

СОПРЯЖЕННЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ ПОЛУЧЕНИЯ ВОДОРОДА (ОБЗОР)

©2012 г. Д.Н.Текучева, А.А.Цыганков

Институт фундаментальных проблем биологии РАН

e-mail: tekuchevadn@rambler.ru; ttt-00@mail.ru

Поступил в редакцию 29.06.2011 г.

Описаны возможные пути совмещения различных биологических процессов получения биоводорода. Некоторые из них интенсивно исследуются в настоящее время, другие - теоретически возможны, но пока не изучены. Особое внимание уделено факторам, влияющим на эффективность сопряженных систем.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИПАЗЫ ИЗ ТЕРМОАЛКАЛОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ *Thermosyntropha lipolytica*

© 2012 г. В. М. Гумеров, А. В. Марданов, П. М. Колосов, Н. В. Равин

Центр "Биоинженерия" РАН, Москва, 117312

e-mail: nravin@biengi.ac.ru

Поступила в редакцию 3.11.2011 г.

В результате расшифровки нуклеотидной последовательности генома термоалкалофильной липолитической бактерии *Thermosyntropha lipolytica* идентифицирован ген, кодирующий липазу, секретируемую в среду. Рекомбинантный фермент экспрессирован в *Escherichia coli*, проведены его выделение и предварительная функциональная характеристика. Липаза проявляла гидролитическую активность в отношении пара-нитрофениловых эфиров с различной длиной цепи, а также триглицеридов, в том числе растительных масел. Оптимальные условия реакции достигались при 70—80°C и pH 8.0. Фермент сохранял более 80% активности в присутствии 10% метанола. Выделенная новая термостабильная липаза может быть перспективным биокатализатором для органического синтеза, применения в пищевой промышленности, производстве моющих средств и получении биодизеля.

СИНТЕЗ 1-БУТАНОЛА КЛЕТКАМИ *Escherichia coli* ПРИ ФОРМИРОВАНИИ БУТИРИЛ-КоА ГЕТЕРОЛОГИЧНЫМИ ФЕРМЕНТАМИ КЛОСТРИДИЙ И НАТИВНЫМИ ФЕРМЕНТАМИ β -ОКИСЛЕНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

© 2012 г. А. Ю. Гулевич, А. Ю. Скороходова, А. А. Моржакова, С. В. Антонова, А. В. Сухоженко, Р. С. Шакулов, В. Г. Дебабов

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

e-mail: gulevich@genetika.ru

Поступила в редакцию 08.12.2011 г.

Исследован анаэробный биосинтез 1-бутанола из глюкозы рекомбинантными штаммами *Escherichia coli*, формирующими бутирил-КоА под действием гетерологичного ферментативного комплекса клостридий или в результате обращенного действия нативных ферментов пути β -окисления жирных кислот.

Обнаружено, что при инактивации основных путей образования уксусной и молочной кислот, за счет делеции генов *askA*, *pta*, *poxB* и *idhA*, эффективность биосинтеза бутирил-КоА и его восстановленного продукта 1-бутанола двумя типами рекомбинантных штаммов сравнима. Фактором, лимитирующим продукцию 1-бутанола полученными штаммами, является низкая субстратная специфичность по отношению к бутирил-КоА основной КоА-зависимой алкоголь/альдегид дегидрогеназы *E. coli* AdhE. Сделан вывод, что для конструирования эффективного продуцента 1-бутанола на основе модельного штамма, синтезирующего бутирил-КоА в результате обращенного действия ферментов β -окисления жирных кислот, необходимо обеспечить в клетках штамма интенсивное формирование ацетил-КоА и повышенную активность альтернативных алкоголь- и альдегид-дегидрогеназ.

**PUTATIVE DOWN-STREAM SIGNALING MOLECULE OF GTPase
IN *Porphyromonas gingivalis***

© 2012 M.-J. Chun, K.-J. Park, S.-H. Ohk

Department of Oral Microbiology, 2nd Stage of Brain Korea 21 for School of Dentistry,
Chonnam National University, Gwangju, 500- 757, Korea

