

кейін 24 сағаттан соң фермент белсенділігінің жоғарылауының екінші шектік нүктесі байқалды. Бұл жағдайды өсімдіктің барлық бейімделу механизмдерінің іске қосылуымен түсіндіруге болады. 3 тәуліктен соң СОД белсенділігінің деңгейі кенет төмендеді және тәжірибе соңына дейін бақылау нұсқасы ретіндегі өсімдіктерде де белсенділік деңгейі салыстырмалы түрде бірқалыпты болып, қайта көтерілмеді.

Құрғақшылыққа төзімділігі төмен «Казахстанская-10» бидай сортының селективті линияларының регенерант-өсімдіктеріндегі супероксиддизмутаза ферментінің белсенділігі «Отан» сортымен салыстырғанда тәжірибелік жұмыстың басталуынан 2 сағатқа кеш «іске қосылды». Алайда, 4 сағаттан соң тез көтерілгенін байқадық. Сынақ барысында 8 сағаттан соң СОД белсенділігінің төмендегені байқалды, ал бақылау нұсқасындағы өсімдіктерде бірқалыпты төмен көрсеткіштер байқалды. 12 сағаттан соң фермент белсенділігінің аздап көтерілгенін байқадық, тәулік өткен соң фермент белсенділігінің кенет көтерілген – екінші шектік нүктесін белгіледік. Сондай-ақ, жасанды стрестің әсерінен 72 сағаттан соң «Отан» сорты сияқты «Казахстанская-10» сортында да СОД ферментінің белсенділігі төмендейтінін және сол деңгейде қалатынын анықтадық.

СОД ферментінің белсенділігі екі сорттың да селективті линияларының регенерант-өсімдіктерінде бақылау нұсқасымен салыстырғанда, жасанды стрестік жағдайлар кезінде біршама жоғары нәтижелер көрсетті. Екі линияны өзара салыстыра қарағанда, құрғақшылыққа төзімді R3/O линиясының регенерант-өсімдіктерінде СОД белсенділігі эксперимент басталғаннан аяғына дейін R11/K селективті линиясының клеткалық культураларымен салыстырғанда біршама жоғары болды.

Жұмыс нәтижелері бойынша «Отан» және «Казахстанская-10» бидай сорттарының R3/O, R11/K селективті линияларында СОД ферментінің белсенділік деңгейі жоғары температураның әсері маннитолдың әсерімен салыстырғанда жоғары болатындығын анықтадық. Сондай-ақ, СОД антиоксидант – ферментінің белсенділігінің сараптамасын лабораториялық жағдайда бидайдың құрғақшылыққа төзімді линияларының селекциясында пайдалану мүмкіндігі қарастырылды.

Осылайша, тәжірибелік жұмыстар кезінде алынған нәтижелер бойынша, осмотикалық стресс пен құрғақшылық әсері кезінде бидай өсімдігінің әртүрлі өсу этаптарында СОД ферментінің белсенділігінің өзгеруі динамикасы бойынша көрсеткіштер толықтай зерттеліп, қарастырылды. Селективтеу әдісімен алынған R3/O, R11/K линияларының суспензиялық культуралары мен регенерант-өсімдіктерінде әдепкі кезден фермент белсенділігі жақсы байқалды, содан кейін тотықтыру стресі әсерінің уақытын ұзартқанда екі линияда да СОД белсенділігі төмендеп белгілі уақыт аралығында қайта жоғарылады. Бұл алынған селективті линиялар мен бақылау нұсқасы өсімдіктері мен антиоксидант – ферментінің белсенділігі араларындағы арақатынас айырмашылығының бар екенін көрсетеді.

