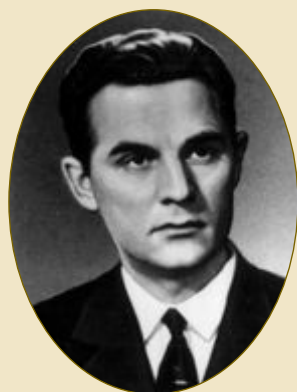


· БЕЛОЗЕРСКИЙ · ТОДД · СЕНГЕР · ОЧОА ·

· КОЛЬЦОВ · ШРЕДИНГЕР · ЭЙВЕРИ · ЧАРГАФФ · УОТСОН · КРИК ·

ВЕСТНИК
биотехнологии
и физико-химической
биологии
имени Ю.А. Овчинникова



Т. 3, № 1
2007

· КОРНБЕРГ · НИРЕНБЕРГ · КОРАНА · ТЕМИН · БАЛТИМОР · БАЕВ ·

· СМИТ · ГИЛБЕРТ · БЕРГ · ЭНГЕЛЬГАРДТ ·

2007, Т. 3, № 1

**ВЕСТНИК БИОТЕХНОЛОГИИ
И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ
ИМЕНИ Ю.А. ОВЧИННИКОВА**

Научно-практический журнал

Основан в 2005 году

Главный редактор

Р.Г. Васильов

Редакционная коллегия

Е.Г. Борисенко, В.С. Воробьев, С.И. Матаев, Ю.В. Махотин, О.Я. Мезенова

Редакционный совет

В.А. Быков (Москва), В.А. Вахитов (Уфа), М.С. Вонский (Санкт-Петербург),
В.Г. Дебабов (Москва), С.Х. Дегтярев (Новосибирск), В.В. Зверев (Москва),
А.И. Иваненко (Москва), В.Т. Иванов (Москва), Л.В. Калакуцкий (Пушино),
М.П. Кирпичников (Москва), О.И. Киселев (Санкт-Петербург), А.И. Мирошников (Москва),
Т.В. Овчинникова (Москва), О.Н. Озолинь (Пушино), Е.Н. Орешкин (Москва),
А.Н. Панин (Москва), Е.В. Пименов (Киров), В.О. Попов (Москва),
К.Г. Скрябин (Москва), Г. Хаммерлинг (Германия), Р.М. Хаитов (Москва),
В.И. Швец (Москва), Н.К. Янковский (Москва)

Журнал зарегистрирован в Росохранкультуре
Рег. ПИ № ФС77-19745 от 11 апреля 2005 г.

Зав. редакцией О.В. Воробьева
Адрес: 119296 Москва, Университетский пр-т, 9
Тел.: +7 (495) 648-09-13, 662-95-91
E-mail: obr@biorosinfo.ru, ptashka095@rambler.ru

Учредитель и издатель:

АНО «Информационно-аналитический центр
медико-социальных проблем»
Адрес: 127581 Москва, Керамический проезд, 53, кор. 1
Тел.: 8-926-470-22-00
E-mail: raifvasilov@mail.ru

*Издается при поддержке
Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова*

© Информационно-аналитический центр
медико-социальных проблем, 2007.

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

К читателям. *Р.Г.Василов* 4

Оригинальные статьи

Математическое моделирование метаболизма живой растущей клетки методом баланса стационарных метаболических потоков.

Н.Н. Назипова, В.В. Панюков, Р.А. Звягильская, Л.Н. Дроздов-Тихомиров 5

Новая эндонуклеаза рестрикции AluVI из *Arthrobacter luteus* В – изошизомер AluI, нечувствительный к присутствию 5-метилцитозина в сайте узнавания AGCT.

В.А. Чернухин, А.А. Болтенгаген, Г.В. Тарасова, В.С. Дедков, С.Х. Дегтярев 21

Сайт-специфическая эндонуклеаза BIsI узнает последовательность ДНК 5'-G(5mC)N↓GC-3' и расщепляет ее с образованием 3'-выступающих концов.

В.А. Чернухин, Ю.Э. Томилова, Е.В. Чмуж, О.О. Соколова, В.С. Дедков, С.Х. Дегтярев 28

Связывание цитратсинтазы и малатдегидрогеназы с внутренней мембраной митохондрий.

И.Г. Моргунов, С.В. Камзолова 34

Краткие сообщения

Биотехнология и проблемы сохранения биоразнообразия: возможные методы мониторинга экосистемных рисков ГМО.

В.С. Фридман, М.В. Фридман 41

Обзоры

Перспективы развития производства биотоплива в России. Сообщение 1: биодизель.

