

На следующем этапе работы предстоит идентифицировать вирусные белки – супрессоры клеточного процесса RNAi путем транзитной экспрессии клонированных ОРС гРНК РММ в индикаторных растениях табака *Nicotiana benthamiana* линии 16С.

Литература

- 1 Baulcombe D. RNA silencing in plants // Nature. - 2004. - V. 431. - P. 356-363.
- 2 Voinnet O. Post-transcriptional RNA silencing in plant-microbe interactions: a touch of robustness and versatility // Curr. Opin. Plant Biol. - 2008. - V.11. - №4. - P.464-470.
- 3 Ruiz-Ferrer V., Voinnet O. Roles of plant small RNAs in biotic stress responses // Annual Review of Plant Biology. - 2009. - V. 60. - P. 485-510.
- 4 Alvarado V., Scholthof H.B. Plant responses against invasive nucleic acids: RNA silencing and its suppression by plant viral pathogens // Semin.Cell. Dev. Biol. - 2009. - V.20. - №9. - P.1032-1040.
- 5 Омаров Р.Т., Берсимбай Р.И. Биохимические механизмы супрессии РНК-интерференции вирусами растений // Биохимия. - 2010. - Т. 75, Вып. 8. - С. 1062-1069.
- 6 Zavriev S.K., Kanyuka K.V., Levay K.E. The genome organization of potato virus M RNA // J. Gen. Virol. - 1991. - V. 72. - P. 9–14.
- 7 Proll E., Leiser R.M., Ostermann W.D., Spaar D. Some physicochemical properties of potato virus M // Potato Res. - 1981. - V. 24. - P. 1–10.
- 8 Flatken S., Ungewickell V., Menzel W., Maiss E. Construction of an infectious full-length cDNA clone of potato virus M // Arch. Virol. - 2008. - V. 153. - P. 1385–1389.
- 9 Tavantzis S.M. Physicochemical properties of potato virus M // Virology. - 1984. - V. 133. - P. 427-430.
- 10 Hartley J.L., Temple G.F., Brasch M.A. DNA cloning using in vitro site-specific recombination // Genome Res. - 2000. - V.10. - P. 1788-1795.
- 11 Katzen F. Gateway recombinational cloning: a biological operating system // Expert Opin. Drug Discov. - 2007. - V. 2(4). - P. 571-589.
- 12 Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular cloning . A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. - 3 vol. – 245 p.

УДК 577.152.321

А. Кулонов, Д. Мирзарахметова*

Национальный университет Узбекистана, г.Ташкент, Узбекистан

*e-mail: divya_shakti@hotmail.com

Возможность получения функциональных соков на основе ферментативного гидролиза инулина

Исследована кинетика ферментативного гидролиза инулина, выделенного из топинамбура сорта Файз барака. Изучена ферментативная гидролизуемость инулина дрожжевой инвертазой. Выявлено, что инулин гидролизуется инвертазой при pH 4,0, температуре 30°C и времени инкубации 1 час и исходной концентрации инулина 0,5-2,0%. Вышеуказанные результаты открывают возможности для получения функциональных соков и различных напитков, обогащенных фруктозанами.

Ключевые слова: ферментативная конверсия, инвертаза, инулин, функциональные соки, полисахариды.

A. Kulonov, D. Mirzarakhmetova

The opportunity of functional juices production on the basis of inulin enzymatic hydrolyses

The kinetic characteristics of enzymatic hydrolysis of inulin isolated from topinambur Fays baraka was studied. The hydrolysis opportunity of unulin was investigated by application of yeast invertase. It was determined that unulin can be hydrolysed by invertase at pH 4,0, 30°C , during one hour, and initial inulin concentration of 0,5-2,0%. Above mentioned results open up the opportunity for the production of functional juices and various beverages enriched with fructozanes.

Keywords: enzymatic conversion, invertase, inulin, functional juices, polysaccharides.

Исследование биологических факторов, влияющих на процесс ферментативного гидролиза (осахаривания) инулина до моносахаридов является актуальной задачей современной биотехнологии. Одно из направлений этих исследований связано с поиском ферментных препаратов, которые с наибольшей эффективностью способны осуществлять глубокий гидролиз инулина.

Другое – с изучением влияния физико-химических свойств применяемого фермента на ход биоконверсии.