Құрғақшылық белгілері әртүрлі селективті линиялардың регенерант – өсімдіктеріндегі СОД ферментінің өзгерістерін бақылау кезінде алынған нәтижелерді талдай отырып, келесідей тұжырым жасалды, яғни, алынған R3/O және R11/K құрғақшылыққа төзімді линиялары бақылау нұсқасымен салыстырғанда СОД белсенділігінің біршама жоғары деңгейімен ерекшеленді, бұл дегеніміз біздің жұмыстарымыздың нәтижесінде алынған линияларда қорғаныс жүйесінің біршама жоғары деңгейде екенін және қоршаған ортаның стрестік жағдайларында тиімді қызмет атқаруына мүмкіндік беретін әрі оттегінің белсенді формаларын тежейтін белсенді клеткаларының жұмысымен ерекшеленеді.

1 Гирко В.С., Волощук С.И., Залисский А.А., Руденко Т.П. Оценка устойчивости пшеницы к действию культуральных фильтратов грибных патогенов в культуре незрелых зародышей // Сельскохозяйственная биология. - 1993. - № 1. - С.62-69.

2 Калашникова Е.А. Клеточная селекция растений на устойчивость к грибным болезням - Дисс. докт. биол. наук. - М., 2003. - С. 282.

*Д.Табыс, Р.У. Бейсембаева, Т.А. Карпенюк, А.В. Гончарова*

## **ТОПЫРАҚ МИКРООРГАНИЗМДЕРІН АРАХИДОН ҚЫШҚЫЛЫНЫҢ КӨЗІ РЕТІНДЕ ЗЕРТТЕУ**

(Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, биотехнология кафедрасы)

*Жұмыста *Arthrobacter* (4-ГПД) и *Mycobacterium* (8-2ГПД) штамдарының арахидон қышқылын өндірушісі болатындығы жайлы зерттеу нәтижелері көрсетілген.*

Поликанықпаған май қышқылдары биологиялық маңызды жүйелерде қажетті роль атқаратын органикалық заттар класы болып табылады. Жақынғы жылдарда жүргізген зерттеулер олардың тірі организмдегі функциясының кең спектрін ашты. Поликанықпаған май қышқылдары клеткаларда,

ағзада өтетін процестердің төмен молекулалы реттегіштерінің түзілуіне әкелетін липооксигеназа немесе циклооксигеназалардың биотрансформациясының алғы заты. Полиқанықпаған қышқылдары маңыздыларының бірі арахидон қышқылы болып табылады. Арахидон қышқылы простагландиндердің, лейкотриндердің және тромбосандардың алғы заты ретінде қызмет атқарады [1].

Арахидон қышқылдары негізінен қолданылады:

Фармокология (жүрек, қан-тамыр жүйесінің, бауыр ауыруларының әртүрлі емдік және алдын алу препараттарының алғы заты ретінде); косметика өндірісінде (F витаминінің негізінде тері күтіміне арналған құралдар алуда); тағам өнеркәсібі (әртүрлі азық түлік өнімдерін байыту, соның ішінде балаларға арналған жасанды сүт қоспалары т.б.); ауыл –шаруашылығы (өсімдіктердің өсуінің және қорғаныс реакциясының жоғары эффективті реттегіштері) т.б.

Қазіргі күні арахидон қышқылы биотехнологиялық жолмен алу қиындық тудыруда, ең жақсы зертханалық жағдайда алынған арахидон қышқылы шығымы 13г/л (Жапония), 6г/л (Ресей, АҚШ, Польша т.б.) осыған байланысты арахидон қышқылдары продуценттерін іздеу және құрастыру және солардың негізінде биотехнологиялық тиімді жолмен алу өзекті мәселе болып табылады [2]. Давлетбаев И.М. қатарлы зерттеушілер 840 тан аса саңырауқұлақ штамдарының скрингі жүргізіп, *Mortierella alpina* штамын арахидон қышқылының көзі ретінде өндіріске ұсынылды. Бұл штамның липидтер құрамындағы арахидон қышқылы мөлшері 55% болған [3]. Осыған негізделгенде, топырақ микроорганизмдерінің аспирин сезімтал штамдары арахидон қышқылының көзі ретінде болуы мүмкін.

Бұл жұмыста топырақ микроорганизмдер скрингін жасап, аспирин сезімтал штамдарды табу көзделеді.

