогенных форм белка В23 из ядер клеток HeLa. Было показано, что выдерживание ядер в 10 мМ трис-НСl-буфере (рН 7.4) сопровождалось не только набуханием ядер, но и элюцией ряда ядерных белков, в том числе белка В23. Электрофорез в ПААГ фракции супернатанта позволил выявить девять основных окрашенных белковых полос, идентификация которых была осуществлена методом MALDI-масс-спектрометрии (лазерной десорбции и ионизации в присутствии вспомогательного вещества - матрицы). В зоне белков 35-40 кДа были идентифицированы нуклеофозмин, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа (ГАФДГ) и гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин А2/В1 (гяРНП А2/В1). Анализ N- и С-концевых аминокислотных последовательностей этих белков позволил идентифицировать изоформы В23.1 и В23.2, ГАФДГ и изоформу гяРНП В1, определить наличие и характер их N- и С-концевого процессинга и доказать существование на белковом уровне изоформы В23.2.

МИЦЕЛЛЯРНЫЙ СИНТЕЗ ЭЛЕКТРОПРОВОДЯЩЕГО ПОЛИАНИЛИНА С УЧАСТИЕМ ЛАККАЗЫ

© 2008 г. А.В.Стрельцов, Г.П.Шумакович, О.В.Морозова, М.А.Горбачёва.

А.И.Ярополов

Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Ленинский просп., 33, Москва, 119071; e-mail: yaropolov@inbi.ras.ru

Предложен метод ферментативного синтеза электропроводящего полианилина на мицеллах натриевой соли додецилбензенсульфокислоты CUBCNa). В качестве биокатализатора

использовали высокопотенциальную лакказу из базидиального гриба *Trametes hirsuta*. Оптимизированы условия синтеза полианилина (рН 4.0, концентрации реагентов 10-20 мМ, соотношение анилин/ДБСNa=2:1). Полученный продукт был электрохимически активен в области потенциалов от -200 до 600 мВ. обладал электропроводимостью и способностью к обратимому дедопированию при изменении рН раствора.

Methods for Increasing Nitrile Biotransformation into Amides Using *Mesorhizobium* sp.

© 2008 г. Y.S.Feng*, C.M.Lee*, and C.C.Wang**

**Department of Environmental Engineering, National Chung Hsing University, Taiwan, ROC, e-mail: pine.feng@msa.hinet.net*

***Department of Environmental Engineering, Hungkuang University, Taiwan, ROC*

Nitriles are potential soil pollutants from industrial wastewater. There has been increased demand for efficient process for nitrile degradation process. Nitrile hydratase (NHase) has been extensively used in the production of acrylamide and treatment of organocyanide contaminated industrial effluents. The NHase of *Mesorhizobium* sp., isolated from polyacrylonitrile activated sludge from fiber manufacturing wastewater treatment systems was studied in the whole bacterial cells. Different chemicals were added to observe the variation in the percentage of acrylonitrile converted into acrylamide. The result indicated that cobalt ions were the NHase cofactor and could increase the NHase activity. The addition of propionaldehyde, or butyraldehyde could enhance the acrylonitrile conversion rate. Therefore, acrylamide could be accumulated effectively and the percentage of acrylonitrile converted into acrylamide increased. Propionaldehyde was the most effective NHase activator. The percentage of acrylonitrile converted into acrylamide was nearly 100% at 3.8 h when propionaldehyde was added at about 207.4 mg/l. The addition of benzaldehyde was unable to increase the percentage of acrylonitrile converted into acrylamide. EDTA and acrylamide showed no effect on NHase activity. However, 0.1 mg/l of Ag₂SO₄ would slightly inhibit NHase activity, producing an acrylonitrile conversion rate of 492.9 mg/l with 54.9% converted at 29.1 h. The ability of the acrylonitrile biotransformation was completely inhibited if the Ag₂SO₄ concentration was above 0.5 mg/l.

БИОДЕГРАДАЦИЯ ФЕНОЛА ШТАММОМ *Pseudomonas* sp., МАРКИРОВАННЫМ *gfp*-ГЕНОМ

© 2008 г. А.Т.Адылова, Т.Н.Черникова, А.А.Абдукаримов

Институт генетики и экспериментальной биологии растений АН РУз, п. Юкори-Юз, Ташкентская область. Узбекистан 702151, e-mail: azoda_adilova@mail.ru

Путем конъюгационного переноса суицидного вектора рAG408 из штамма *E. coli* S 17-1 в клетки *Pseudomonas* sp., способные утилизировать фенол, получены трансконъюгаты, излучающие яркое свечение при облучении клеток УФ. Показано, что маркирование клеток *Pseudomonas* sp. *gfp*-геном не повлияло на их способность деградировать фенол. Исследована динамика изменения плотности маркированных бактерий при интродукции их в почву. Обсуждается возможность использования полученных бактерий для детоксикации почв, загрязненных фенолом.

