

6. Шендеров Б.А. Современное состояние и перспективы исследований в области микробной экологии человека//Материалы Международного конгресса «Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания. Фундаментальные и клинические аспекты»//Клиническое питание. - 2007. - № 1-2.- С. А75.

7. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. - М.: Изд-во МГУ, 1994. – 512 с.

Түйін

Сублимациялық жолмен кептірілген *Lactobacillus cellobiosus* 34, 35, 45 және *Lactobacillus fermentum* 29 культураларының антагонистік белсенділік спектрі бойынша ең қуатты нұсқаларына іріктеу жүргізілді. Бастапқы культурадан антимиқробтық белсенділігі едәуір жоғары *Lactobacillus cellobiosus* 34 культуралары ішінен 14 нұсқа, *Lactobacillus cellobiosus* 35 – 15 нұсқа, ал *Lactobacillus cellobiosus* 45 пен *Lactobacillus fermentum* 29 – 12 нұсқадан іріктелініп алынды.

Summary

The most active variants in terms of antagonistic activity spectrum were selected from lyophilized cultures of *Lactobacillus cellobiosus* 34, 35, 45 and *Lactobacillus fermentum* 29.

14 variants were selected from *Lactobacillus cellobiosus* 34, 15 variants from *Lactobacillus cellobiosus* 35, 12 variants each from *Lactobacillus cellobiosus* 45 and *Lactobacillus fermentum* 29 surpassing stock cultures in antimicrobial activity.

УДК 577.158, 577.152.1

**Гильманов М.К., Ибрагимова С.А., Туфуминова М.Н., Рахметова Ж.К., Бектурсынова Ш.Т.
ПОИСК ИСТОЧНИКА И РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ ПОЛУЧЕНИЯ
БИОСЕНСОРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛЮТАМАТА**

*РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина»
КН МОН РК, г. Алматы, Казахстан baltakay@mail.ru*

Ферменты азотного обмена играют очень важную роль в процессах метаболизма в ходе онтогенеза растений. Среди ферментов азотного обмена наиболее важными являются ферменты метаболизма центральной аминокислоты азотного обмена - глутамата. активность ферментов обмена глутамата является определяющей для всех наиболее важных стадий онтогенеза растений. В лаборатории структуры и регуляции ферментов впервые был обнаружен новый путь катаболизма глутамата, осуществляемый ранее неизвестным ферментным комплексом (ФК), состоящим из малатдегидрогеназы (МДГ) и глутаматоксалоацетатаминотрансферазы (ГОАТ). Установлено, что ФК осуществляет необратимые реакции окисления яблочной кислоты с последующим переаминированием образовавшейся щавелевоуксусной кислоты с глутаматом, приводящей к образованию аспартата и 2-оксоглутарата в качестве конечных продуктов. Конечным продуктом также является восстановленный кофермент NADH. Трудно переоценить значение ФК МДГ-ГОАТ для метаболизма злаковых культур. Реакции, катализируемые ФК, позволяют с одной стороны получать энергию от малата и с другой стороны катаболизировать глутамат без потери драгоценного аммиака. И, что очень важно, в результате образуется аспарагиновая кислота, необходимая для синтеза пуринов - важных компонентов синтеза нуклеиновых кислот. Известно, что злаковые культуры относятся к растениям с глутаматным типом обмена и именно в этих растениях обнаружена самая высокая активность этого комплекса. Необходимо указать, что МДГ-ГОАТ является эволюционно молодым ферментным комплексом, и он не обнаруживается в эволюционно древних группах растений, например, лилейных, голосеменных, низших растениях, водорослях и микроорганизмах. Известно, что запасные белки злаковых культур содержат огромное количество глутамата, около 70% от суммы всех аминокислот. Таким образом, можно считать, что ФК МДГ - ГОАТ является чрезвычайно важным и специфичным именно для этой группы растений. в связи с уникальностью данного ферментного комплекса нами предприняты попытки изучить возможность его применения в качестве ферментного биосенсора для определения глутамата. Для этого имеются следующие предпосылки:

ФК осуществляет необратимые реакции катаболизма глутамата.