### Зерттеу әдістері

Зерттеу нысандары ретінде 10 түрлі бактериялар штамдары, *Pseudomonas* (10-2гпд, 9-3 гпд, 2-5 гпд, 1-5 гпд), *Arthrobacter* (4-1 гпд, 2-2 гпд), *Mycobacterium* (8-2 гпд, 4-3 гпд.), *Rhodococcus* (1-1 гпд, 3-2 гпд) мясо-пептон агарлы (МПА) ортада 37<sup>0</sup>С термостатта өсіріледі. Барлық штамдар биотехнология кафедрасының банкынен алынды.

Аспирин бар ортада топырақ микроорганизмдер скрингін жасау. Продуценттер скрингі үшін Ерошин В.К. ұсынған әдісі қолданылды [4]. Әр түрлі бактерия штамдары мясо-пептон агарлы (МПА) ортада өсіріледі. Органы дайындау барысында ортаға 3 түрлі концентрацияда (0,42г/л, 0,84г/л, 1,68г/л) аспирин қосылды. Орталар дайындалып автоклавтанады. Стерильді жағдайда орталар Петри табақшаларына құйылады. Орта қатқаннан кейін бактериялар штамдары егіледі. 3 тәулік бойы 37<sup>0</sup>С термостатқа қойылып, бактерия штамдарының аспиринді ортада өсу деңгейі бақыланады. Контроль ретінде бактериялар тек қана МПА ортасында өсіріледі [4].

Микроорганизмдер өсуіне рН әсерін зерттеу.

Бактериялар өсу деңгейіне рН әсерін зерттеу үшін МПА қоректік ортасының рН өлшенеді. Үш түрлі концентрациядағы (0,42г/л, 0,84 г/л, 1,68 г/л) аспирин қосылған орталардың рН тексеріледі және әрқайсы концентрацияның әсерінен өзгерген рН мөлшеріне тең етіліп әрбіреуіне контроль дайындалады, өсу деңгейі бақыланады.

Мембраналық фракцияны алу. Бактерия клеткаларының мембраналық фракцияларын алу үшін сұйық ортада (МПБ ортасында) өсірілген бактериялар суспензиясы центрифугаланғаннан кейін (5000 айн./мин 15 минут) тұнба түседі. Тұнбаға 2-3 мл рН 8,2 трис-НСІ құйылады, сұйық азотта (196<sup>0</sup>С) тез қатырылады да тез ерітіледі, бактериялар жасушалары жарылады, содан кейін 2-3 мл рН 8,2 0,1М трис-НСІ қосылады. Суспензия 1-2 сағатқа 4<sup>0</sup>С температураға қойылады. Мембраналық фракцияның пероксидазды белсенділігі зерттелінеді.

Мембраналық фракцияның пероксидазды белсенділігін анықтау.

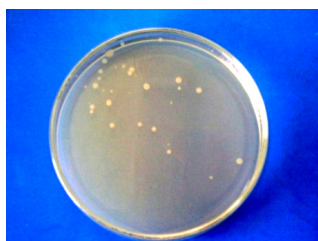
Пероксидазды белсенділігін спектрофотометрлік әдіспен анықталынады. Реакциялық қоспаның құрамына мембраналық фракцияның суспензиясы (100 мкл), гваякол, гемин, сутегінің қос тотығын қосылып 0,1М рН 8,2 трис-НСІ буфер ерітіндісімен 3мл-ге жеткізіледі. Содан кейін пероксидазды белсенділігін тетрагваякол мөлшеріне байланысты анықтаймыз. Тетрагваякол мөлшерін анықтау үшін толқын ұзындығы 470 нм-де ерітіндінің жұтылуы өлшенеді [5,6].

Мембраналық фракцияның пероксидазды белсенділігіне рН -синтаза тежегіштерінің әсерін зерттеу.