Инвертаза катализирует реакции по расщеплению β -D-фруктофуранозидных связей сахарозы со стороны фруктозы. В водной среде фермент расщепляет трисахариды, дисахариды и другие углеводы, проявляя большую специфичность к сахарозе, чем к другим углеводам [1,2]. Также известна способность инвертазы катализировать реакции образования олигосахаридов, как например, получение дифруктозы [3] из смеси 30% сахарозы и 50% фруктозы (pH 6,0, 50⁰C, 48 часов) или же другие фруктоолигосахариды, такие как кестоза и нистоза [4], которые обычно употребляются в диетическом питании. Нужно отметить, что инвертаза также называлась фруктанэкзогидролазой [5] и инулазой [6] из-за проявления своей активности по отношению к фруктозосодержащим углеводам, в частности раффинозе, стахиозе и инулину. В случае, когда субстратом служит инулин, гидролитическая активность фермента заключается в расщеплении инулина и образовании в среде инкубации фруктозы и глюкозы.

Материалы и методы

В работе был использован фермент инвертаза (К.Ф. 3.2.1.26.) *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich, USA); в работе впервые изучены процессы биодegradации инулина топинамбура сорта *Файз барака*. Гидролитическую активность инвертазы определяли в два этапа [7]. На первом этапе смешивали 0,50 мл (1 мг) раствора фермента, 0,50 мл 0,1 М ацетатного буфера (pH 4,0) и 1,0 мл 0,20% инулина и смесь инкубировали в течение 10 мин при 50⁰C. Реакцию останавливали выдерживанием в кипящей водяной бане в течение 5 мин. Контролем при определении активности фермента инвертазы служил раствор фермента, который предварительно инактивировали кипячением в водяной бане в течение 5 мин. Количество образовавшейся глюкозы в реакционной смеси определяли по методу [8]. За единицу активности инвертазы принимали такое количество фермента, которое катализировало образование 1 мкг глюкозы за 1 минуту. Количество ферментного белка определяли по методу Лоури [9].

Результаты и их обсуждение

По литературным данным pH оптимум инвертазы зависит от источника выделения. Так, например, у дрожжей она составляет 4,0-5,0 [10]. Оптимальная температура инвертазы также зависит от источника фермента. Обычно оптимум находится в интервале 30-60⁰C и температурный оптимум повышается с увеличением концентрации субстрата. Например, температурным оптимумом инвертазы для нативной и иммобилизованной ферментов *Saccharomyces cerevisiae* является 50⁰C и 30⁰C соответственно [11]. При исследовании pH оптимума нативной дрожжевой инвертазы в качестве субстрата применяли 1% раствор инулина в диапазоне pH от 3,0 до 6,0. На рисунке 1. представлена кривая pH-оптимума нативной инвертазы. pH оптимум нативной инвертазы находится в области pH 4,0.

Оптимальное время инкубации нативной инвертазы в водной среде находили по накоплению глюкозы и фруктозы в реакционной смеси (рисунок 2). Из рисунка 2 видно, что через 1 час наблюдается максимальная активность нативного фермента (360 Ед). Дальнейшее увеличение времени инкубации не влияло на увеличение глюкозы и фруктозы в среде и приводило, соответственно, к падению активности фермента. При определении оптимальной концентрации субстрата нативной инвертазы водной среде в качестве субстрата применяли инулин.

Зависимость активности инвертазы от концентрации инулина в среде измеряли в диапазоне ее концентраций от 0,025 до 2,5% (рисунок 3). Максимальная активность (360 Ед) нативного фермента отмечены в 1,0-1,15% растворах инулина. Температурный оптимум является одним из лимитирующих факторов протекания ферментативных реакций.

Определение температурного оптимума действия фермента в водной среде проводили в интервале температур от 20 до 50⁰C, используя в качестве субстрата 1% инулин при установленных pH-оптимумах инвертазы. Температурный оптимум фермента находится в области 50⁰C. Результаты проведенных исследований представлены на рисунке 4.

Стабильность инвертазы изучали измерением активности фермента в процессе преинкубации в 0,1М ацетатном буфере pH 4,0 (рисунок 5).