- на активность ФК не действуют никакие другие вещества;
- и поэтому они не мешают определению активности;

Исходя из этого решались следующие задачи:

- поиск растительного сырья с очень высокой активностью ФК;
- разработка методов получения ФК;
- определение кинетических характеристик ФК для использования их при создании биосенсора;
- изучить оптимизацию хранения ФК.

Материалы и методы

Объектами исследования служили семена пшеницы сорта «Стекловидная - 24», Активность ферментного комплекса определяли на спектрофотометре «*Ultrospec 1100 pro*» с кварцевой кюветой объемом 2 мл. Активность ферментного комплекса измеряли в течение 2-3 минут. Активность определяли в мкМ восстановленного НАДН за 1 минуту на мг белка. Количество белка определяли микробиуретовым методом спектрофотометрически при длине волны 330 нм.

В ходе данного исследования нами были разработаны методы получения высокоочищенных препаратов ферментного комплекса не содержащих глутаматдегидрогеназы и малатдегидрогеназы, которые существенно мешают изучению ФК.

Схема очистки ферментного комплекса включала следующие этапы: гомогенизацию, центрифугирование, осаждение сульфатом аммония (30-70%), обессоливание на сефадексе G-50, ионообменная хроматография на ДЕАЕ целлюлозе, DE-52. Аффинная хроматография с использованием голубого декстрана для очистки МДГ-ГОАТ показала, что этот фермент не связывается с данным аффинным сорбентом, что говорит о наличии существенного принципиального различия между МДГ-ГОАТ и НАД специфичными дегидрогеназами, к которым относится обычная малатдегидрогеназа. То есть, малатдегидрогеназа ферментного комплекса существенно отличается от хорошо изученной малатдегидрогеназы растений.

Окончательную очистку ФК проводили высокоэффективной жидкостной хроматографией с использованием колонки моно Q 5/5 (Pharmacia). На первом этапе разделение ФК вели в градиенте NaCl 0-0.2M. Фракции, содержащие активность ФК подвергали вторичному разделению в той же системе FPLC в градиенте 0.1-0.4M NaCl. Фракции, содержащие активность ФК использовались для проведения SDS электрофореза по Laemmli (1970) [5] (рисунок 5, приложение E). Электрофорез проводился с присутствием белков-метчиков с известными молекулярными массами. Было установлено, что ФК состоит из двух неодинаковых субъединиц с молекулярными массами 60 и 50 кДа.

Семена размалывали и тщательно растирали в фарфоровой ступке в 0,05M трис-HCl буфере, pH=7,4 до гомогенного состояния в соотношении 1:4 (вес/объем). Гомогенат центрифугировали при 10000g в течение 10 минут. Полученный бесклеточный экстракт разделяли ионообменной хроматографией на колонке ДЕАЕ-52 (Сервацел) (2,5x8.0 см), уравновешенной 0,05 M трис- HCl буфером, pH=7,4. После смыва несвязавшихся белков проводили ступенчатую элюцию NaCl от 0,1 до 0,5M в стартовом буфере. Ферментный комплекс элюировался 0,1M NaCl (рисунок 1).

Фракции, содержащие активность ферментного комплекса, объединяли, концентрировали до 2 мл и подвергали двукратной гель-хроматографии через колонку с сефакрилом S-300 (2x80 см). График элюции представлен на рисунке 2.

Разделение ферментного препарата ФК из пшеницы на колонке с сефакрилом S-300 показало, что активность ФК выходит в объеме, который соответствует белкам с молекулярной массой 110 кДа. Активность ФК МДГ-ГОАТ до очистки на колонке с сефакрилом S-300 (в супернатанте) составила 135,15 мкМ/мг. После очистки – 474,9 мкМ/мг, то есть увеличилась в 3,5 раза.