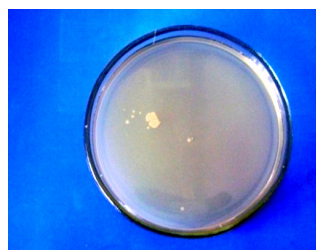
100мкл мембраналық суспензиясына аспириннің немесе индометациннің әр түрлі мөлшерін (0-30 мМ) қосылып, 15 минут 37<sup>0</sup>С инкубацияланады, содан кейін қоспаға гваякол, гемин, сутегінің қос тотығын (90мМ) қосып, пероксидазды белсенділігі спектрофотометрлік әдіс арқылы анықталады.

### Зерттеу нәтижелері

Бактериялардың аспирина әсерінен өсу деңгейі зерттелінді, нәтижесінде аспирина әр түрлі концентрациясында (0,42г/л, 0,84г/л, 1,68г/л) өсірілген *Pseudomonas* (10-2гпд, 9-3 гпд, 2-5 гпд, 1-5 гпд ), *Arthrobacter* (4-1 гпд, 2-2 гпд), *Mycobacterium* (8-2 гпд, 4-3 гпд, ), *Rhodococcus* (1-1 гпд,3-2 гпд) қатарлы бактерия штамдарын зерттеу барысында аспирин сезімтал штамдары анықталынды. Барлық штамдардың өсуі ортада 0,42г/л аспирин болғанда бактериялар өзгермей өседі. Аспириннің 1,68г/л концентрациясында өсу тежеледі. Сондықтан, аспирина 0,84г/л концентрациясы штамдарға әсерінің негізгі белгісі ретінде алынады. Штамдардың аспирина 0,84г/л концентрациясында өспеуі олардың аспирина сезімталдығына байланысты деп санаймыз (Сурет 1). Зерттелінген *Pseudomonas* барлық штамдарына, *Arthrobacter* (2-2 гпд), *Rhodococcus* (1-1ГПД) штамдарының өсуіне аспирин әсері байқалмады. *Arthrobacter* (4-1ГПД), *Rhodococcus* (3-2ГПД), *Mycobacterium* (4-3ГПД), *Mycobacterium* (8-2 ГПД) аспирина сезімтал болады.

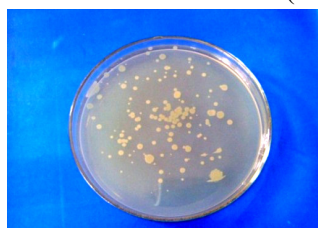


тек МПА ортасында өскен бактериялар

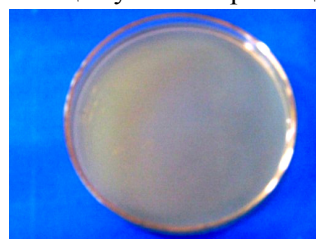


МПА ортасына 0,84 г/л АСПИРИН қосылған

#### 1.1 *Arthrobacter* (4-1ГПД) штамның өсуіне аспирина әсері

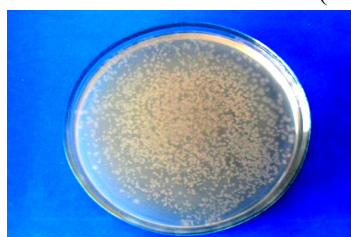


МПА ортасында өскен бактериялар

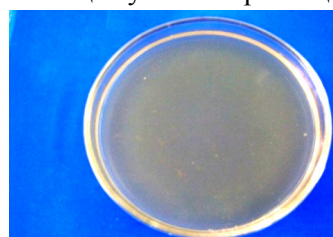


МПА+0,84 г/л Аспирин

#### 1.2 *Rhodococcus* (3-2ГПД) штамның өсуіне аспирина әсері

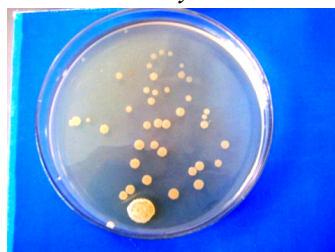


МПА ортасында өскен бактериялар

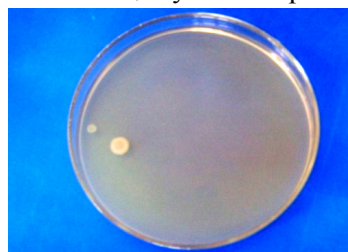


(МПА+0,84 г/л Аспирин)