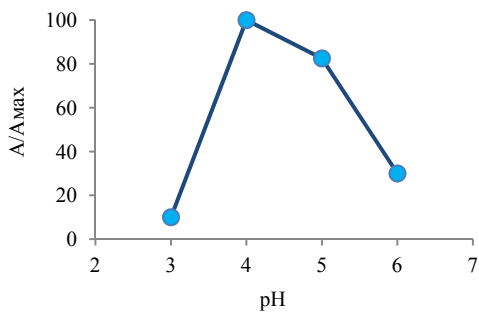


Рисунок 1 – Зависимость активности фермента от pH среды

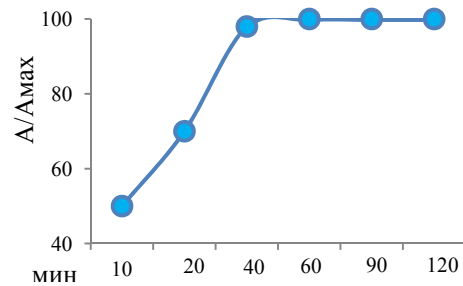


Рисунок 2 – Влияние времени инкубации на гидролиз инулина

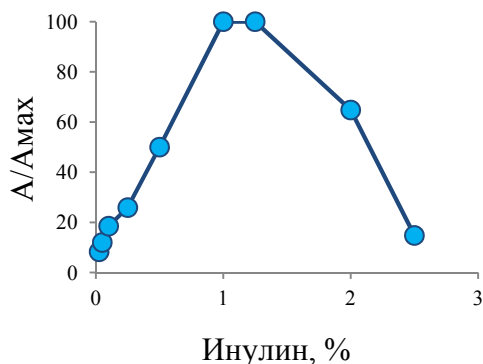


Рисунок 3 – Зависимость активности инвертазы от исходной концентрации инулина в среде

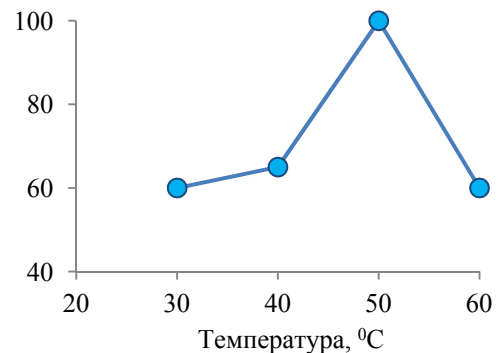


Рисунок 4 – Температурный оптимум инвертазы

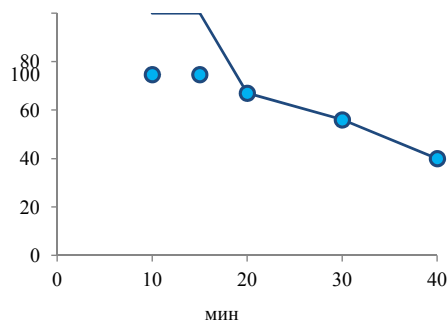


Рисунок 5 – Стабильность инвертазы

Определено что, максимальная активность инвертазы наблюдалась через 15 мин. Вышеуказанные результаты являются потенциальными источниками для получения функциональных соков, однако необходима иммобилизация фермента инвертазы для целевого использования в производстве получения соков и концентратов. Таким образом, в результате нашей работы впервые показана возможность использования дрожжевой инвертазы и инулина, выделенного из топинамбура для производства фруктозного сиропа, функциональных соков и пищевых концентратов.

Литература

1. Francois A., Bignon C., Sulzenbacher G., Henrissat B. The three dimensional structure of invertase from *Thermotoga maritima* reveals a bimodular arrangement and an evolutionary relationship between retaining and inverting glucosylhydrolases // J. Biol. Chem. - 2004. -V.279. -№18. - P.18903-18910.
2. Francois A., Jordi E., Henrissat B., Czjzek M. Crystal structure of inactivated *Thermotoga maritima* invertase in complex with the trisaccharide substrate raffinose // Biochem. J. -2006. -V.395. -№3. - P.457-462.

