

В плане обсуждения полученных результатов следует подчеркнуть, что в настоящей работе в схеме синтеза ара-Г с использованием реакций трансгликозилирования и дезаминирования впервые применены три рекомбинантных бактериальных фермента.

Исследования выполнены при финансовой поддержке ГППИ «Новые биотехнологии».

Литература

1. Herrström Sjöberg A., Wang L., Eriksson S. Antiviral guanosine analogs as substrates for deoxyguanosine kinase: implications for chemotherapy // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2001. – Vol. 45. – P. 739–742.
2. Mikhailopulo I. A. Biotechnology of nucleic acid constituents – state of the art and perspectives // *Curr. Org. Chem.* – 2007. – Vol. 11. – P. 317–335.
3. Buie L. W., Epstein S. S., Lindley C. M. Nelarabine: a novel purine antimetabolite antineoplastic agent // *Clin. Ther.* – 2007. – Vol. 29, № 9. – P. 1887–1899.
4. Results of a phase II study of 506U78 in cutaneous T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma: CALGB 59901 / M. S. Czuczman, P. Porcu, J. Johnson et al. // *Leukemia, Lymphoma.* – 2007. – Vol. 48, № 1. – P. 97–103.
5. Nelarabine induced complete remission in an adult with refractory T-lineage acute lymphoblastic leukemia: a case report and review of the literature / P. Sigalas, A. D. Tourvas, A. Moulakakis et al. // *Leukemia Res.* – 2009. – Vol. 33, № 7. – P. 61–63.
6. Guanine, thioguanine, and related nucleosides by the mercuric cyanide–silyl method. An improved synthesis of 2'-deoxy-thioguanosine / W. W. Lee, A. P. Martinez, L. Goodman, D. W. Henry // *J. Org. Chem.* – 1972. – Vol. 37, № 19. – P. 2923–2927.
7. Stereoselective synthesis of 9-β-D-arabianofuranosyl guanine and 2-amino-9-(β-D-arabianofuranosyl)purine / X. J. Yu, G. X. Li, X. X. Qi, Y. Q. Deng // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2005. – Vol. 15, № 3. – P. 683–685.
8. Utagawa T. Enzymatic preparation of nucleoside antibiotics // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* – 1999. – Vol. 6, № 3. – P. 215–222.
9. Зинченко А. И. Биотехнологические подходы к получению фармакологически важных соединений нуклеиновой природы, перспективы развития направления // Первый съезд ученых Республики Беларусь (Минск, 1–2 нояб. 2007 г.). – Минск: Белорус. наука, 2007. – С. 396–404.
10. Utagawa T., Hirose Y. Enzymatic preparation of nucleosidic antibiotics // *J. Synth. Org. Chem. Jap.* – 1983. – Vol. 41, № 11. – P. 1076–1087.
11. A novel and simple method for the preparation of adenine arabinoside by bacterial transglycosylation reaction / T. Utagawa, H. Morisawa, T. Miyoshi et al. // *FEBS Lett.* – 1980. – Vol. 109, № 2. – P. 261–263.
12. A new method for the synthesis of some 9-β-D-arabinofuranosylpurines by a combination of chemical and enzymatic reactions / H. Morisawa, T. Utagawa, T. Miyoshi et al. // *Tetrahedron Lett.* – 1980. – Vol. 21, № 5. – P. 479–482.
13. Synthesis of 9-(β-D-arabinofuranosyl)guanine using whole sells of *Escherichia coli* / A. I. Zinchenko, V. N. Barai, S. B. Bokut et al. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1990. – Vol. 32, № 3. – P. 658–661.
14. Medici R., Iribarren A. M., Lewkowicz E. S. Synthesis of 9-β-D-arabinofuranosylguanine by combined use of two whole cell biocatalysts // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2009. – Vol. 19, № 15. – P. 4210–4212.
15. Sambrook J., Frittsch E., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* – 2-nd ed. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
16. Использование микроорганизмов для синтеза фармакологически активных нуклеозидов и нуклеотидов / С. В. Квач, Л. А. Ерошевская, А. И. Зинченко и др. // Новейшие достижения в области импортозамещения в химической промышленности и производстве строительных материалов: Матер. Междунар. науч.-техн. конф. в 2 ч., Минск, 25–27 ноября 2009 г. – Минск: БГТУ, 2009. – Ч. 2. – С. 25–29.
17. Ерошевская Л. А., Квач С. В., Зинченко А. И. Получение и использование генно-инженерной аденозиндезаминазы *Escherichia coli* // Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов: Матер. Всерос. симп. с междунар. участием, Москва, МГУ, 24–27 дек. 2009 г. – М.: МАКСПресс, 2009. – С. 61.
18. Morley R. S., Chen S., Rheault N. Assessment of the risk factors related to bovine spongiform encephalopathy // *Rev. Sci. Tech.* – 2003. – Vol. 22. – P. 157–178.