#### 1.3 *Mycobacterium* (4-3ГПД) штамның өсуіне аспирина әсері



тек МПА ортасында өскен бактериялар



МПА ортасына 0,84 г/л АСПИРИН қосылған (МПА+0,84 г/л Аспирин)

#### 1.4 *Mycobacterium* (8-2 ГПД) штамның өсуіне аспирина әсері

Сурет 1 - Аспириннің бактериялар штамдарының өсуіне әсері

МПА ортысының рН-ін (аспиринсіз) 6,5 және 6,2-ге дейін жеткізіліп, сәйкесінше аспирин қосылған орталардағы бактериялар өсуімен салыстыру жүргізілді. Нәтиже рН өзгеруі бактериялар өсуіне ешқандай әсері болмағанын көрсетті.

Ферментативті зерттеулерді өткізуге қажет бактерия штамдарының жеткілікті көлемін алу үшін аспиринге жоғары сезімтал болған *Mycobacterium* (4-3ГПД, 8-2 ГПД), *Rhodococcus* (3-2ГПД), *Arthrobacter* (4-1ГПД) штамдары сұйық суспензия ортада (МПБ ортасы) 48 сағат үздіксіз тербелісте өсірілді.

МПА ортасының аспирин мөлшері артқан сайын рН көрсеткіші төмендейді (қышқылданады) (Кесте 1). Сондықтан бактериялардың өсуіне рН мәнінің әсері тәуелділігін зерттелінді.

Кесте 1

#### Аспирин қосылған орталардың рН мәні өзгерісі

| № | МПА ортасы және ортадағы аспирин мөлшері | рН мәні |
|---|--|---------|
| 1 | Контроль (тек МПА ортасы)                | 7,4     |
| 2 | МПА+0,42г/л аспирин                      | 7       |
| 3 | МПА+0,84г/л аспирин                      | 6,5     |
| 4 | МПА+1,68г/л аспирин                      | 6,2     |

Әдебиет көздерінде келтірілгендей, арахидон қышқылының синтезіне жауапты негізгі фермент-РГН-синтаза ядро, эндоплазмалық тор, Гольджий аппаратының мембраналарымен байланысқан түрінде болады. Сондықтан бактерия штамдарының мембраналық фракциясы бөлініп алынып пероксидазды белсенділігі зерттелінді.

Арахидон қышқылы РГН-синтазаның негізгі субстраты, РГН-синтаза-ның пероксидазды және циклооксигеназды орталығы болады. РГН-синтаза пероксидазды белсенділігін анықтау үшін сутек қос тотығы субстрат ретінде пайдаланылады, РГН-синтазаның циклооксигеназды орталығы арахидон қышқылының орнына сутек қос тотығын қосқанда өзінің жұмысын тоқтатады, бұнда сутегінің қос тотығы РГН<sub>2</sub>-нің аналогы ретінде пайдаланылады.

РГН-синтаза пероксидазды белсенділікті катализдейді: сутек қос тотығының қатысумен әр түрлі электрон қабылдағыштарды тотықтырады. Пероксидазды реакция РГН-синтазаның әсері механизмінің бір бөлігі болып табылады. Ол 15 гидрототық тобын тотықсыздандырып, РГГ<sub>2</sub>-ді РГН<sub>2</sub>-ге айналдырады. Реакция барысында пероксидазды белсенділігіне байланысты гваякол тетрагваяколға айналады, түзілген тетрагваяколдың мөлшеріне ерітіндінің жұтылу тығыздығы тура пропорционалды. Арнайы зерттеу жүргізу арқылы, мембранамен байланысқан ферменттік жүйенің пероксидазды белсенділігін анықталынды. Бактериялар штамдарының мембраналық фракциясының пероксидазды белсенділігі тетрагваякол мөлшерінің 30 минут аралығында түзілген түрінде көрсетеміз (Кесте 2).