e-mail: shohk@chonnam.ac.kr

Received August 26, 2011

Porphyromonas gingivalis is a strict anaerobic bacterium mainly responsible for periodontal disease in oral cavity. Putative GTPase gene (*pgp*) of this bacterium was cloned and its recombinant protein (rPGP) was produced in *Escherichia coli*. Based on the amino acid sequence of SGP that is a GTP-binding protein of *Streptococcus mutans*, putative GTPase amino acid sequence was deduced in the data base of genome sequences of *Porphyromonas gingivalis*. A 900-bp PCR fragment was amplified with *P. gingivalis* genomic DNA as a template and cloned into *E. coli* JM109. Then *pgp* was transferred into pQE-30 expression vector to make pQE-PGP for production of rPGR. This protein was produced and purified by Ni-NTA affinity column chromatography. Anti-PGP antibody was also produced in Sprague Dawley rats. Using Westernblot analysis with this antibody, it was confirmed that the rPGP produced in *E. coli* was identical to that of donor strain. Furthermore, by Southernblot analysis it was revealed that the *pgp* was originated from *P. gingivalis*. By immunoprecipitation with anti-PGP antibody and N-terminal amino acid sequence analysis it was found that PGP was able to bind to acetate kinase, which was reported to be a secondary signaling-molecule in anaerobic microorganisms. Therefore, these results imply that *P. gingivalis* produces putative GTPase and this protein might play a potential role in signaling pathway in oral biofilm formation.

РОЛЬ АЛЛЕЛОПАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В РЕГУЛЯЦИИ И ФОРМИРОВАНИИ БОБОВО-РИЗОБИАЛЬНОГО СИМБИОЗА

© 2012 г. Л. Е. Макарова*, В. И. Смирнов**, Л. В. Клыба**, И. Г. Петрова*,
Л. В. Дударева*

*Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН

**Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, Иркутск, 664033

e-mail: makarova@siflbr.irk.ru

Поступила в редакцию 07.10.2011 г.

Показано, что соединения ароматического ряда, изолированные из корневых экссудатов трех видов бобовых растений (*Pisum sativum* L., *Vicia faba* L. var. *major* Hartz, *Glycine max* L. MERR), идентифицированные как N-фенил-2-нафтиламин, дибутиловый и диоктиловый эфиры орто-фталевой кислоты, известные как негативные аллелопатические вещества, участвуют в контроле формирования бобово-ризобиального симбиоза после инокуляции корней ризобиями и в неблагоприятных для симбиоза условиях.

BIOFILM, ICE RECRYSTALLIZATION INHIBITION AND FREEZE-THAW PROTECTION IN AN EPIPHYTE COMMUNITY

© 2012 Z. Wu*, F. W. K. Kan**, Y.-M. She***, V. K. Walker****

*Departments of Biology, Queen's University, Kingston, Ontario, Canada K7L 3N6

**Department of Biomedical and Molecular Sciences, Queen's University, Kingston,
Ontario, Canada K7L 3N6

***Department of Chemistry, Queen's University, Kingston, Ontario, Canada K7L 3N6
e-mail: walkervk@queensu.ca

Received December 6, 2011

Microbial communities found on the surface of overwintering plants may be exposed to low temperatures as well as multiple freeze-thaw events. To explore the adaptive mechanisms of these epiphytes, with the objective of identifying products for freeze-protection, enrichment libraries were made from frost-exposed leaves. Of 15 identified bacteria from 60 individual clones, approximately half had ice-association activities, with the great majority showing high freeze-thaw resistance. Isolates with ice nucleation activity and ice recrystallization inhibition activity were recovered. Of the latter, two (*Erwinia billingiae* J10, and *Sphingobacterium kitahiroshimense* Y2) showed culture and electron microscopic evidence of motility and/or biofilm production. Mass spectrometric characterization of the *E. billingiae* extracellular polymeric substance (EPS) identified the major proteins as 35 kDa outer membrane protein A and F, supporting its biofilm character. The addition of the EPS preparation increased the freeze-thaw survival of the more susceptible bacteria 1000-10000 times, and protection was at least partially dependent on the protein component.