ИЗМЕНЕНИЕ НЕФТЕДЕСТРУКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ПРИ ХРАНЕНИИ МИКРООРГАНИЗМОВ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ

© 2008 г. Н.И.Белоусова**, Л.М.Барышникова*, А.Н.Шкидченко*

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Пущино,
Московская область. 142290; e-mail: lidabar@ibpm.pushchino.ru

**Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности им. В.М.
Горбатова РАСХН. Москва, 109316; e-mail: nibeloy@mail.ru

Изучено изменение нефтедеструктивной активности у психрофильных микроорганизмов *Rhodococcus* spp. DS-07, DS-21 и *Pseudomonas* spp. DS-09, DS-22 при их хранении на разных средах: богатой и синтетической в присутствии селективного агента. Нефтедеструктивная активность за 2.5 г. хранения на богатой среде снижалась на 50-60%, на среде с нефтью уменьшалась незначительно. Пересевы на селективную среду с нефтью после хранения способствовали частичному восстановлению активности. Установлено, что хранение микроорганизмов-нефтедеструкторов на богатой среде приводило к потере плазмид биодegradации, их восстановление и сохранение в течение длительного времени возможно только в присутствии селективного агента в среде.

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ОЗЕРА БАЙКАЛ В РАЙОНЕ ЕСТЕСТВЕННЫХ НЕФТЕПРОЯВЛЕНИЙ

© 2008 г. О.Н.Павлова, Т.И.Земская, А.Г.Горшков, В.В.Парфёнова, М.Ю.Суслова,
О.М.Хлыстов

Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, 664033; e-mail: pavlova@lin.irk.ru

Исследован состав природного микробного сообщества, распределение различных групп микроорганизмов, в том числе способных деградировать углеводороды нефти, в районах естественных нефтепроявлений озера Байкал. Установлено, что в донных осадках к доминирующим микроорганизмам, осуществляющих деградацию нефти, относятся бактерии рода *Vacillus*, в водной толще - представители родов *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*. В условиях модельного эксперимента оценена потенциальная активность байкальских микроорганизмов в процессе утилизации н-алканов нефти, показано уменьшение концентрации н-алканов на 60% за 20 сут эксперимента при начальной концентрации нефти 0.5 мг/л (10 ПДК).

ВЛИЯНИЕ СОЛЕЙ НА СВЕЧЕНИЕ БИОСЕНСОРА НА ОСНОВЕ ПРИРОДНОГО И РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММОВ ЛЮМИНЕСЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

© 2008 г. Д.Г.Дерябин, Е.С.Алёшина

Оренбургский государственный университет, 460018, Оренбург, e-mail:
dgderyabin@yandex.ru

Изучено влияние катионов K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} и анионов Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- , CO_3^{2-} на уровень свечения морского люминесцирующего микроорганизма *Photobacterium phosphoreum* ("Микробиосенсор В-17 677f") и рекомбинантного штамма *Escherichia coli* с клонированным lux-опероном *P. leiognathi* ("Эколюм-9"). Показано, что малые концентрации хлоридов и сульфатов изученных катионов оказывают на бактериальную

биолюминесценцию дозозависимый стимулирующий эффект, сменяющийся ее ингибированием при увеличении содержания действующего агента. При этом по степени подавления свечения, характеризуемой величиной EC_{50} , катионы располагались в последовательности $Ca^{2+} > Na^{+} > Mg^{2+} > K^{+}$. Особенностью действия карбонатов и гидрокарбонатов явился их выраженный ингибирующий эффект на уровень биолюминесценции, определяемый сдвигом рН среды в зону высоких значений. Установлено, что некоторые минеральные воды, характеризующиеся высокой минерализацией и содержанием гидрокарбонатов, оказывают на уровень свечения микробных люминесцирующих биосенсоров выраженное ингибирующее действие, имитирующее эффект химических поллютантов.

НОВЫЙ ИСТОЧНИК МЕТАНА В БОРЕАЛЬНЫХ ЛЕСАХ

© 2008 г. В.А.Мухин*, П.Ю.Воронин**

*Институт экологии растений и животных УрО РАН, Екатеринбург, 620144, e-mail: victor.mukhin@ipae.uran.ru

**Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, 127276, e-mail: pavel@ippras.ru

Методом газового анализа установлено наличие метана в составе газов, образующихся при разложении древесины трутовыми грибами в естественных условиях в бореальных лесах. Метан присутствует как внутри древесины, так и в плодовых телах. Предложена схема симбиотической ассоциации дереворазрушающих грибов и анаэробных микроорганизмов, обеспечивающая метаногенез внутри древесины. Масштабы микогенного метаногенеза должны соответствовать огромным объемам древесной мортмассы, разлагающейся в бореальных лесных экосистемах.