РГН-синтаза ферментінің ерекше тежегіштері болады. Атап айтсақ, аспирин, индометацин, аналгин т.б. Бұлар стероидты емес қабынуға қарсы бағытталған заттар болып табылады. Олар басқа пероксидазалардың белсенділігін тежемейді. [7].

Бактериялар клетка мембранасының пероксидазды белсенділігі РГН-синтазаға немесе басқа мембранамен байланысқан басқа ферменттерге байланысты ма, соны анықтау үшін *Mycobacterium* (8-2ГПД), *Arthrobacter* (4-1ГПД), *Rhodococcus* (3-2ГПД) штамдарына мембранамен байланысқан пероксидазды белсенділігіне арнайы тежегіштер аспирин және индометацин әсері зерттелінді.

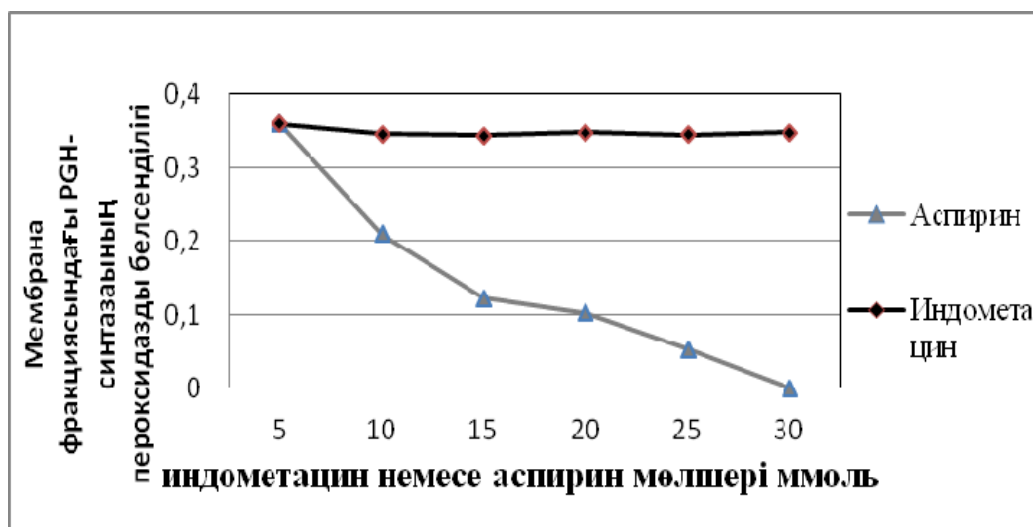
Кесте 2

#### Мембранамен байланысқан ферменттік жүйенің пероксидазды белсенділігі

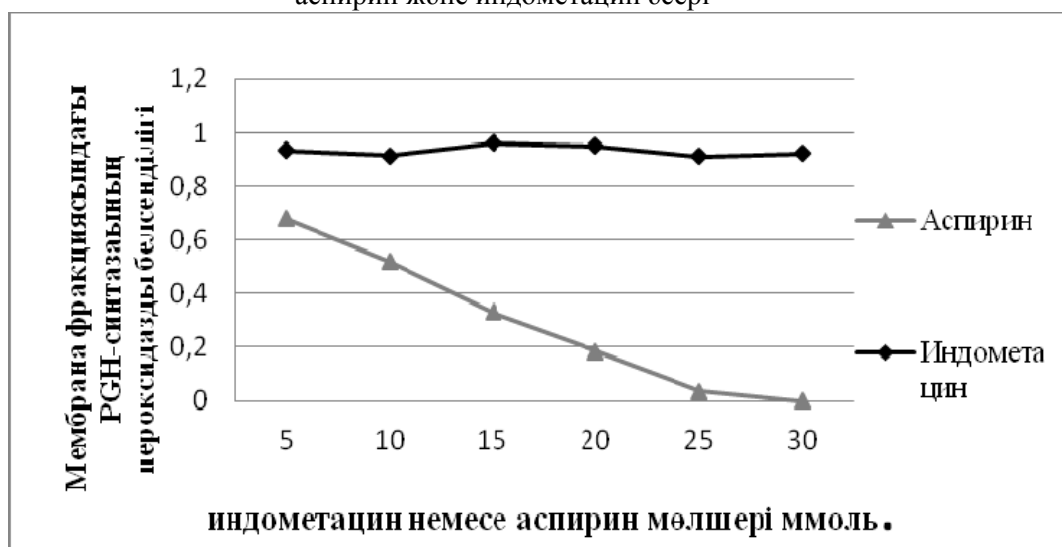
| Бактериялар штамдары                 | пероксидазды белсенділігі |
|--------------------------------------|---------------------------|
| <i>Arthrobacter</i> (4-1ГПД) штамы   | 0,430±0,06                |
| <i>Rhodococcus</i> (3-2ГПД) штамы    | 0,321±0,07                |
| <i>Mycobacterium</i> (8-2 ГПД) штамы | 0,720±0,05                |

