

ПОЛУЧЕНИЕ БИОГАЗА ИЗ ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩИХ СУБСТРАТОВ (ОБЗОР)

© 2012 г. **Е. А. Цавкелова, А. И. Нетрусов**

*Биологический факультет Московского государственного университета им
М.В. Ломоносова, Москва, 119992
e-mail: tsavkelova@mail.ru*

Поступила в редакцию 20.12.2011 г.

Анаэробная микробная трансформация органических субстратов, приводящая к получению различных видов биотоплива, в настоящее время занимает одно из ведущих мест среди исследований, посвященных поиску и использованию альтернативных источников энергии. Получение биогаза имеет ряд преимуществ перед другими технологиями, так как метаногенные сообщества способны потреблять различные виды органических субстратов, а сам процесс трансформации приводит к утилизации отходов, сокращению эмиссии парниковых газов и получению высококачественных удобрений. Целлюлозосодержащие материалы являются одними из наиболее перспективных субстратов, однако для их полноценного использования существует ряд нерешенных вопросов, касающихся полноты их утилизации, улучшения качества и объема продукции биогаза, а также сохранения стабильности и повышения функциональной активности микробных сообществ. В обзоре представлена информация о микроорганизмах, входящих в состав целлюлозоразрушающих метаногенных сообществ, ферментных комплексах, необходимых анаэробам для гидролиза волокон целлюлозы, о способах предобработки сырья, доступность для биоразложения которого значительно снижается в присутствии лигнина. На примерах образования биогаза из различного типа растительной и бумажной продукции (офисная бумага, картон) рассмотрены способы повышения продуктивности используемых микроорганизмов при оптимизации условий их культивирования.

КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НИТРИЛГИДРАТАЗЫ, ИММОБИЛИЗОВАННОЙ НА АКТИВИРОВАННОМ ХИТОЗАНЕ

© 2012 г. **Ю. Г. Максимова***, **Т. А. Рогожникова****, **Г. В. Овечкина***,
А. Ю. Максимов*, **В. А. Демаков***

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

e-mail: maks@iegmt.ru

***Пермский государственный университет, Пермь, 614990*

Поступила в редакцию 29. 06. 2011 г.

Исследованы каталитические свойства нитрилгидратазы, изолированной из штамма *Rhodococcus ruber* gt1 и иммобилизованной методом ковалентной сшивки с хитозаном, активированным 0.1%-ным раствором бензохинона. Определены кинетические параметры реакции гидратации акрилонитрила, катализируемой иммобилизованной нитрилгидратазой и ферментом в растворе. Установлено, что иммобилизация не приводит к снижению максимальной скорости реакции ($K_{\text{макс}}$), тогда как константа Михаэлиса (K_m) уменьшается в 2.4 раза. Показана возможность многократного использования иммобилизованного фермента на протяжении 50 последовательных циклов трансформации акрилонитрила, причем активность нитрилгидратазы в 50 цикле превышала таковую в первом цикле в 3.5 раза. Показано, что влияние температуры на

активность зависело от концентрации фермента, что подтверждает диссоциативный характер инактивации нитрилгидратазы. Обнаружено, что иммобилизованная нитрилгидратаза сохраняет активность при pH 3.0—4.0, тогда как фермент в растворе в этих условиях инактивируется. Полученный биокатализатор может эффективно использоваться для получения акриламида из акрилонитрила.

PRODUCTION OF CELLULASE BY IMMOBILIZED WHOLE CELLS OF *Haloarcula*

© 2012 **A. Ogan***, **O. Danis***, **A. Gozuacik***, **E. Cakmar***, **M. Birbir****

* *Faculty of Arts and Sciences, Chemistry Department, Marmara University, 34722
Goztepe-Istanbul, Turkey*

** *Faculty of Arts and Sciences, Biology Department, Marmara University, 34722
Goztepe-Istanbul, Turkey*

e-mail: aogan@marmara.edu.tr

Received August 29, 2011

Halophilic Archaea are adapted to a life in the extreme conditions and some of them are capable of growth on cellulosic waste as carbon and energy source by producing cellulase enzyme. The production of cellulase using free and immobilized cells of halophilic archaeal strain *Haloarcula* 2TK2 isolated from Tuzkoy Salt Mine and capable of producing cellulose was studied. The cells were cultured in a liquid medium containing 2.5 M NaCl to obtain the maximum cellulase activity and immobilized on agarose or polyacrylamide or alginate. Optimal salt dependence of free and immobilized cells of *Haloarcula* 2TK2 was established and the effects of pH and temperature were investigated. Immobilization to Na-alginate enhanced the enzymatic activity of the haloarchaeal cells when compared to free cells and other polymeric supports. From the results obtained it is reasonable to infer that decomposition of plant polymers into simpler end products does occur at high salinities and cellulase producing haloarchaeal cells may be potentially utilized for the treatment of hypersaline waste water to remove cellulose.

