

## **АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА МОДЕЛЯХ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК (ОБЗОР)**

© 2012 г. **К. В. Лисицкая, И. В. Николаев, А. А. Торкова, В. О. Попов, О. В. Королёва**  
*Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, 119071*  
*e-mail: koroleva@inbi.ras.ru, Iisksenia@mail.ru*  
Поступила в редакцию 19.03.2012 г.

Представлен анализ современных данных по исследованию функциональных свойств биологически активных веществ в модельных системах на основе культивируемых клеток человека. Систематизированы сведения о практическом использовании клеточных культур для оценки различных функциональных свойств биологически активных веществ: антиоксидантных, иммуномодулирующих, про- и пребиотических, химиофилактических. Рассмотрены наиболее перспективные направления использования культивируемых клеток для исследования функциональных свойств, а также трехмерных клеточных моделей.

## **ПОЛУЧЕНИЕ ГОМОГЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ИЗОФОРМ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ БАКТЕРИЙ *Sphaerotilus natans* ШТАММ Д-507**

© 2012 г. **А. Т. Епринцев, Т. Л. Ву, Н. В. Селиванова, А. Хасан Хамад**  
*Воронежский государственный университет, Воронеж, 394006,*  
*e-mail: bc366@bio.vsu.ru*  
Поступила в редакцию 26.01.2012 г.

Из бесцветных серных бактерий *Sphaerotilus natans* Д-507, культивируемых органотрофно, получены ферментные препараты двух изоформ СДГ с удельной активностью 22.00 Е/мг белка и 14.75 Е/мг белка. Выявлено, что обе формы сукцинатдегидрогеназы являются гетеротетрамерами с молекулярной массой субъединиц 70.8; 35.0; 31.8 и 16.2 кДа. Значения  $K_m$  для первой и второй изоформ составили 0.615 и 0.531 мМ соответственно, а оптимальное значение рН 7.2. Установлено, что активирующий эффект на активность СДГ проявляет ион  $Cl^-$ , что может быть объяснено специфической химической модификацией белковой молекулы фермента. Полученные результаты позволяют предположить, что выделенные формы фермента входят в состав разных мультиферментных комплексов, обеспечивающих функционирование цикла трикарбоновых кислот и глюконеогенеза. Препараты СДГ могут использоваться для регенерации нуклеотидных коферментов при исследовании других ферментных систем или при моделировании *in vitro* надмолекулярных структур клетки.

## ОЧИСТКА И ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТАНОЛДЕГИДРОГЕНАЗЫ РИЗОСФЕРНОГО ФИТОСИМБИОНТА *Methylobacterium nodulans*

© 2012 г. Т. А. Кузнецова\*\*, А. П. Бесчастный\*, О. Н. Понаморёва\*\*, Ю. А. Троценко\*  
\*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушchino,  
142290

\*\*Тульский государственный университет, Тула, 300600  
e-mail: trotsenko@ibpm.pushchino.ru  
Поступила в редакцию 05.05.2012 г.

Метанолдегидрогеназа (МДГ) факультативно-метилотрофного ризосферного фитосимбионта *Methylobacterium nodulans* впервые очищена до электрофоретически гомогенного состояния и охарактеризована. Молекулярная масса нативного белка -70 кДа и состоит из большой (60 кДа) и малой (6 кДа) субъединиц. Очищенный белок имел спектр идентичный с пирролохинолинхинон (ПХХ) - содержащими МДГ, рI - 8.7, рН-оптимум в пределах 9-10. Фермент неактивен в отсутствие аммония или метиламина, проявлял широкую субстратную специфичность по отношению к C<sub>1</sub>—C<sub>5</sub> спиртам, наибольшее сродство к метанолу ( $K_M = 70$  мкМ), но не окислял бензиловый и вторичные спирты. Кажущиеся значения  $K_M$  к первичным спиртам возрастали с длиной углеродной цепи. Фермент характеризовался высокой стабильностью даже в отсутствие субстрата. Имобилизованный фермент был использован для амперометрической детекции метанола.

## КАТАЛАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ

© 2012 г. О. А. Гоголева, Н. В. Немцева, О. В. Бухарин  
Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, г. Оренбург, 460000  
olik-g@yandex.ru, ikvs@mail.esoo.ru  
Поступила в редакцию 21.11.2011 г.