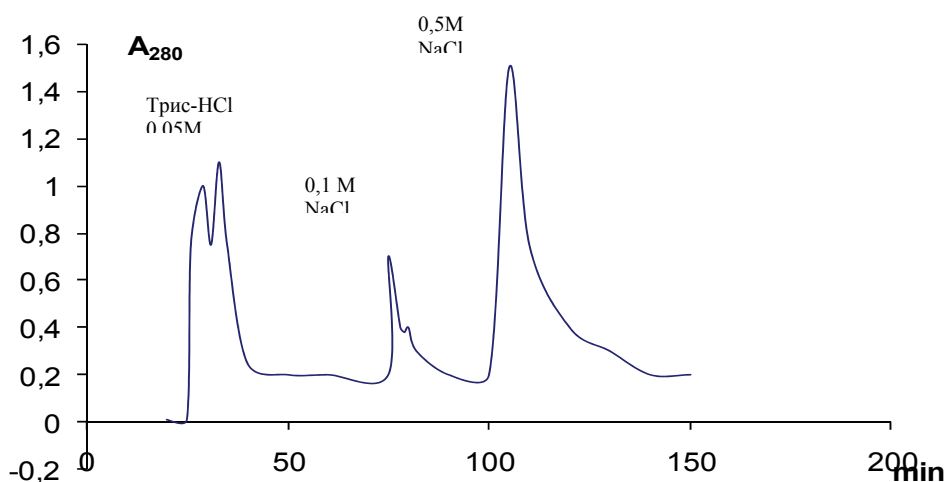


Рисунок 1 - График элюции белка из пшеницы сорта «Стекловидная – 24» на колонке с ДЕАЕ типа ДЕ-5

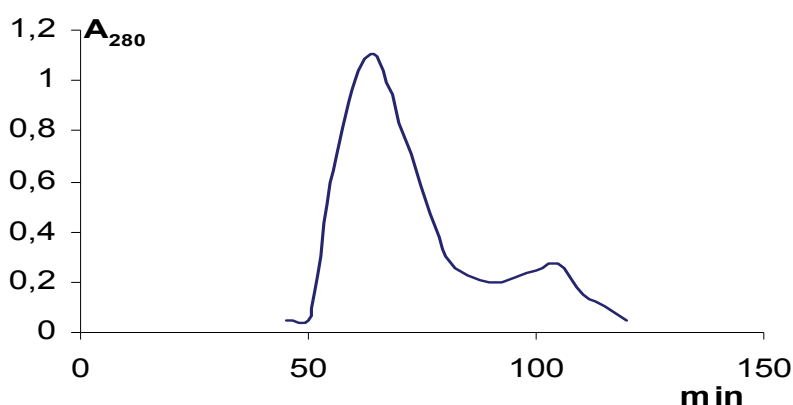


Рисунок 2 - Гель-хроматография ФК МДГ-ГОАТ из пшеницы сорта «Стекловидная - 24» на колонке с Сефакрилом S-300

Были изучены некоторые кинетические характеристики ферментного комплекса: определили K_m для глутамата, который равнялся 1,4 мМ, для НАД - 0,38 мМ, что говорит о высоком средстве ФК из изучаемых объектов к этим субстратам.

Результаты и их обсуждение

Были поставлены опыты по изучению механизмов активации ФК МДГ-ГОАТ. Известно, что многие ферменты в покоящихся семенах находятся в неактивном латентном состоянии, и их активность проявляется лишь по мере прорастания. Поэтому, необходимо было установить, существует ли латентная форма ФК МДГ-ГОАТ. Был проведен опыт по изучению ФК и родственных ферментов ГДГ и МДГ, выделенных из зародышевых и беззародышевых частей при хранении их в течение нескольких суток. Результаты представлены в таблице 1.