FRUCTOSE 6-PHOSPHATE PHOSPHOKETOLASE ACTIVITY IN WILD-TYPE STRAINS OF *Lactobacillus*, ISOLATED FROM THE INTESTINAL TRACT OF PIGS

© 2012 **E. Bolado-Martinez***, **E. Acedo-Felix****, **A. B. Peregrino-Uriarte****,
G. Yepiz-Plascencia**

* *University of Sonora, Department of Chemical-Biological Sciences, 83000 Hermosillo,
Sonora, Mexico*

** *Research Center for Food and Development, CP 83000, Hermosillo, Sonora, Mexico
e-mail: evelia@ciad.mx*

Received May 27, 2011

Phosphoketolases are key enzymes of the phosphoketolase pathway of heterofermentative lactic acid bacteria, which include lactobacilli. In heterofermentative lactobacilli xylulose 5-phosphate phosphoketolase (X5PPK) is the main enzyme of the phosphoketolase pathway. However, activity of fructose 6-phosphate phosphoketolase (F6PPK) has always been considered absent in lactic acid bacteria. In this study, the F6PPK activity was detected in 24 porcine wild-type strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus mucosae*, but not in the *Lactobacillus salivarius* or in *L. reuteri* ATCC strains. The activity of F6PPK increased after

treatment of the culture at low-pH and diminished after porcine bile-salts stress conditions in wild-type strains of *L. reuteri*. Colorimetric quantification at 505 nm allowed to differentiate between microbial strains with low activity and without the activity of F6PPK. Additionally, activity of F6PPK and the X5PPK gene expression levels were evaluated by real time PCR, under stress and nonstress conditions, in 3 *L. reuteri* strains. Although an exact correlation, between enzyme activity and gene expression was not obtained, it remains possible that the *xpk* gene codes for a phosphoketolase with dual substrate, at least in the analyzed strains of *L. reuteri*.

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА АДГЕЗИВНУЮ АКТИВНОСТЬ РОДОКОККОВ В ОТНОШЕНИИ Н-ГЕКСАДЕКАНА

© 2012 г. Е. В. Рубцова*, М. С. Куюкина***, И. Б. Ившина* **

* Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, 614990

** Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, 614081,
e-mail: kuyukina@iegm.ru

Поступила в редакцию 18. 01. 2012 г.

Исследовано влияние условий роста (состав, кислотность, соленость питательной среды, температура и гидродинамический режим культивирования) на адгезию актинобактерий рода *Rhodococcus* к н-гексадекану. Проведенные исследования показали, что адгезивная активность родококков зависит от состава питательной среды и температуры их культивирования. Обсуждены возможные механизмы влияния ростовых условий на адгезию родококков к жидким углеводородам посредством изменения содержания клеточных липидов и зета-потенциала клеток. В результате исследования отобраны штаммы родококков, обладающие высокой (80—90%) адгезивной активностью при пониженной температуре (18°C), высокой солености (5.0% NaCl) и кислотности (pH 6.0) питательной среды, которые могут быть перспективны для использования в биотехнологиях очистки загрязненных углеводородами почв и вод.

DEGRADATION OF NICOSULFURON BY *Bacillus subtilis* YB1 AND *Aspergillus niger* YF1

© 2012 X. H. Lu*, Z. H. Kang*, B. Tao*, Y. N. Wing*, J. G. Dong**, J. L. Zhang*

*College of Plant Protection, of Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China

**College of Life Sciences of Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China

e-mail: zhangjinlin@hebau.edu.cn

Received November 30, 2011

The optimal degrading conditions for the nicosulfuron degradation by *Bacillus subtilis* YB1 and *Aspergillus niger* YF1, and site of their action on nicosulfuron were studied. The results showed that the degradation efficiency of free cells of *B. subtilis* YB1 and *A. niger* YF1 was respectively 87.9 and 98.8% in basic medium III containing 2 mg/l of nicosulfuron after inoculation with 1 ml of culture containing 2.3 x 10⁸ CFU/ml and incubation for 5 days at 35°C. Moreover, the degradation rate of nicosulfuron by the mixture of microorganisms was much higher than for every of them taken separately in the same conditions. The mass spectrometric analysis of the

products degraded by *B. subtilis* YB 1 revealed that the sulfonylurea bridge in nicosulfuron molecule had been broken. Extracellular (EXF) and endocellular (ENF) fractions obtained from bacterium and fungus were tested for the ability to degrade nicosulfuron. The degradation efficiency of fractions extracted from *B. subtilis* YB1 was 66.8% by EXF and 15.8% by ENF, but neither EXF nor ENF extracted from *A. niger* YF1 had the activity of degrading nicosulfuron.

**ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМНОГО ФРАГМЕНТА,
УЧАСТВУЮЩЕГО В АЭРОБНОЙ ДЕГРАДАЦИИ ДИХЛОРМЕТАНА
Methylobacterium dichloromethanicum ДМ4**

© 2012 г. Ю. Е. Фирсова, Д. Н. Фёдоров, Ю. А. Троценко

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН,

Пушино, Московская обл., 142290

e-mail: trotsenko@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 14.01.2012 г.

Исследованы гипотетические гены *Methylobacterium dichloromethanicum* ДМ4 METDI 2671 (*bioD*₂) и METDI2680 в составе хромосомного фрагмента (126 т.п.н.), связанного с деградацией дихлорметана (ДХМ). Методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) показано, что в клетках, выращенных как на ДХМ, так и на метаноле, присутствуют транскрипты обоих генов. С использованием мобилизуемого суицидного вектора рК18mob получены нокаут-мутанты по этим генам. Мутант БИО (с инсерцией в гене *bioD*₂) после культивирования на метаноле характеризовался пониженной скоростью роста на ДХМ по сравнению со штаммом ДМ4 дикого типа, в то время как мутант МТ (с инсерцией в гене METDI 2680) не отличался по этим показателям от исходного штамма. Результаты свидетельствуют об участии гена *bioD*₂ в биосинтезе биотина, сопряженном с деградацией ДХМ.

**CLONING AND BIOINFORMATIC ANALYSIS OF AN ACIDOPHILIC
β-MANNANASE GENE, *Anman5a*, FROM *Aspergillus niger* LW-1**

© 2012 S. G. Zhao, M. C. Wu, C. D. Tang, S. J. Gao, H. M. Zhang, J. F. Li

Jiangnan University, 214122 China

e-mail: biowmc@126.com; lijf@163.com

Received September 30, 2011

Using 3' and 5' rapid amplification of cDNA ends (RACE) techniques, the full-length cDNA sequence of the *Anman5A*, a gene that encodes an acidophilic β-mannanase of *Aspergillus niger* LW-1 (abbreviated to AnMan5A), was identified from the total RNA. The cDNA sequence was 1417 bp in length, harboring 5'- and 3'-untranslated regions, as well as an open reading frame (ORF) which encodes a 21-aa signal peptide, a 17-aa propeptide and a 345-aa mature peptide. Based on the topology of the phylogenetic tree of β-mannanases from glycoside hydrolase (GH) family 5, the AnMan5A belongs to the subfamily 7 of the GH family 5. Its 3-D structure was modeled by the bitemplate-based method using both MODELLER 9.9 and SALIGN programs, based on the known β-mannanase crystal structures

of *Trichoderma reesei* (1QNO) and *Lycopersicon esculentum* (1RH9) from the GH family 5. In addition, the complete DNA sequence of the *Anman5A* was amplified from the genomic DNA using the pUCm-T vector-mediated PCR and conventional PCR methods. The DNA sequence was 1825 bp in length, containing a 5'-flanking regulatory region, 2 introns and 3 exons when compared with the full-length cDNA.

PRODUCTION OF POLY(3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE) DEPOLYMERASE FROM *Aspergillus* sp. NA-25

© 2012 A. Nadhman, F. Hasan, Z. Shah, A. Hameed, A. A. Shah

Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Quaid-i-Azam University,
Islamabad 45320, Pakistan

e-mail: alishah_75@yahoo.com

Received December 8, 2011

Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) degrading thermophilic fungus was isolated from soil sample collected from waste disposal site, Islamabad, Pakistan. It was able to grow efficiently on a medium containing PHBV as a sole source of carbon and has been identified as *Aspergillus* sp. NA-25 by 18S rR-NA. Using 9% of inoculum maximum production of PHBV depolymerase was observed at 45°C, pH 7.0 in the presence of 0.2% lactose as an additional carbon source. PHBV depolymerase was purified by precipitation with 80% ammonium sulfate and gel filtration chromatography on Sephadex G-75. The four enzyme forms obtained after gel filtration were analyzed on SDS-PAGE and their molecular weights (36, 68, 72 and 90 kDa) were determined. They were characterized on the basis of effect of different temperatures, pH, metal ions and different reagents on the PHBV activity and stability. It is obvious that the fungal strain *Aspergillus* sp. NA-25 is capable of degrading PHBV with the help of different types of depolymerases.