Р.Г. Василов..... 47

Страницы истории

Доказательство бесклеточного брожения – триумф естествознания XIX века: к 100-летию присуждения Нобелевской премии Эдуарду Бухнеру и 110-летию его открытия.

В.С. Воробьев, О.В. Воробьева 55

Юбилейные и знаменательные даты 2007 года 63

Хроника

События первого полугодия 2007 года 68

Информация

Предстоящие мероприятия 2007 года..... 76

Правила для авторов..... 78

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. *R.G. Vasilov* 4

Original articles

Mathematical modelling of a metabolism of the living growing cell by a method of steady state metabolic fluxes balance.

N.N. Nazipova, V.V. Panjukov, R.A. Zvyagilskaya, L.N. Drozdov-Tikhomirov 5

New restriction endonuclease AluBI from *Arthrobacter luteus* B – AluI isoshizomer, nonsensitive to presence of 5-methylcytosine in the recognition sequence AGCT.

V.A. Chernukhin, A.A. Boltengagen, G.V. Tarasova, V.S. Dedkov, S.Kh. Degtyarev 21

Site-specific endonuclease BIsI from *Bacillus simplex* 23 recognizes methylated DNA sequence 5'-G(m5C)N↓GC-3' and cleaves it producing 3' ends.

V.A. Chernukhin, Yu.E. Tomilova, E.V. Chmuzh, O.O. Sokolova, V.S. Dedkov, S.Kh. Degtyarev 28

Binding of citrate synthase and malate dehydrogenase with inner mitochondrial membrane.

I.G. Morgunov, S.V. Kamzolova 34

Short communications

Biotechnology and problems of preservation of a biodiversity: possible methods of monitoring of GMO ecosystems risks.

V.S. Fridman, M.V. Fridman 41

Reviews

Perspectives of development of biofuel production in Russia. The report 1: a biodiesel.

R.G. Vasilov 47

Pages of history

Demonstration of cell-free fermentation as a triumph of natural science of XIX century: to centenary from Eduard Buchner Nobel Prize awarding and 110 year jubilee of his discovery

V.S. Vorobyev, O.V. Vorobyeva 55

Anniversary and significant dates 2007 63

The chronicle

Events of the first half-year 2007 68

The information

Forthcoming actions 2007 76

Rules for authors 78

К читателям

Журнал вступает в третий год своего существования. Вышедшие номера предыдущих лет показали, что к ним проявляется интерес со стороны разных специалистов — биотехнологов, химиков, биологов. В 2007 году объявлена подписка на издание.

Первый номер этого года открывается обобщающей статьей по биоинформатике, подготовленной группой сотрудников во главе с Л.Н. Дроздовым-Тихомировым. Они представили данные по математическому моделированию метаболизма живой растущей клетки с помощью разработанного ими оригинального метода баланса стационарных метаболических потоков. Уровень исследования очень высок — на Западе так работает только одна группа Б. Палсона.

Журнал продолжает предоставлять страницы для точных, преемственных работ по молекулярной генетике, выполняемых в НПО «СибЭнзим» под руководством С.Х. Дегтярева. На этот раз они представили две статьи об эндонуклеазах рестрикции, выделенных из бактериальных штаммов *Arthrobacter luteus* и *Bacillus simplex*.

Интересную работу выполнили пушкинские исследователи (Моргунов И.Г., Камзолова С.В.), которые с помощью электронно-микроскопической иммуоцитохимии показали связывание с внутренней мембраной митохондрий двух митохондриальных ферментов цикла Кребса — цитратсинтазы и малатдегидрогеназы.

Читателям может оказаться полезным взвешенный, объективный взгляд биолога на проблему ГМО, изложенный в сообщении В.С. Фридмана с соавт.

Думаю, что представителям и фундаментальных, и прикладных наук будет интересен обзор последних данных по биотопливу. Речь пойдет сначала о биодизеле, а в следующих номерах будут представлены сведения о биоэтаноле и других энергоресурсах из возобновляемого сырья.

Как обычно, сформирована историческая рубрика. В нынешнем году исполняется 100 лет со дня получения Эдуардом Бухнером Нобелевской премии за открытие бесклеточного брожения. В связи с этим дан соответствующий биографический и библиографический материал. Приведен список юбилейных и знаменательных дат 2007 года по биотехнологии и физико-химической биологии. Помещены резюме ряда недавно вышедших книг по профилю журнала. Представлены хроника происшедших событий и информация о предстоящих мероприятиях текущего года.

В этом году в редакционный совет журнала вошли новые члены: М.С. Вонский из Санкт-Петербурга и С.Х. Дегтярев из Новосибирска. Надеемся на их активную работу.