Из таблицы 1 видно, что активность ФК (МДГ-ГОАТ) самая высокая в зародышевой части в первый день прорастания, но снижение активности в зародышевой части происходит намного быстрее чем в беззародышевой. Уже на 2-3й дни активность в беззародышевой части пшеницы больше, чем в зародышевой.

Как было показано нами раньше самая высокая активность у злаковых культур, однако активность ФК изучалась у покоящихся семенах. так как нашей задачей явился поиск объекта с высокой активностью ФК, то явилось необходимым изучить активность ФК в ходе всего онтогенеза пшеницы.

Мы изучали активность ФК в важнейшие фазы развития растения пшеницы, в фазу кущения, трубкования и колошения (таблица 1).

Таблица 1

№ п/п (дни)	Беззародышевая часть, активность ФК МДГ-ГОАТ, мкМ/мг	Зародышевая часть, активность ФК МДГ-ГОАТ, мкМ/мг
1	156	731
2	144	91
3	132	59

Таблица 2 - Изучение активности ФК МДГ-ГОАТ в различные фазы развития пшеницы сорта «Стекловидная - 24»

№ п/п	Фазы развития	Органы растения	Активность ФК МДГ-ГОАТ, мкМ/мг
1	кущение	листья	103
2	трубкование	листья	205
		стебель	194
3	колошение	листья	283,7
		стебель	26,48
		колосковые чешуйки	428,22

Как видно из таблицы 2, активность ФК связана с важнейшими этапами формирования пшеницы, и она выросла в десятки раз по сравнению с начальными этапами роста пшеницы. Наиболее высокая активность ФК равная 428,22 обнаружена в колосковых чешуйках, что говорит об очень высокой интенсивности обмена глутамата в этом органе. Активность ФК в листьях неуклонно возрастала от фазы кущения до фазы колошения. И с 21 дня до фазы колошения активность в этом органе выросла почти в 50 раз. Это говорит об очень важной роли ФК в ходе онтогенеза растения пшеницы.

Наибольший интерес для нас представляло изучение активности ФК в ходе формирования зерна пшеницы – органа, определяющего биопродуктивность этого растения. Была изучена активность ФК в листьях, стеблях, зеленых колосковых чешуйках и в наливающемся зерне пшеницы, собранной в фазу молочной спелости (таблица 3).

Таблица 3 - Изучение активности ФК МДГ-ГОАТ в пшенице сорта «Стекловидная - 24», собранной в фазу молочной спелости

№ п/п	Органы растения	Активность, ФК МДГ – ГОАТ, мкМ/мг
1	зерно	149
2	колосковые чешуйки	177
3	стебли	432
4	листья	611

Обращает на себя внимание высокая активность ФК в стеблях и листьях в эту фазу, тогда как в зерне и колосковых чешуйках активность ФК была более чем в 2 раза ниже, как это видно из таблицы 5. Эти результаты говорят о том, что высокая активность ФК в листьях свидетельствует о начале процесса мобилизации ассимилятов в листьях для перетока их в созревающий колос. Также была изучена активность ФК в фазу молочно-восковой спелости (таблица 4).

Таблица 4 - Изучение активности ФК МДГ-ГОАТ в пшенице сорта «Стекловидная - 24», собранной в фазу молочно-восковой спелости

№ п/п	Органы растения	Активность ФК МДГ-ГОАТ, мкМ/мг
1	зерно	425,8
2	колосковые чешуйки	187,09
3	листья	856,45
4	стебли	490,96

Из таблицы 4 видно, что активность ФК в листьях увеличилась по сравнению с молочной спелостью. Обращает на себя внимание высокая активность в зерне в эту фазу. Полученные результаты говорят о важной роли ФК в процессе налива зерна пшеницы. При анализе этих полученных данных хотелось бы обратить особое внимание на следующее: самая высокая активность ФК наблюдалась в листьях и созревающих зернах пшеницы. Из литературы известно, что именно листья являются центром иммобилизации веществ, необходимых для снабжения созревающего зерна ассимилятами, а зерна пшеницы являются акцепторным центром притока этих веществ. Таким образом, активность ФК может служить объективным критерием для оценки донорно-акцепторных отношений при созревании между листьями и колосьями пшеницы. Интересные результаты были также получены при изучении активности ФК в фазу восковой спелости, как это видно из таблицы 5.