Изучена динамика каталазной активности углеводородоокисляющих бактерий *Gordona terrae*, *Rhodococcus rubropertinctus* и *Rhodococcus erythropolis* в процессе деструкции нефтепродуктов. Экспериментально установлена прямая зависимость между снижением каталазной активности углеводородоокисляющих микроорганизмов и интенсивностью деструкции нефтепродуктов. Найденная зависимость позволяет рассматривать каталазную активность бактерий в качестве индикатора начального этапа окисления нефтепродуктов и может найти применение при выборе штаммов-деструкторов с целью создания биопрепаратов, пригодных для ремедиации природных экосистем.

## **ХАРАКТЕРИСТИКА И ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИОЦИНОВ, ОБРАЗУЕМЫХ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-К**

© 2012 г. Е. А. Устюгова\*, А. В. Тимофеева\*\*, Л. Г. Стоянова\*, А. И. Нетрусов\*,  
Г. С. Катруха\*\*\*

\*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический  
факультет, Москва 119992

\*\*Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского  
Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва 119991

\*\*\*ФГБУ научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков  
им. Г.Ф. Гаузе РАМН, Москва 119021

e-mail: [ustyugova.katya@mail.ru](mailto:ustyugova.katya@mail.ru), [stoyanovamsu@mail.ru](mailto:stoyanovamsu@mail.ru)

Поступила в редакцию 26.01.2012 г.

Установлено, что штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-К обладал способностью к образованию двух бактериоцинов, один из которых был идентифицирован как известный лантибиотик низин А, а другой бактериоцин 194-D представлял собой полипептид с молекулярной массой 2589 Да и состоял из 20 аминокислотных остатков. Оба бактериоцина в различном соотношении образовывались на всех изученных питательных средах, поддерживающих рост продуцента. В зависимости от среды культивирования содержание низина А в культуральной жидкости штамма 194-К было в 380—1123 раз меньше, чем пептида 194-D. Бактериоцин 194-D в отличие от низина А обладал широким спектром антибактериального действия и подавлял рост как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Показано, что оптимальной средой для синтеза бактериоцина 194-D была ферментационная среда, содержащая глюкозу, дрожжевой экстракт, гидролизат казеина и фосфат калия. Биосинтез бактериоцина 194-D штаммом 194-К на этой среде происходил параллельно росту продуцента, а максимальное накопление его в культуральной жидкости наблюдали к 14—20 ч роста штамма.

## **ДЕГРАДАЦИЯ ЭДТА И ЕГО КОМПЛЕКСОВ С МЕТАЛЛАМИ ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ БАКТЕРИЙ *Chelativorans* *oligotrophicus* LPM-4**

© 2012 г. Т. П. Кувичкина, Е. Н. Капаруллина, Н. В. Доронина, Ю. А. Троценко,  
А. Н. Решетилов

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН

Пушино, Московская область, 142290,

e-mail: [kuv@ibpm.pushchino.ru](mailto:kuv@ibpm.pushchino.ru)

Поступила в редакцию 28.11.2011 г.

Рассмотрена ферментативная окислительная деградация ЭДТА и его комплексов с металлами, осуществляемая иммобилизованными клетками облигатного деструктора

*Chelativorans oligotrophicus* LPM-4. Полярнографическим методом зарегистрировано потребление кислорода клетками. Впервые показано, что комплексы Cd-ЭДТА и Ni-ЭДТА подвергаются деградации изучаемыми бактериями.

## **СИНТЕЗ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 НА ЭТАНОЛЕ В ПРИСУТСТВИИ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ**

© 2012 г. Т. П. Пирог\*, Т. А. Шевчук\*, А. Д. Конон\*\*, Е. Ю. Долотенко\*\*

\*Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, Киев, 03680

\*\*Национальный университет пищевых технологий, Киев, 01601

e-mail: tapirog@nuft.edu.ua

Поступила в редакцию 19.09.2011 г.

Изучено влияние фумарата (C<sub>4</sub>-дикарбоновая кислота, предшественник глюконеогенеза) и цитрата (регулятор синтеза липидов) на образование поверхности о-активных веществ (ПАВ) при культивировании *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 на этаноле. Установлено, что одновременное внесение фумарата и цитрата (0.01-0.02%) в конце экспоненциальной фазы роста штамма К-4 на среде с этанолом (2% по объему) сопровождалось увеличением условной концентрации ПАВ на 45—55% по сравнению с показателями синтеза на среде без органических кислот.