ПЦР-ДЕТЕКЦИЯ ЛАКТОФАГОВ В МОЛОКЕ И ПРОДУКТАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗРАБОТАННЫХ ПРАЙМЕРОВ

О. В. Дмитриева, А. П. Райский, Н. А. Белясова

Белорусский государственный технологический университет, Минск, Беларусь,
e-mail: 7050743@gmail.com

Для выявления вирулентных лактофагов и лизогенных бактерий *Lactococcus lactis* в настоящее время используют методы титрования проб на потенциально чувствительных бактериях. Этот малоэффективный подход опасен тем, что заранее невозможно предсказать, будут ли подобранные наугад бактерии поддерживать репродукцию фагов, содержащихся в пробе [1]. Гораздо более надежным и оперативным является метод детекции фагов, основанный на ПЦР-анализе. Данный метод нашел довольно широкое распространение в странах Европы, в Америке, Австралии, где используется для выявления в сырье, воде, полуфабрикатах, заквасках, а также в готовых продуктах лактофагов, доминирующих в этих странах

групп, – с2, 936 и P335 [2]. Для ПЦР-детекции фагов названных групп сконструированы олигонуклеотидные праймеры, обеспечивающие амплификацию фрагментов генов, уникальных для представителей каждой группы. Однако для лактофагов группы P034 таких праймеров не создано, поскольку эти фаги встречаются крайне редко в странах, где эффективно борются с фаголизисом, и P034-фаги остаются малоизученными. В то же время, как показано ранее [3], фаги группы P034 составляют более 17% изолятов доминирующих в Беларуси лактофагов, что предопределяет необходимость разработки способа их ПЦР-детекции. Для успешной борьбы с фаговой инфекцией и предотвращения развития фаголизиса необходимо иметь возможность вовремя выявлять фаги всех групп.

В данной работе представлены результаты детекции фагов в составе молока и молочных продуктов с использованием известных и впервые разработанных праймеров.

В работе использовали пробы молока и молочных продуктов, произведенных на различных комбинатах Республики Беларусь, а также пробы полуфабрикатов из технологических потоков одного из молочных комбинатов.

ПЦР-анализ осуществляли в объеме 50 мкл, содержащем 1 моль/л каждого из трех пар праймеров, специфичных по отношению к фагам групп с2, 936, P335 и P034; 1,25 U *Taq*-полимеразы ДНК («Fermentas», Литва), *Taq*-буфер 1x и 1 мкл пробы. В качестве контроля вместо лизата в рабочую смесь вносили 1 мкл стерильной среды M17. Амплификацию осуществляли в термоциклере «Терцик» при следующих режимах: 3 мин при 94 °С, 35 циклов по 30 с при 94 °С, 1 мин при 50 °С и 1 мин при 72 °С, последний шаг – 7 мин при 72 °С. ПЦР-продукты разделяли с использованием 1,5%-ного агарозного геля в ТАЕ-буфере, окрашивали бромистым этидием и визуализировали в УФ ($\lambda = 280$ нм).

Праймерами служили следующие последовательности: для фагов группы с2 – 5' CAATCGAAGCAG-GTGTAAAAGTTCGAGAAC 3', 5' GCTTTATCCATTTGTAGGTATGCTTCTGC 3'; для фагов группы 936 – 5' ATCAGTTGGCTCAATGGAAGACCAAGCGG 3', 5' GTTGCTTCTGCTGTTGGTGTCAAATGAGGA 3'; для фагов группы P335 – 5' GAAGCTAGGCGAATCAGTAAACTTGCTAG 3', 5' CGGCTATCTCGTCAATTGT-TCCGGTTGC 3'; для фагов группы P034 – впервые разработанные праймеры 5' ACCTGAAACACTTCCCGTCCA 3', 5' GCGGTTTCATGGGTCGAGTGGT 3'.

Согласно размерам и числу выявленных в мультиплексной ПЦР ампликонов можно судить о присутствии в пробах лактофагов молочных продуктов определенных видов. Эти данные систематизированы в табл. 1. На рис. 1 приведены результаты гель-электрофореза амплифицированных фрагментов ДНК лактофагов в предоставленных пробах.