МИКРОМИЦЕТЫ *Aspergillus ochraceus* - ПРОДУЦЕНТЫ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕИНАЗ - АКТИВАТОРОВ ПРОТЕИНА С ПЛАЗМЫ КРОВИ

© 2012 г. А.А. Осмоловский*, В.Г. Крейер*, А.В. Кураков*, Н.А. Баранова*,
Н.С. Егоров**

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

e-mail: aosmol@mail.ru

Поступила в редакцию 28.12.2011 г.

Проведен скрининг природных изолятов микромицетов *Aspergillus ochraceus* из почв и растительных остатков разных регионов. Выделенные штаммы характеризовались сходными культурально-морфологическими свойствами и идентичной нуклеотидной последовательностью по участку ITS 1-5, 8S-ITS2 рДНК. Установлена способность внеклеточных протеиназ микромицетов *A. ochraceus* активировать протеин С плазмы крови. Выявлены различия в накоплении протеиназ с активаторной к протеину С активностью и протеиназ с тромбиноподобной и плазминоподобной активностью в динамике роста продуцентов.

СОЗДАНИЕ КОМПЛЕКСНЫХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПЕКТИНАЗ И ЦЕЛЛЮЛАЗ ДЛЯ ПЕРЕРАБОТКИ СВЕКЛОВИЧНОГО ЖОМА

© 2012 г. Е. В. Бушина*, А. М. Рожкова**, И. Н. Зоров**, А. Д. Сатрутдинов**, А. О. Беккаревич***, А. В. Кошелев***, О. Н. Окунев***, А. П. Сеницын*

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

e-mail: info@rector.msu.ru

**Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, 119071

e-mail: inbi@inbi.ras.ru

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

Поступила в редакцию 08.11.2011 г.

На основе рекомбинантных штаммов грибов *Penicillium canescens*, получены комплексные ферментные препараты, обладающие активностью гомологичной пектинлиазы А, гетерологичных эндо-1,4-β-глюканазы *Penicillium verruculosum* и β-глюкозидазы *Aspergillus niger*. В работе были реализованы два подхода: создание ферментного препарата на основе нового штамма — продуцента всех трех ферментов и получение ферментного препарата путем совместного культивирования трех штаммов — продуцентов каждого отдельного фермента.

Проведено сравнение осаживающей способности этих ферментных препаратов по отношению к свекловичному жому. Наибольшей эффективностью обладал ферментный препарат, полученный в результате совместного культивирования штаммов — (моно)продуцентов, по сравнению с ферментным препаратом, полученным с помощью штамма-продуцента трех ферментов.

ИНДУКЦИЯ ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТИ КОЛЕОПТИЛЕЙ ПШЕНИЦЫ САЛИЦИЛОВОЙ И ЯНТАРНОЙ КИСЛОТАМИ: СВЯЗЬ ЭФФЕКТОВ С ОБРАЗОВАНИЕМ И ОБЕЗВРЕЖИВАНИЕМ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

© 2012 г. Ю. Е. Колупаев, Т. О. Ястреб, Н. В. Швиденко, Ю. В. Карпец

Харьковский национальный аграрный университет им. В. В. Докучаева,

Харьков 62483, Украина

e-mail: plant_biology@mail.ru

Поступила в редакцию 11.11.2011 г.

Изучено влияние салициловой и янтарной кислот (СК и ЯК) на генерацию активных форм кислорода (АФК) колеоптилями пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и их устойчивость к повреждающему нагреву. Обработка колеоптилей СК и ЯК в концентрации 10 мкМ приводила к усилению образования супероксидного анион-радикала и накоплению в них пероксида водорода. Данный эффект частично подавлялся как ингибитором НАДФН-оксидазы α-нафтолом, так и ингибитором пероксидазы салицилгидроксамовой кислотой. Под влиянием СК и ЯК повышались активность антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы, каталазы и растворимой пероксидазы, а также и теплоустойчивость колеоптилей. Антиоксидант ионол, ингибиторы НАДФН-оксидазы и пероксидазы существенно снижали положительное влияние СК и ЯК на теплоустойчивость колеоптилей пшеницы. Сделано заключение, что посредниками в индуцировании теплоустойчивости при обработке колеоптилей СК и ЯК являются АФК, усиление образования которых может быть обусловлено повышением активности НАДФН-оксидазы и пероксидазы.