**Главный редактор,
президент Общества биотехнологов России,
профессор Р.Г. ВАСИЛОВ**

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ МЕТАБОЛИЗМА ЖИВОЙ РАСТУЩЕЙ КЛЕТКИ МЕТОДОМ БАЛАНСА СТАЦИОНАРНЫХ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПОТОКОВ

Н.Н. НАЗИПОВА¹, В.В. ПАНЮКОВ¹, Р.А. ЗВЯГИЛЬСКАЯ²,
Л.Н. ДРОЗДОВ-ТИХОМИРОВ^{3*}

¹Институт математических проблем биологии РАН, Пушкино;

²Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН,

³Институт молекулярной генетики РАН, Москва

Разработано программное обеспечение для построения математической модели стационарного метаболизма растущей клетки, позволяющее рассчитывать оптимальные экономические коэффициенты роста биомассы и выделения продуктов биосинтеза, достижимые при идеальной регуляции процессов, и соответствующее этим оптимальным режимам метаболизма распределение скоростей реакций внутри клетки и в ее компартментах, включая скорости обмена метаболитами между компартментами. Созданная программа FLUX II работает в среде Windows. Программа имеет удобный интерфейс, обеспечена средствами, исключающими заикливание алгоритма и позволяющими проводить содержательный анализ построенной модели. Программа обеспечивает также представление результатов расчета и анализа модели в цифровой и графической форме. С помощью созданной программы построена и исследована математическая модель метаболизма митохондрий дрожжей, растущих на сахаре в анаэробных условиях. Показано удовлетворительное согласие результатов расчетов и анализа с данными, полученными в эксперименте. Обсуждены возможные пути использования программы при решении практических задач современной биотехнологии.

Ключевые слова: математическое моделирование, модель стационарного клеточного метаболизма, экономический коэффициент биосинтеза, оптимизационные задачи, линейное программирование.

Введение

Существование живой клетки полностью определяется ее метаболизмом, — совокупностью большого числа взаимозависимых химических реакций, протекающих согласованно во времени, скорость протекания которых определяется белками-ферментами. В результате метаболических реакций осуществляется воспроизведение всех структурных и функциональных молекулярных компонентов клетки, определяющих ее деятельность в качестве живой системы, то есть реализуется основное свойство живой клетки — ее способность к самовоспроизведению. Метаболизм клетки включает в себя сотни реакций и является сложной саморегулирующейся системой.

В настоящее время метаболизм клеток многих прокариотических организмов (таких как *Escherichia coli*,

Bacillus subtilis, *Clostridium acetobutylicum* и ряд других) подробно и всесторонне изучен. Накопленные знания используются для построения математических моделей происходящего в них обмена веществ. С помощью таких моделей можно решать не только фундаментальные, но и прикладные задачи.

Известно, что эволюционное развитие организма и формирование его генотипа происходит, в конечном счете, в результате случайного мутагенеза и фенотипической селекции. Генная инженерия позволяет искусственно изменять генотип клетки и, следовательно, ее свойства в нужном направлении. При этом используется итеративный подход, заключающийся в выделении фрагмента метаболизма, который определяет некоторое свойство клетки, и последующем проведении определенных генноинженерных манипуляций для модификации, исключения или создания заново генов ферментов, обуславливающих функционирование выделенного фрагмента метаболизма. В результате получается усиление или ослабление интересующего свойства клетки.

* Автор для переписки:

© 2007 г. Дроздов-Тихомиров Л.Н.

Институт молекулярной генетики РАН

E-mail: drozdov@img.ras.ru

Как правило, один и тот же продукт биосинтеза может быть получен несколькими метаболическими путями, проходящими через разные промежуточные этапы и отличающимися распределением скоростей реакций на этих этапах. Математическое моделирование позволяет найти и проанализировать все возможные варианты получения продуктов биосинтеза и найти среди них тот, который является в определенном смысле оптимальным.

Процесс моделирования метаболизма клетки предполагает то или иное количественное описание системой уравнений биохимических реакций, составляющих процесс ее жизнедеятельности.

Можно моделировать метаболизм, используя традиционный кинетический метод, обычно применяемый в химии. При этом составляются дифференциальные уравнения, описывающие изменения во времени концентраций метаболитов, участвующих в реакциях. Модель метаболизма клетки в этом случае будет представлять собой систему нелинейных дифференциальных уравнений, включающих в себя большое число кинетических констант, величины которых должны быть получены из эксперимента. Решение таких систем нелинейных уравнений связано с большими математическими трудностями, которые до появления современных вычислительных мощностей представлялись вообще непреодолимыми. Дело еще серьезнее осложняется тем, что получение достоверных экспериментальных данных для всех входящих в уравнения кинетических констант практически невозможно. По данным статьи [1], только для нескольких метаболических путей, а именно — для путей гликолиза и метаболизма аденина в эритроцитах человека, известны все входящие во все уравнения кинетические константы.