## **ОКИСЛЕНИЕ СЕРОСОДЕРЖАЩИХ СУБСТРАТОВ АБОРИГЕННЫМ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО СОЗДАННЫМ СООБЩЕСТВАМИ МИКРООРГАНИЗМОВ**

Т. А. Пивоварова\*, А. Г. Булаев\*, П. В. Рощупко\*, А. В. Белый\*\*, Т. Ф. Кондратьева\*

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

e-mail: Kondr@inmi.ru

\*\*ЗАО "Полюс", Красноярск

Поступила в редакцию 26.01.2012 г.

Исследовано аборигенное и экспериментальное сообщество ацидофильных хемолитотрофов, созданное на основе чистых культур микроорганизмов. Наблюдали окисление элементарной серы, тиосульфата натрия и тетрагидрата калия в качестве единственных источников энергии. У экспериментального сообщества окисление протекало с большей скоростью, чем у аборигенного сообщества, выделенного из флотоконцентрата пирротинсодержащей пиритно-арсенопиритной золотомышьяковой сульфидной руды.

Степень окисления S-субстратов экспериментальным сообществом микроорганизмов составила 17.91, 68.30 и 93.94%, аборигенным сообществом - 10.71, 56.03 и 79.50% соответственно. Степень окисления сульфидных форм серы в флотоконцентрате руды аборигенным сообществом микроорганизмов составила 59.15%, а экспериментальным сообществом микроорганизмов — 49.40%. Несмотря на более высокую скорость окисления S-субстратов в качестве единственных источников энергии экспериментальным сообществом микроорганизмов, аборигенное сообщество с большей скоростью окисляло S-субстраты во флотоконцентрате пирротинсодержащей пиритно-арсенопиритной золотомышьяковой сульфидной руды, из которого оно было выделено. Из сульфидных минералов в процессе бактериально-химического окисления флотоконцентрата аборигенным сообществом микроорганизмов извлечено дополнительно 32.3% золота, что на 5.7% больше, чем в случае применения экспериментального сообщества микроорганизмов.

**PURIFICATION, CHARACTERISATION AND COAL  
DEPOLYMERISATION ACTIVITY OF LIGNIN PEROXIDASE FROM  
*Lenzitus betulina* MTCC-1183**

**M. Yadav, S. K. Singh, and S. Yadava**

*D.D.U. Gorakhpur University, Gorakhpur, 273009, India*

*e-mail: drmeerayadav@rediffmail.com*

Received February 14, 2012

Lignin peroxidase from the culture filtrate of *Lenzitus betulina* MTCC 1183 has been purified to homogeneity using concentration by ultrafiltration and anion exchange chromatography on DEAE cellulose. The molecular weight of the purified lignin peroxidase using SDS-PAGE analysis was 43 kDa. Specific activity of the enzyme was 29.58 IU/mg. The  $K_m$  values for veratryl alcohol and  $H_2O_2$  for the purified enzyme were 54  $\mu M$  and 81  $\mu M$ , respectively. The  $k_{cat}$  value of the purified enzyme was 2.3  $s^{-1}$  using 3,4-dimethoxybenzyl alcohol as the substrate. The optimal conditions for the lignin peroxidase assay were detected at pH 2.4 and 22<sup>o</sup> C. Thermal stability of the purified enzyme has also been studied and its activation energy for deactivation was 287 kJ/mol. The purified lignin peroxidase depolymerised humic acid in presence of  $H_2O_2$ . Depolymerisation of coal by the *L. betulina* MTCC-1183 has been demonstrated using humic acid as a model of coal.

# **РАЗРАБОТКА ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ЭКСПРЕССНОЙ ДЕТЕКЦИИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДНОГО АНТИГЕНА И КЛЕТОК ВОЗБУДИТЕЛЯ БРУЦЕЛЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

© 2012 г. Н. А. Вызова\*, А. В. Жердев\*, С. З. Ескендинова\*\*, К. К. Балтий\*\*, Г. Б. Унышева\*\*, К. К. Муканов\*\*, Е. М. Раманкулов\*\*, Б. Б. Дзангиев\*

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

*e-mail: nbyzova@inbi.ras.ru*

*\*\*Национальный центр биотехнологии РК, Астана, Казахстан, 010000*

Поступила в редакцию 16.04.2012 г.