*Arthrobacter* (4-1ГПД) штамының мембраналық фракциясының пероксидазды белсенділігі аспирин әсерінен толық тежелді (сурет 2). *Arthrobacter* (4-1ГПД) штамының пероксидазды белсенділігі 0,430±0,06 ға тең, аспирин қосқан кезде белсенділігі төмендеді. Аспирин мөлшері жоғарылаған сайын фермент белсенділігінің тежелуі жоғарылайды. Аспириннің концентрациясы 30 мМ болғанда толық тежелді. Алынған нәтиже *Arthrobacter* (4-1ГПД) штамының мембранасымен

байланысқан PGH-синтазаның бар болуы мүмкін екендігін көрсетеді. Индометацин әсерінен пероксидазды белсенділігі тежелмейді.



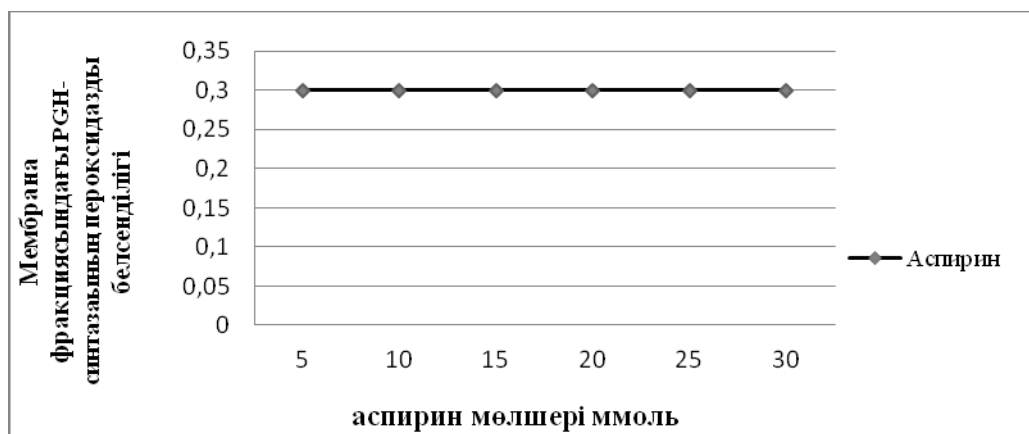
Сурет 2 - *Arthrobacter* (4-1ГПД) штамының мембраналық фракциясының пероксидазды белсенділігіне аспирин және индометацин әсері



Сурет 3 - *Mycobacterium* (8-2ГПД) штамының мембраналық фракциясының пероксидазды белсенділігіне аспирин және индометацин әсері

*Mycobacterium* (8-2ГПД) штамының клетка мембранасының пероксидазды белсенділігі де аспириннің әсерінен тежеледі (сурет 3). Аспириннің әсеріне түспеген бактериялардың мембраналық фракциясының пероксидазды белсенділігі  $0,720 \pm 0,05$  тең, аспирин қосылғанда пероксидазды белсенділік  $0,689 \pm 0,05$  – 0 аралығында өзгерді. Аспирин концентрациясы жоғарылаған сайын мембраналық фракцияның пероксидазды белсенділігі төмендеген. Индометацин бұл штамға әсерін көрсете алмады.