MICROBIAL ACTIVITY IN THE LANDFILL SOIL

© 2012 M. Swiontek Brzezinska, A. Burkowska, M. Walczak

Department of Environmental Microbiology and Biotechnology, Institute of Ecology and Environmental Protection, Nicolaus Copernicus University, Torun, Poland
e-mail: swiontek@umk.pl

Received November 30, 2011

The research objective was to determine the activity of microorganisms in the soil exposed to direct influence of a landfill, as well as in the soil beyond its influence. Fluorescein diacetate (FDA) hydrolytic activity and respiration in the soil were determined. The highest number of cultivated bacteria was recorded at the site located within the zone of direct influence exerted by the landfill, whereas the least amount was found at a distance of 1000 metres from the landfill. In contrast, the largest numbers of molds were observed in the soil at a distance of 1000 m from the headquarters of the landfill. The highest FDA hydrolytic activity and biological oxygen demand (BOD₅) were recorded in the soil by the headquarters of the landfill, and the least parameters were revealed at a distance of 1000 m from the landfill. It was found a high correlation between the number of bacteria and FDA hydrolytic activity of soil and BOD₅ in the north-eastern of the landfill. However, in the same place, there is a low correlation between the number of molds, and FDA hydrolytic activity of soil and BOD₅.

ОБРАЗОВАНИЕ БИОГАЗА МИКРОБНЫМИ СООБЩЕСТВАМИ ПРИ РАЗЛОЖЕНИИ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ И ПИЩЕВЫХ ОТХОДОВ

© 2012 г. Е. А. Цавкелова, М. А. Егорова, Е. В. Петрова, А. И. Нетрусов

Биологический факультет Московского государственного университета им М.В. Ломоносова, Москва, 119992

e-mail: tsavkelova@mail.ru

Поступила в редакцию 24.05.2011 г.

Из 24 образцов, взятых из природных и антропогенных источников, выделено несколько активных анаэробных микробных сообществ, образующих биогаз при разложении целлюлозы и пищевых бытовых отходов (ПБО). При выращивании микробных сообществ на целлюлозе, офисной бумаге и картоне при 37°C без предобработки субстрата выход метана составил 190—260 мл СН₄/г. В мезофильных условиях биоконверсия использованного бумажного сырья завершалась образованием биогаза с содержанием метана от 47 до 63%, однако скорость образования биогаза была в 1.5—2.0 раза ниже, чем в термофильных условиях. При культивировании микробных сообществ на ПБО в термофильных условиях наиболее стабильные и эффективные из них образовывали 230—353 мл СН₄/г с содержанием метана 54—58%. Полученные результаты показали значимость проведенных исследований для разработки технологии биотрансформации бумажного сырья в биогаз и необходимость селекции микробных сообществ для повышения эффективности процесса.

УДАЛЕНИЕ ИЗ ВОЗДУХА ЛЕТУЧИХ ВЕЩЕСТВ ТАБАЧНЫХ ЛИСТЬЕВ МЕТОДОМ БИОФИЛЬТРАЦИИ

© 2012 г. Н. А. Загустина*, Т. А. Мишарина**, А. А. Веприцкий***, В. Г. Жуков*,
А. О. Ружицкий*, М. Б. Теренина**, Н. И. Крикунова**, А. К. Куликова*,
В. О. Попов*

*Институт биохимии им. АН. Баха РАН, Москва Н9071

**Институт биохимической физики им. Н.М. Эммануэля РАН, Москва

***ООО "Инновационные биотехнологии", Москва, 119071

e-mail: zagust@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 15.10.2011

Исследован состав летучих веществ различных сортов ферментированных табачных листьев и их смесей - сырья для производства табачных изделий. Показаны различия в содержании в них никотина, соланона, тетраметилгексадеценола, мегастигматриенонов и других веществ, определяющих специфические ароматические свойства табака. В лабораторном реакторе, работающем по принципу биофильтра с орошаемым слоем, в результате длительной адаптации на носителе сформировано сообщество микроорганизмов, способное осуществлять дезодорацию смоделированной воздушной смеси и деструкцию никотина. На биофильтре происходило удаление из воздуха, как 90% основного токсичного вещества никотина, так и веществ, определяющих запах. Эффективность биофильтрации не изменялась при использовании табака, с различными концентрациями летучих веществ, а также в присутствии посторонних примесей. Основные штаммы, участвующие в деструкции никотина, выделенные из сообщества микроорганизмов на биокатализаторе, принадлежали к родам *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*. Исследование орошающей жидкости показало полную деструкцию никотина и летучих органических веществ, определяющих запах. Присутствующие в орошающей жидкости вещества не обладали запахом и не были токсичны. Полученные результаты позволили осуществить масштабирование процесса биофильтрации для удаления запаха вентиляционных выбросов табачного производства.