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ АДСОРБЦИИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ НА АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ

© 2012 г. Ю. Н. Тараканова*, Д. А. Дмитриев*, Ю. С. Массино*,
М. Б. Смирнова**, О. Л. Сегал**, О. В. Фартушная*, Д. А. Яковлева*,
Г. И. Коляскина***, В. Ф. Лавров*, А. Д. Дмитриев*

* Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН,
Москва, 105064

** Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва

*** Научный центр психического здоровья РАМН, Москва

e-mail: add0547@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.11.2011 г.

Исследована антигенсвязывающая активность иммобилизованных антител в зависимости от pH насыщающего буфера. Проанализировано 28 моноклональных антител (МКА), секретированных различными гибридами к трем вирусным антигенам: ядерный белок р23 вируса гепатита С (С core-protein р23), белок р24 ВИЧ 1 и поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg). Антитела адсорбировали на поверхности иммунных планшетов в кислом (pH 2.8), нейтральном (pH 7.5) и щелочном (pH 9.5) буферах. Проведено тестирование связывания меченых антигенов (биотинилированные или конъюгированные с пероксидазой хрена) с иммобилизованными антителами. Показано, что 10 из 28 (36%) проанализированных МКА значительно лучше сохраняли антигенсвязывающую активность, если процесс их пассивной адсорбции на поверхности полистироловых планшетов происходил в кислом буфере (pH 2.8). Этот подход позволил сконструировать высокочувствительный сэндвич-метод определения HBsAg с минимальной, достоверно определяемой концентрацией антигена - 0.013-0.017 нг/мл. Описанный прием может быть рекомендован для оптимизации сэндвич-методов и твердофазных конкурентных методов.

СРАВНЕНИЕ АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ИОНОЛА, КОМПОНЕНТОВ СВЕЖЕГО ИМБИРЯ И ЕГО ЭКСТРАКТОВ

© 2012 г. Е. С. Алинкина, Т. А. Мишарина, Л. Д. Фаткуллина, Е. Б. Бурлакова

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва 119334

e-mail: tmish@rambler.ru

Поступила в редакцию 30.11.2011 г.

Изучены антирадикальные свойства трех препаратов из имбиря (*Zingiber officinale* R.): сока свежего корня имбиря, эфирного масла и экстракта (олеорезина) корня имбиря и сопоставлены со свойствами синтетического антиоксиданта — ионола. В качестве модельной системы использовали реакцию антиоксидантов со стабильным свободным 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил радикалом. Определены эквивалентные концентрации антирадикальных компонентов в препаратах имбиря, величины ЕС₅₀ и величины антирадикальной эффективности АЕ. Полученные величины ЕС₅₀ и АЕ для олеорезина имбиря и ионола были близки между собой и характерны для высокоактивных природных антиоксидантов, эти же величины для эфирного масла и сока имбиря были на 2 порядка меньше. По кинетическим параметрам препараты имбиря относятся к антирадикальным соединениям пролонгированного действия.

**ХАРАКТЕРИСТИКА РЕЦЕПТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ
БИОСЕНСОРОВ ПРИ ДВУХ СПОСОБАХ ИММОБИЛИЗАЦИИ
МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖЕЙ**

© 2012 г. М. Г. Зайцев*, В. А. Арляпов*, В. А. Алфёров*, А. Н. Решетилов**

* Тульский государственный университет, г. Тула, 300600

** Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
Московская обл., г. Пущино, 142290
e-mail: anatol@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 30.09.2011 г.

Рецепторные элементы биосенсора на основе дрожжевых клеток *Hansenula polymorpha* NCYC 495 In для определения этанола формировали, применяя два типа иммобилизации клеток: физическую адсорбцию на мембране из стекловолокон и пришивку на модифицированной нитроцеллюлозной мембране. Линейный диапазон определения этанола для биорецептора на основе дрожжей, адсорбированных на стекловолокне, составил 0.05—1.18 и 0.2—1.53 мМ для биорецептора на основе дрожжей, иммобилизованных на нитроцеллюлозной мембране. Рецепторные элементы на основе сорбированных клеток обладали в 2.5 раза более высокой долговременной стабильностью. Время отклика было в 1.5 раза меньше у клеток, иммобилизованных с помощью ДЭАЭ-декстрана и бензохинона. Результаты определения этилового спирта биосенсорами на основе иммобилизованных адсорбцией и пришивкой клеток, а также стандартным ареометрическим методом имели высокую корреляцию (0.998 и 0.997 соответственно для двух методов иммобилизации). Полученные результаты свидетельствуют о возможности рассматривать описанные модели рецепторных элементов биосенсоров как прототипы опытных образцов для выхода в практику.