Как видно из таблицы 5, активность ФК в листьях в эту фазу достигает своего максимума и становится равной 1350 мкМ/мг белка в минуту. Такая огромная активность ФК в листьях говорит о том, что ФК в этот период очень активно катаболизирует глютамат без выделения аммиака с образованием важных ассимилятов – 2-оксоглутарата и аспартата, а также энергетически очень ценного кофермента НАДН. В созревающем зерне активность составила 310 мкМ/мг белка в минуту. Обращает на себя внимание высокая активность в колосковых чешуйках 690 мкМ/мг белка в минуту, что говорит о важной роли чешуек в регуляции донорно-акцепторных отношений. Таким образом, активность ФК может служить четким маркерным признаком для оценки донорно-акцепторных отношений между листьями и колосом.

Таблица 5 - Изучение активности ФК МДГ-ГОАТ в пшенице сорта «Стекловидная - 24», собранной в фазу восковой спелости

№ п/п	Орган растения	Активность ФК МДГ-ГОАТ, мкМ/мг
1	зерно	310
2	колосковые чешуи	690
3	листья	1350
4	стебель	587

Анализ полученных результатов говорит об очень важной роли ФК в процессе формирования зерна пшеницы. Хотелось бы обратить особое внимание на активность ФК в отмирающих листьях в фазу восковой спелости. По сравнению с активностью ФК в листьях в начальную фазу вегетации активность этого фермента в желтеющих листьях в фазу восковой спелости увеличилась в 220 раз, что говорит о колоссальном синтезе ФК в листьях в эту фазу. Все это свидетельствуют об уникальной роли ФК в мобилизации азотистых веществ из листа в колос.

Таким образом, нами было установлено, что самая высокая активность была в желтеющих листьях. Получение ФК из них экономически выгодно, так как эти листья не представляют экономической ценности для работников сельского хозяйства.

Литература

1. Бекбаева Л.К., Туймебаева Б.Е.//Роль ферментной системы в устойчивости пшеницы к засолению// Материалы международной конференции молодых ученых и аспирантов «Актуальные проблемы земледелия и растениеводства», 10-11 декабря 2002 (тезисы докладов), КазНИИ Земледелия, Алмалыбак. - Алматы, 2003 г. - С. 62.
2. Колдасова А.С., Гильманов М.К.//Изучение ферментного комплекса, осуществляющего необратимое расщепление глутамата в растениях//Материалы международной конференции: Казахстанское общество сегодня: Наука, Культура, Экономика, Институт «Жетысу» - Талдыкорган, 2003. - С. 91-94.
3. Гильманов М.К., Колдасова А.С., Кудиярова Ж.С.//Изучение физико-химических свойств нового ферментного комплекса МДГ-ГОАТ основных злаковых культур//Вестник КАЗНУ, серия биологическая. - №4 (30). - Алматы, 2006. - С. 37-43.
4. Колдасова А.С., Гильманов М.К., Шалахметова Г.А., Цветкова Б.М., Колдасова Ш.С.//Методы изучения ферментного комплекса: малатдегидрогеназы-глутаматоксалоацетатаминотрансферазы, осуществляющего необратимое расщепление глутамата зерна пшеницы // Статьи методического сборника ИМБиБ "Методы молекулярной биологии, биохимии, иммунохимии и биотехнологии". - Алматы, 1999 г. - С. 93-98.
5. Kudiyarova Zh.S., Gilmanov M.K., Omirbekova N.Zh., Bekbaeva L.K., Kurmanov B.K. The structure and functions of evolutionary young enzyme complex MDH-GOAT// Nitrogen 2007. An international symposium on the nitrogen nutrition of plants, p. 56, 27-31 July 2007, Lancaster University –UK.