ДЕГРАДАЦИЯ ЭДТА ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ НА БИОФИЛЬТРЕ КЛЕТКАМИ *Chelativorans oligotrophicus*

© 2012 г. Е. Н. Капаруллина, Н. В. Доронина, В. А. Ежов, Ю. А. Троценко
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН, Пушино,
Московская область 142290
e-mail: trotsenko@ibpm.pushchino.ru
Поступила в редакцию 01.07.2011 г.

Получен биофильтр на основе керамзита и клеток облигатного деструктора этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) *Chelativorans oligotrophicus* LPM-4. Культура стабильно поддерживала высокую активность ЭДТА-монооксигеназы в течение трех месяцев на уровне 180—200 нмоль мин/мг белка. На биофильтре объемом 2 дм³ при скорости протока 20 мл/ч достигнута полная конверсия ЭДТА при его концентрации 0.5—0.7 г/л и 80%-ная конверсия при исходной концентрации 2.0 г/л.

ВНЕКЛЕТОЧНАЯ β -D-ГЛЮКОЗИДАЗА МОРСКОГО ГРИБА
Penicillium canescens

© 2012 г. Ю. В. Дубровская, В. В. Сова, Н. Н. Слинкина, С. Д. Анастюк,
М. В. Пивкин, Т. Н. Звягинцева

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток 69002
e-mail: sova@piboc.dvo.ru

Поступила в редакцию 25.10.2011 г.

Из морского гриба *Penicillium canescens* в гомогенном состоянии выделена внеклеточная β -D-глюкозидаза. Согласно данным ДДС-Ка-электрофореза молекулярная масса фермента составляла 64 кДа, максимальная активность наблюдалась при рН 5.2 и 70°C. Глюкозидаза катализировала гидролиз β -гликозидных связей как в гликозидах, так и дисахаридах глюкозы и обладала трансгликозилирующей активностью. Фермент может быть использован для дегликозилирования природных гликозидов и в ферментативном синтезе новых углеводсодержащих соединений.

**FUSANT *Trichoderma HF9* WITH ENHANCED EXTRACELLULAR CHITINASE
AND PROTEIN CONTENT**

© 2012 N. Balasubramanian*, V. Thamil Priya**, S. Gomathinayagam*, D. Lalithakumari*

*Centre for Advanced Studies in Botany, University of Madras, Guindy campus,
Chennai-600 025, India,

** Department of Chemistry, A.V.V.M. Sri Pushpam College, Poondi- 613503, Thanjavur,
Tamil Nadu, India

e-mail: yenbala2007@gmail.com

Received September 27, 2011

Strain improvement was carried out to obtain higher chitinase and protein by inter-specific protoplast fusion between *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride*. Fusant HF9 and parental strains of *Trichoderma* were compared for chitinase and protein production. 1% of glucose, sucrose and fungal cell wall (*Rhizoctonia solani*), were used as carbon source for cultivation of *Trichoderma* and fungal cell wall was the best to induce chitinase and protein. Usage of 0.5% colloidal chitin for the fungal growth under aerated conditions at pH 6.5 and 28°C led to higher chitinase and protein production. In these conditions fusant *Trichoderma HF9* in comparison with parent strains had 3-, 2.5- and 1.5-fold increase of total chitinase, specific chitinase and protein, respectively. SDS-PAGE analysis revealed that it had 9 major protein bands with up-regulation compared to parent strains. Amino acid analysis showed that protein of culture filtrate of *T. harzianum*, *T. viride* and fusant *Trichoderma HF9* had 8, 6 and 10 amino acids, respectively. The results obtained suggested that fusant HF9 could be an integration of *T. harzianum* and *T. viride* through protoplast fusion.

ОЧИСТКА ХИМЕРНОГО БЕЛКА АЛЬБУРОНА16 ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЫ ДРОЖЖЕЙ *Pichia pastoris*

© 2012 г. **А. В. Карабельский, М. В. Падкина**

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034
e-mail: karabelsky@gmail.com

Поступила в редакцию 10.10.2011 г.

Разработаны условия выделения химерного белка Альбурона16 (альбумин-интерферон-альфа 16 человека) из культуральной среды дрожжей *Pichia pastoris*, при которых не происходит агрегации белка и сохраняется его биологическая активность. Предложенная схема может быть использована для выделения и очистки химерного белка в лабораторных условиях. Полученные результаты могут быть полезны для усовершенствования способов очистки различных рекомбинантных белков, синтезируемых и секретируемых дрожжами *P. pastoris*.