***In vitro* Inhibitory Effect of Cranberry (*Vaccinium macrocarpum* Ait.) Juice on Pathogenic Microorganisms**

© 2008 г. H.L.E.Magarinos, C.Sahr, S.D.C.Selaive, M.E.Costa, F.E.Figuerola, and O.A.Pizarro

Institute of Food Science and Technology. Faculty of Agropecuarian Sciences Southern University of Chile, Valdivia, Chile e-mail: hmagarin@uach.cl

The purpose of this study was to determine the inhibitory effects of cranberry juice on pathogenic microorganisms. The microorganisms analyzed were *Escherichia coli* from patients with urinary infections, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus*. The disc method was used to determine the sensitivity of bacteria to cranberry juice (CJ, both concentrated and diluted). A lawn of 10^6 cfu/ml was grown on agar surfaces in Petri dishes and on Whatman discs that had been previously saturated with CJ and CJ:water 1:1 to 1:50 juice solutions had been placed on the discs, which were cultured and incubated. The results indicated that *S. aureus* was more susceptible to cranberry juice inhibition than the other microorganisms. *L. monocytogenes* was the most resistant to the inhibitory action of cranberry juice, showing a significant difference from the inhibition on *P. aeruginosa*, uropathogenic *E. coli*, *Salmonella* spp., and *S. aureus*. This study also demonstrated that the inhibitory activity of cranberry juice for *E. coli* took place up to a dilution of 1:20.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БУРЫХ ВОДОРОСЛЕЙ БАРЕНЦЕВА МОРЯ

© 2008 г. Е.Д.Облучинская

Мурманский морской биологический институт Кольского научного центра РАН,
Мурманск, 183010 [e-mail: science@mmbi.info](mailto:science@mmbi.info), okaterine@yandex.ru

Проведено сравнительное исследование фитохимического состава наиболее распространенных видов бурых водорослей Баренцева моря - 1 вида ламинариевых и 4 видов фукусовых. Предложена модифицированная методика определения маннита в бурых водорослях. Установлено, что фукусовые водоросли сем. *Fucaceae* по содержанию маннита уступают ламинарии сахаристой более чем на 3% (от абс. сухой массы), по количеству альгиновой кислоты и ламинарана более чем на 10%. Йода в *Laminaria saccharina* содержится почти в 2 раза больше, чем у представителей сем. *Fucaceae*. Количество фукоидана и общей суммы липидов у фукоидов Баренцева моря выше, чем у ламинарии сахаристой, на 4-7 % и на 1-3% соответственно. Фукусовые и ламинариевые водоросли Баренцева моря по содержанию основных биологически активных веществ не уступают дальневосточным видам водорослей и могут быть перспективными источниками для их получения.

ОСОБЕННОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА В КАЧЕСТВЕ СТРЕСС-МАРКЕРОВ У ВОДНЫХ ОРГАНИЗМОВ НА ПРИМЕРЕ БАЙКАЛЬСКИХ ЭНДЕМИЧНЫХ АМФИПОД

© 2008 г. М.А.Тимофеев*, Ж.М.Шатилина*, Д.С.Бедулина*, М.В.Протопопова*,
А.В.Колесниченко**

*Иркутский государственный университет, Иркутск, 664003 [e-mail: mtim@irk.ru](mailto:mtim@irk.ru)

**Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,

При использовании белков теплового шока (БТШ) (в качестве биомаркеров при мониторинговых исследованиях водных экосистем необходимо учитывать возможную специфику синтеза данных белков у тех или иных организмов. Особенно это касается эндемиков и видов, узкоадаптированных к специфике условий обитания водоема. Проведена оценка применения БТШ в качестве молекулярных стресс-маркеров у узкоспециализированных видов на примере байкальских эндемичных амфипод (*Crustacea*, *Amphipoda*). Оценено влияние токсического и температурного стрессовых воздействий. В качестве биомаркеров были выбраны белки семейства БТШ70 и нмБТШ, родственные α -кристаллинам. Температурный и токсический стрессы вызывали синтез нмБТШ у исследованных эндемичных видов амфипод. В то же время индукция синтеза БТШ70 у тех же видов после температурного стресса не отмечена. Обсуждается специфика синтеза БТШ70. На основе полученных результатов предлагается использовать нмБТШ в качестве стресс-маркеров у байкальских и узкоспециализированных видов.