Разработан экспресс-метод детекции поверхностного липополисахаридного антигена и клеток возбудителя бруцеллеза крупного рогатого скота, представляющий собой иммунохроматографический анализ в "сэндвич"-формате. Контакт пробы и тест-полоски с нанесенными иммунореагентами инициирует движение жидкости по мембранным компонентам тест-полоски, иммунохимические взаимодействия и формирование окрашенных зон. Показано, что данный метод позволяет за 10 мин определять липополисахаридный антиген клеточной стенки возбудителя бруцеллеза в концентрациях до 10 нг/мл и клетки *Brucella abortus* в концентрациях до 10<sup>6</sup> кл./мл (5 × 10<sup>4</sup> кл. в пробе). Подтверждена специфичность иммунодетекции. Разработанная тест-система может быть использована при внелабораторной экспресс-диагностике бруцеллеза крупного рогатого скота.

# **ПРОЛОНГИРОВАННОЕ ВЫСВОБОЖДЕНИЕ ХЛОРАМБУЦИЛА И ЭТОПОЗИДА ИЗ ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОСФЕР НА ОСНОВЕ ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА**

© 2012 г. Е. В. Филатова\*, С. Г. Яковлев\*, А. П. Бонарцев\*\*\*, Т. К. Махина\*, В. Л. Мышкина\*, Г. А. Бонарцева\*

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

*e-mail: bonar@inbi.ras.ru*

*\*\*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119992*

Поступила в редакцию 26.08.2011 г.

Получены микросферы на основе поли-3-оксибутирата (ПОБ) с включением в полимерную матрицу цитостатических лекарственных веществ (ЛВ) хлорамбуцила и этопозида, изучены морфология, кинетика высвобождения ЛВ из микросфер и взаимодействие микросфер с опухолевыми клетками рака молочной железы человека линии MFC-7 *in vitro*. Полученные данные свидетельствуют о том, что пролонгированное высвобождение ЛВ происходит за

счет диффузии лекарственного вещества из полимерной матрицы на начальном этапе и за счет гидролитической деструкции полимера на более поздних этапах. При изучении биосовместимости и биологической активности биополимерных микросфер показано, что хлорамбуцил сильнее подавляет рост культивируемых опухолевых клеток за короткое время (24 ч). Этопозид действует слабее (подавление роста клеток за 48 ч не превышает 50%), однако в дальнейшем он имеет долгий пролонгированный эффект высвобождения Л В из полимерной матрицы. Изучаемая система может послужить основой создания новых лекарственных форм пролонгированного действия этопозида и хлорамбуцила для терапии онкозаболеваний.

## SCANNING ASSAY OF $\beta$ -GALACTOSIDASE ACTIVITY

© 2012 W. Li, X. Zhao, S. Zou, Y. Ma, K. Zhang, and M. Zhang

*Tianjin University, Tianjin 300072, China*

*e-mail: zhangkun@tju.edu.cn*

Received December 16, 2011

$\beta$ -galactosidase, encoded by the *lacZ* gene in *E. coli*, can cleave lactose and structurally related compounds to galactose and glucose or structurally related products. Its activity can be measured using an artificial substrate, *o*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG). Miller firstly described the standard quantitative assay of  $\beta$ -galactosidase activity in the cells of bacterial cultures by disrupting the cell membrane with the per-meabilization solution instead of preparing cell extracts. Therefore,  $\beta$ -galactosidase became one of the most widely used reporters of gene expression in molecular biology to reflect intracellular gene expression difference. But the Miller assay procedure could not monitor the  $\beta$ -galactosidase reaction in real time and its results were greatly influenced by some operations in the Miller procedure, such as permeabilization time, reaction time and concentration of the cell suspension. A scanning method based on the Miller method to determine the intracellular  $\beta$ -galactosidase activity in *E. coli* Tuner (DE3) expressing  $\beta$ -galactosidase in real time was developed and the permeabilization time of cells was optimized for that. The comparison of 3 assays of  $\beta$ -galactosidase activity (Miller, colorimetric and scanning) was made. The results proved that scanning method for the determination of enzyme activity with using ONPG as substrate is simple, fast and reproducible.