Как следует из представленных данных, в 50% исследованных образцов полуфабрикатов содержатся лактофаги. Можно констатировать, что на данном предприятии распространены в основном фаги группы с2, ДНК которых в мультиплексной ПЦР обеспечивает формирование ампликонов размером 444 bp. По-видимому, основным источником этих лактофагов является молоко, в котором также обнаружены фаги группы с2. Кроме того, очевидна приуроченность лактофагов к процессам приготовления творога: фаги группы с2 присутствуют во всех пробах из технологической цепочки получения зерненого и мягкого творога. Более того, в пробах мягкого творога выявлены ДНК фагов двух групп: с2 (ампликон 444 bp) и 936 (ампликон 318 bp).

Таблица 1. Результаты ПЦР-детекции лактофагов в образцах полуфабрикатов из технологических потоков

№ образца	Источник	Размер ампликона, bp	Принадлежность выявленных фагов к группе
1	Пастеризованное молоко		Ампликоны отсутствуют
2	Смесь для приготовления творожной пасты		Ампликоны отсутствуют
3	Сыворотка зерненого творога	444	с2
4	Ряженка		Ампликоны отсутствуют
5	Зерно творога	444	с2
6	Пастеризованная смесь для приготовления ряженки		Ампликоны отсутствуют
7	Сырое молоко	444	с2
8	Обрат зерненого творога		Ампликоны отсутствуют
9	Простокваша		Ампликоны отсутствуют
10	Творог мягкий	318, 444	936, с2

Чтобы убедиться в объективности полученных с помощью ПЦР-анализа результатов, дублировали исследование образцов полуфабрикатов с помощью обычного метода агаровых слоев [4]. В качестве индикаторных бактериальных культур использовали 4 коллекционных штамма *L. lactis* с широким фаготипом. Результаты испытаний приведены в табл. 2.



Рис. 1. ПЦР-продукты образцов полуфабрикатов из технологических потоков: 1, 12 – 100 bp маркер, 2–9 – образцы полуфабрикатов из технологических потоков (см. табл. 1), 10 – контроль (фаг B1M BV-32), 11 – контроль (не содержит образца ДНК)

Таблица 2. Выявление зон лизиса на газонах бактерий при титровании проб продуктов

№ образца	Источник	Наличие зон лизиса на газонах тест-культур			
		<i>L. lactis</i> 502	<i>L. lactis</i> 503	<i>L. lactis</i> 510	<i>L. lactis</i> 411
1	Пастеризованное молоко	–	–	–	–
2	Смесь для приготовления творожной пасты	–	–	–	–
3	Сыворотка зерненого творога	+	+	+	+
4	Ряженка	–	–	–	–
5	Зерно творога	+	+	+	+
6	Пастеризованная смесь для приготовления ряженки	–	–	–	–
7	Сырое молоко	+	+	+	–
8	Обрат зерненого творога	–	–	–	–
9	Простокваша	–	–	–	–
10	Творог мягкий	+	+	–	–

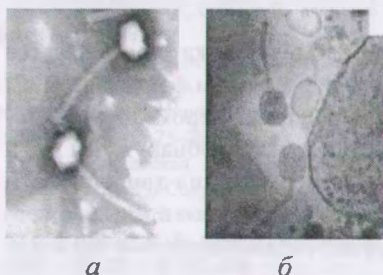


Рис. 2. Электронные микрофотографии лактофагов: а) представителей группы 936; б) представителей группы вида с2

Как следует из представленных в табл. 2 данных, в трех пробах («сыворотка зерненого творога», «зерно творога» и «сырое молоко») присутствуют поливалентные лактофаги, которые репродуцируются в клетках всех четырех взятых в исследование индикаторных бактерий. В пробе «творог мягкий» методом титрования выявлены негративные колонии только на газонах бактерий *L. lactis* 502 и 503. Возможно, это связано с низким титром каждого из видов фагов в пробе (согласно результатам ПЦР-анализа, в данной пробе присутствуют фаги двух видов). Для подтверждения принадлежности выделенных фагов к соответствующим группам исследовали их вирионы с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (JEM-100CX). В результате в исследованной выборке обнаружены представители фагов двух групп, чьи вирионы различаются морфологией капсидов и длиной отростков (рис. 2).

Можно заключить, что результаты микроскопического анализа подтвердили объективность метода ПЦР-детекции лактофагов с использованием нового набора праймеров.