БИОСЕНСОРЫ ДЛЯ АНАЛИЗА ГЛИКОАЛКАЛОИДОВ В КЛУБНЯХ КАРТОФЕЛЯ

© 2008 г. В.Н.Архипова*, С.В.Дзядевич*, Н.Жаффрезик-Рено**, К.Мартле**,
А.П.Солдаткин*

*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, 03143, Киев

**Эколь Централь, Лион, Экулли, 69134, Франция [e-mail: avalka@yahoo.com](mailto:avalka@yahoo.com)

Изучены возможности практического применения биосенсоров на основе рН-чувствительных полевых транзисторов и бутирилхолинэстеразы для анализа гликоалкалоидов в клубнях картофеля. Оптимизированы основные аналитические характеристики разработанных биосенсоров, определены оптимальные условия для проведения измерений. С помощью биосенсора проведен количественный анализ гликоалкалоидов в клубнях различных сортов картофеля и показана высокая корреляция данных с результатами, полученными стандартными методами. Проведены эксперименты по определению концентрации глюкозы и показана обратная корреляция содержания глюкозы и гликоалкалоидов в клубнях картофеля.

ВЛИЯНИЕ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА НА МОРФОЛОГИЮ И УСТОЙЧИВОСТЬ КАЛЛУСОВ ПШЕНИЦЫ К ВОЗБУДИТЕЛЮ ТВЕРДОЙ ГОЛОВНИ

© 2008 г. Н.Б.Трошина, Л.Г.Яруллина, З.Р.Юсупова, О.Б.Сурина, И.В.Максимов
Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, 450054; [e-mail: phyto@anrb.ru](mailto:phyto@anrb.ru)

Исследовано влияние пероксида водорода на морфологию и устойчивость каллусов мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. к *Tilletia caries* Till. Выявлены различия в индукции защитного ответа и морфогенеза в каллусах в зависимости от концентрации H₂O₂. Обнаружено, что высокий уровень пероксида водорода в каллусах пшеницы коррелирует с высокой активностью оксалаксоксидазы в области клеточной стенки. Введение H₂O₂ в среду культивирования каллусов инициировало ризогенез, появление плотных участков, тормозило рост и развитие гриба на каллусах. Показано, что высокие концентрации пероксида водорода подавляли рост гриба в меньшей степени. Выявленная связь между активностью оксалаксоксидазы, содержанием H₂O₂ и инициированием образования под влиянием экзогенного пероксида водорода морфогенетических и защитных реакций каллусов дает основание полагать, что одним из путей повышения устойчивости каллусов является индукция генерации H₂O₂.

ПОЛУЧЕНИЕ АНТИТЕЛ К 1,4-ДИГИДРОПИРИДИНОВЫМ БЛОКАТОРАМ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ

© 2008 г. А.А.Буркин, М.А.Буркин
Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН,
Москва, 105064 [e-mail: burma68@yandex.ru](mailto:burma68@yandex.ru)

При иммунизации кроликов конъюгированным антигеном пероксидаза хрена-амлодипин получены поликлональные антитела, позволившие осуществлять групповое определение 1,4-дигидропиридиновых блокаторов кальциевых каналов твердофазным

иммуноферментным анализом в водных растворах с чувствительностью от 0.1 до 1.0 нг/мл для амлодипина, фелодипина, нифедипина и исрадипина.

УДЕРЖИВАНИЕ КОМПОНЕНТОВ СМЕСИ ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ МАЛЬТОДЕКСТРИНАМИ

© 2008 г. Т.А.Мишарина, М.Б.Теренина, Н.И.Крикунова

Институт биохимической физики им. Н.М.Эмануэля РАН, Москва, 119991 e-mail:
Tmish@rambler.ru

Методом капиллярной газо-жидкостной хроматографии изучено влияние состава и природы мальтодекстринов на удерживание 38 компонентов смеси летучих органических веществ - одорантов при хранении в течение 6 месяцев. Установлено, что удерживание сложных эфиров повышается с увеличением их молекулярной массы. Удерживание лактонов, фенолов, линалоола, ментона и дамаскона составляло 75-85%. Альдегиды в процессе хранения окислялись и их удерживание не превышало 55%. Найдено, что эффективность удерживания одорантов увеличивалась с уменьшением молекулярной массы мальтодекстринов. Максимальное удерживание обнаружено для мальтодекстрина, полученного из амилопектинового крахмала, не содержащего амилозы.