Түйін

Ферменттердің құрылысы мен реттелуінің лабораториясында бұрынды белгісіз малатдегидрогеназа (МДГ) және глутаматоксалоацетатаминотрансферазадан (ГОАТ) құралған ферментті комплекс ретінде жүретін ең алғаш глутамат катаболизмі анықталды. ФК алма қышқылының қайтымсыз тотығу реакцияларын түзілген глутамат пен қымыздық-сірке қышқылының амин топтарын ауыстыра отырып жүргізеді, ол өз кезегінде соңғы өнім ретінде аспарат пен 2-оксоглутарат түзілуіне әкеліп соғады. Тотықсызданған кофермент NADHта соңғы өнімге жатады. ФК-пен катализденетін реакциялар, бір жағынан, энергияны малаттан алуға мүмкіндік берсе, екінші жағынан, глутаматты өте құнды аммиакты жоғалтусыз катаболиздеуге (ыдыратуға) көмектеседі. Ең маңыздысы, нәтижесінде түзілетін аспарагин қышқылы, нуклеин қышқылдарының синтезіне қажет негізгі компоненті- пуриндердің түзілуіне қажет. Зерат ретінде «Стекловидная - 24» сортты бидай дәндері алынды. ФК белсенділігін 2-3 минут бойы өлшенеді. Белсенділікті 1 минут ішінде мг белокқа тотықсызданған NADH-тың мкМ-мен өлшеген. Белок мөлшерін 330 нм ұзындықта спектрофотометрикалық микробиурет әдісімен анықтаған. Ферменттік комплексті тазалаудың сызбасын келесі сатылардан тұрады: гомогенизация, центрифугалау, аммоний сульфатымен тұнбаға түсіру (30-70%), сефадекс G-50-де тұзсыздандыру, ДЕАЕ целлюлозадағы ионоалмасымды хроматография, DE-52.

Summary

In the laboratory, the structure and regulation of the enzyme was first discovered a new way of glutamate catabolism, carried out previously unknown enzyme complex (FC), consisting of malate dehydrogenase (MDH) and glutamatoxaloacetataminotransferase (GOAT). It is established that FC performs the irreversible oxidation of malic acid followed by transamination of oxaloacetic acid formed from glutamate, which leads to the formation of aspartate and 2-oxoglyutarata as end products. The final product is also recovered coenzyme NADH. Reactions catalyzed by FC, allow one side to get energy from malate and the other katabolizirovat glutamate without loss of precious ammonia. And, very importantly, the result is a aspartic acid necessary for the synthesis of purines - the important components of nucleic acid synthesis. The objects of study were the seeds of the cultivar 'glassy - 24'. The activity of the enzyme complex was measured for 2-3 minutes. Activity was determined in mM reduced NADH for 1 minute per mg protein. The amount of protein was determined by mikrobiuretovym spectrophotometrically at a wavelength of 330 nm. Scheme of purification of the enzyme complex includes the following steps: homogenization, centrifugation, ammonium sulfate precipitation (30-70%), desalting on Sephadex G-50, ion-exchange chromatography on DEAE cellulose, DE-52.

ӘОЖ 579. 66

Дудикова Г.Н., Сагындыков У.З.

АШЫТҚЫ ДАЙЫНДАУҒА АРНАЛҒАН СҮТҚЫШҚЫЛ БАКТЕРИЯЛАРДЫҢ КЕПТІРУ ТӘРТІПТЕРІН ЖАСАҚТАУ

Қазақ өндірісті қайта өңдеу және азықтық ғылыми-зерттеу институты, Алматы қаласы,
Қазақстан. utemurat@yahoo.fr

Қазақстан Республикасының үкіметінің «Республикалық микроорганизмдер коллекциясы туралы» №830 қаулысына сәйкес 2002 жылдың 30 шілдесінен біздің орталықтың коллекциясы өндірістік микроорганизмдер дақылдар депозитарі болды.