Таблица 3. Результаты ПЦР-детекции лактофагов в образцах продуктов

Продукт (предприятие-изготовитель)	Размер ампликона, bp	Группа фагов
Сырок творожный (ГМЗ г. Новогрудок)	444	с2
Сыр «Голландский» (ГМЗ г. Щучин)		
Сметана (ГМЗ г. Щучин)		
Масса творожная (ГМЗ г. Могилев)	196	P335
Творог «Нежирный» (ГМЗ г. Новогрудок)	392	P034
Творог 9% (ГМЗ г. Щучин)		
Сметана 10% (ГМЗ г. Барановичи)	318	936
Творог 5% (Глубокский МКК)		
Сыр «Российский» (ГМЗ г. Ружаны)		

Разработанный метод опробован при выявлении лактофагов в образцах кисломолочных продуктов из различных регионов страны. Всего проанализировано 34 образца, из них в девяти пробах (26,5%) обнаружены фаги четырех доминирующих групп. Результаты анализа контаминированных продуктов приведены в табл. 3.

Таким образом, разработанные праймеры к уникальным фрагментам ДНК фагов группы P034 совместно с уже известными последовательностями, специфичными к геномам фагов групп с2, 936 и P335, позволяют выявлять и идентифицировать в ходе мультиплексной ПЦР лактофаги четырех групп в молоке и молочных продуктах.

Литература

1. Boucher, I. Phages of *Lactococcus lactis*: an ecological and economical equilibrium / I. Boucher, S. Moineau // Recent Res. Devel. Virol. – 2001. – Vol. 3. – P. 243–256.
2. Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk // B. del Rio [et al] // Food Microbiol. – 2007. – Vol. 24. – P. 75–81.
3. Raiski, A. Biodiversity of *Lactococcus lactis* bacteriophages in the Republic of Belarus / A. Raiski, N. Belyasova // Int. J. Food Microbiol. – 2009. – Vol. 130. – P. 1–5.
4. Основы бактериофагии / под ред. М. И. Габриловича. – Минск: Вышэйшая школа. – 1973. – 221 с.

ВЫДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА *PENICILLIUM ADAMETZII* ЛФ F-2044.1.17

Л. А. Жуковская, Р. В. Михайлова, Т. В. Семашко

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: enzyme@mbio.bas-net.by

Глюкозооксидаза (ГО) (β -D-глюкозо: O_2 -1-оксидоредуктаза, КФ 1.1.3.4.) – фермент класса оксидоредуктаз, катализирующий окисление β -D-глюкозы до β -D-глюконолактона и пероксида водорода. Фермент широко используется в пищевой промышленности в качестве антиоксиданта и консерванта [1], в медицине – в качестве диагностического и терапевтического средства [2]. В химической промышленности фермент применяется для получения гидрохинона, глюконовой кислоты и ее солей [3].

В лаборатории ферментов Института микробиологии НАН Беларуси трансформацией с использованием метода электропорации получен высокоактивный рекомбинантный штамм *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.17 [4].

Цель работы – выделить, очистить ГО *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.17 и изучить основные физико-химические свойства фермента.

В современной биотехнологии для получения препаратов ГО используют методы ультрафильтрации, ионообменной хроматографии, гель-фильтрации и гель-электрофореза, позволяющие разделить высоко- и низкомолекулярные компоненты смеси, обессолить и сконцентрировать растворы ферментов [5–7]. В зависимости от требуемой степени очистки получаемого ферментного препарата применяются как отдельные методы, так и их сочетание.

Концентрирование и обессоливание культуральной жидкости *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.17 осуществляли последовательно на полволоконных мембранных элементах из полисульфона на основе мембраны ПС 10М с рабочими объемами 0,2 и 1 м² («МИФИЛ», Беларусь), а также на ячейке для ультрафильтрации с рабочим объемом 200 мл и рабочей площадью мембраны 25 см² с использованием мембраны УПМ 10. Полученный частично очищенный препарат «Глюкозооксидаза-1» характеризовался ферментативной активностью 742,48 ед/мл и удельной активностью 101,71 ед/мг белка (таблица). Степень очистки фермента составила 1,17 раз.

Характеристика препаратов ГО *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.17

Препарат	Глюкозооксидазная активность, ед/мл	Удельная активность глюкозооксидаз, ед/мг белка	Степень очистки
Фильтрат культуральной жидкости	9,65 ± 0,29	86,94 ± 2,61	1,00
«Глюкозооксидаза-1»	742,48 ± 22,27	101,71 ± 3,05	1,17
«Глюкозооксидаза-2»	3767,43 ± 113,02	142,76 ± 4,28	1,64
«Глюкозооксидаза-3»	666,54 ± 19,20	204,46 ± 6,13	2,35