3. Kojima Y., Moriya K., Nakamura Y., Ozawa O. Seito gijutsu kenkyukaiishi // Proc.Res.Soc.Ja-P.Sugar Refin.Technol. - 1997. -V.45. - P.43-51.
4. Мазур П.Я., Столярова Л.И. Снижение сахараёмкости булочных и сдобных изделий // Хлебопекарная и кондитерская промышленность. -1987. - №3. - С.341-344.
5. Verhaest M., Ende W., Roy K., Ranter C. X-ray diffraction structure of a plant glycosyl hydrolase family 32 protein: fructan 1- exohydrolase IIa of *Cichorium intybus* // The Plant Journal. - 2005. - №41. -P.400-411.
6. Nagem R., Rojas A., Golubev A., Korneeva O., Eneyskaya E. Crystal structure of exo-inulinase from *Aspergillus awamori*: the enzyme fold and structural determinants of substrate recognition // J. Mol. Biol. - 2004. - №344. -P.471-480.
7. Мирзарахметова Д.Т., Рахимов М.М., Абдуразакова С.Х., Ахмедова З.Р. Ферментативная конверсия субстратов инвертазы в водно-органической среде // Прикладная Биохимия и Микробиология. -2006. -№2. - С.160-174.
8. Афанасьева Г.А., Щербукин В.Д. Модификация ферроцианидного варианта глюкооксидазного метода определения глюкозы // Прикладная Биохимия и Микробиология. -1975. - №3. - С.460-462.
9. Lowry O., Rosenbryl N., Farr A. Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem. -1954. -V.193. - P.265-275.
10. Мирзарахметова Д.Т., Абдуразакова С.Х., Ахмедова З.Р., Буриханов Ш.С. Субстратная специфичность инвертазы // Химия природных соединений. -2000. - №1. - С.14-17.
11. Мирзарахметова Д.Т., Дехканов Д.Б., Абдуразакова С.Х., Ахмедова З.Р., Рахимов М.М. Свойства инвертазы, ковалентно иммобилизованной на активированном угле // Прикладная биохимия и микробиология. - 2009. -Т. 45. - №3. - С. 287-291.

УДК: 57.069.4:582.263

Т.С. Кустова*¹, Т.А. Карпенюк¹, А.В. Гончарова¹, Л.К. Мамонов²

¹Казахский национальный университет им. аль-Фараби, г. Алматы
 , Казахстан²Институт биологии и биотехнологии растений, г. Алматы, Казахстан

*e-mail: kus_talya@yahoo.com

Антимикробная и антиоксидантная активность экстрактов, выделенных из растений Казахстана

Исследованы антимикробные и антиоксидантные свойства экстрактов, выделенных из растений флоры Казахстана. Выявлены перспективные растительные экстракты с высокой антиоксидантной и антимикробной активностями. К ним относятся дихлорметановые экстракты *Rhodiola quadrifida* (все растение), *Epilobium hirsutum* (надземная часть) и *Rumex confertus* (корни), этанольный экстракт *Atraphaxis replicata* Lam. (надземная часть).

Ключевые слова: растительные экстракты, антимикробная активность, антиоксидантная активностью.

T.S. Kustova, T.A. Karpenyuk, A.V. Goncharova, L.K. Mamonov

Antimicrobial and antioxidant activities of crude extracts isolated from plants growing in Kazakhstan

This study was carried out to determine the antimicrobial and antioxidant properties of crude extracts isolated from plants growing in Kazakhstan. We have selected the most promising crude extracts with high antimicrobial and antioxidant activities: dichloromethane extracts *Rhodiola quadrifida* (whole plant), *Epilobium hirsutum* (aerial part) and *Rumex confertus* (roots), ethanol extract *Atraphaxis replicata* Lam. (aerial part).

Keywords: crude extracts isolated from plants, antimicrobial activity, antioxidant activity.

T.S. Kustova, T.A. Karpenyuk, A.V. Goncharova, L.K. Mamonov

Қазақстанның өсімдіктерінің бөлініп алынған экстракттерінің антимикробтық және антиоксиданттық белсенділігі

Қазақстан өсімдіктерінің флорасынан бөлініп алынған экстракттарының антиоксидантты антимикробты құрылымы зерттелінді. Перспективті жоғары антиоксидантты және антимикробты белсенділігі бар өсімдік экстрактылары анықталды. Оларға дихлорметанды экстрактылар *Rhodiola quadrifida* (барлық өсімдіктер), *Epilobium hirsutum* (жер бетіндегі бөлік) және *Rumex confertus* (тамырлар), этанолды экстракт *Atraphaxis replicata* Lam. (жер бетіндегі бөлік).

Түйін сөздер: өсімдік экстрактылары, антимикробты белсенділік, антиоксидантты белсенділік.

В настоящее время среди населения растет спектр инфекционных заболеваний, что требует поиска новых средств, обладающих антимикробным действием. Одним из таких средств являются биологически активные вещества (БАВ) растений, которые представлены разнообразными классами