*Rhodococcus* (3-2ГПД) штамының мембраналық фракциясының пероксидазды белсенділігі аспирин әсерінен тежелмейді (сурет 4).



Сурет 4 - *Rhodococcus* (3-2ГПД) штамының мембраналық фракциясының пероксидазды белсенділігіне аспирин әсері

Сонымен, Аспирин сезімтал *Arthrobacter* (4-1ГПД), *Mycobacterium* (8-2ГПД) штамдары арахинон қышқылының продуценттік көзі ретінде болуы мүмкін деп қорытындыланды.

- 1 Harrison K. Arachidonic acid's Molecule <http://www.3dchem.com/molecules.asp?ID=378#>
- 2 Kenichi Higashiyama, Shigeaki Fujikawa, Enoch Y. Park, Sakayu Shimizu. Production of Arachidonic Acid by *Mortierella Fungi*// *Biotechnol. Bioprocess Eng.*- 2002.-7: 252-262.
- 3 Давлетбаев И.М., Петухова Н.И., Зорин В.В. Скрининг низших грибов – потенциальных продуцентов незаменимых полиненасыщенных жирных кислот.// Башкирский химический журнал – 2000. –Т.7.-№5.-С.40-42.
- 4 Ерошин В.К., Дедюхина Э.Г., Чистякова Т.И., Желифонова В.П., Ботаст Р.Дж. Исследование синтеза арахиноновой кислоты грибами рода *Mortierella*: микробиологический метод селекции продуцентов арахиноновой кислоты // *Микробиология.* - 1996- Т. 65- №1.- С. 31-36.
- 5 Malkowski M.G., Ginell S.L., Smith W.L. and Garavito R.M. The productive conformation of arachidonic acid bound to prostaglandin synthase // *Science.*-2002.-Vol.289.-p.1933-1937.
- 6 Варфоломеев С.Д., Мевх А.Т. Простагландины – молекулярные биорегуляторы. – М.: МГУ, 1985. – 308бет.
- 7 Vane J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 1971;231:232-5.

\*\*\*

Экспериментальные исследования показали, что штаммы *Arthrobacter* (4-1ГПД) и *Mycobacterium* (8-2ГПД) могут быть продуцентами арахиноновой кислоты.

\*\*\*

The experimental research shows that, the aspirin sensitive *Arthrobacter* (4-1ГПД) and *Mycobacterium* (8-2ГПД) strains are maybe source of arachidonic acid.

**С.М. Тайпакова, А.Б. Жанаева, А.К. Бисенбаев**  
**КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ КДНК ЭНДО-В-1,4-ГЛЮКАНАЗЫ ГРИБА**  
**ASPERGILLUS NIGER В E. coli И ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА**  
 (ДГП «Научно-исследовательский институт проблем биологии и биотехнологии» КазНУ им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан)

Эндо-β-1,4-глюканаза (EG) является одним из ключевых ферментов целлюлазного комплекса, ответственного за гидролиз аморфных волокон целлюлозы. кДНК EG из гриба *Aspergillus niger* был клонирован в клетках *E. coli*. Методика клонирования включала получение и амплификацию кДНК гена с помощью ПЦР со специфическими праймерами. Продукт ПЦР был клонирован в векторной плазмиде *E. coli* под контролем промотора фага T7. Показана экспрессия гена *eng1* в клетках рекомбинантного штамма *E. coli*. Исследованы некоторые физико-химические свойства EG. Рекомбинантный белок обладал максимальной активностью при 50°C и pH 6.0.

В настоящее время основа процесса биоконверсии растительной биомассы состоит в ферментативном гидролизе целлюлозы до глюкозы с последующим сбраживанием ее в этанол или получении иных продуктов микробного синтеза [1]. Целлюлолитические ферменты применяются в форме мультиферментных композиций в составе премиксов к кормам животных и птиц для