Далее, упомянутый в нашей задаче критерий оптимальности, который должен обеспечить изучаемый объект, например, максимальный выход некоторого продукта, означает, что объект должен находиться в стационарном состоянии. В самом деле, пусть выход продукта изменяется во времени, например, растет. Тогда максимум выхода еще не достигнут, то есть, изучаемый объект еще не находится в нужном для нас состоянии и т.д. Широко известны два способа получения стационарных решений системы дифференциальных уравнений. Нужно либо решать задачу Коши на большом интервале времени, либо находить корни правых частей уравнений. В нашем случае ни один из указанных способов практически не осуществим.

Это делает кинетический подход непригодным для математического моделирования метаболизма клетки в целом в настоящее время.

Другим, значительно более эффективным подходом, позволяющим уже в настоящее время построить модель метаболизма клетки в целом, является метод баланса стационарных метаболических потоков. Этот подход отличается от кинетического тем, что при нем моделируется не изменение концентраций метаболитов во времени, а картина распределения скоростей метаболических реакций. При таком подходе модель метаболизма представляет собой систему линейных алгебраических уравнений, переменными которой являются скорости метаболических реакций в стационарном состоянии метаболической системы. Параметрами модели в этом случае являются стехиометрические константы метаболических реакций, хорошо известные в настоящее время.

В 1984 г. Papoutsakis [2] предложил использовать метод баланса стационарных метаболических потоков для построения математической модели метаболизма *Clostridium acetobutylicum*, продуцента ряда органических растворителей. Построенная модель, включающая в себя 14 реакций, позволила количественно описать процесс биосинтеза растворителей культурой продуцента *Clostridium acetobutylicum* и некоторых его штаммов при росте на глюкозе в хорошем соответствии с экспериментом. Предложенный подход был развит в 1999 г. [3] путем введения и учета некоторого количества нелинейных ограничений, полученных с использованием измеренных в эксперименте кинетических констант.

Независимо метод баланса стационарных метаболических потоков был применен другими исследователями [4, 5] для построения математической модели метаболизма глюкозы. В этих моделях воспроизводился лишь небольшой фрагмент метаболизма клетки, и они, разумеется, еще не могут считаться моделью метаболизма клетки в целом.

Стационарное течение метаболических реакций (то есть протекание всех реакций с постоянной скоростью) наблюдается в клетках, растущих с постоянной скоростью (например, бактериальные клетки на экспоненциальной стадии роста). Для этого случая метод баланса стационарных метаболических потоков, в принципе, позволяет построить полную модель метаболизма, происходящего в живой растущей клетке.

Подход к моделированию метаболизма клетки в целом с использованием метода баланса стационарных метаболических потоков был впервые предложен и осуществлен в 1986 г. в России Л.Н. Дроздовым-Тихомировым с сотр. [6] (объект моделирования — метаболизм продуцента лизина *Corynebacterium glutamicum*). Эта

работа была продолжена в последующие годы и ее результаты частично опубликованы [7, 8, 9].

В западной литературе подход к моделированию метаболизма клетки, основанный на методе баланса стационарных метаболических потоков, в начале 90-х годов был предложен Стефаном Шустером [10], а затем получил независимое развитие в многочисленных работах Б. Палсона с соавторами [11–32] под названием Flux Balance Analysis (FBA). В работах группы Б. Палсона потоковый подход был широко использован для конструирования математических моделей метаболизма кишечной палочки *Escherichia coli* и пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и анализа с помощью построенных моделей экономических характеристик метаболизма этих микроорганизмов. Использование метода баланса стационарных метаболических потоков при исследовании метаболизма различных микроорганизмов в работах групп Б. Палсона и Л.Н. Дроздова-Тихомирова с сотрудниками продемонстрировало большие возможности этого подхода для построения математических моделей метаболизма растущей клетки в целом.

Эффективность применения потокового подхода для построения математических моделей метаболизма клетки и исследования с их помощью свойств клетки как сложной биохимической системы во многом зависит от используемых математических методов и программ. Последние должны быть разработаны с учетом необходимости максимальной автоматизации сложной процедуры построения модели, решения соответствующих систем уравнений и представления полученных результатов в удобном для понимания виде.

Эта важная при использовании подхода для решения конкретных задач сторона дела практически не освещена в опубликованных работах Б. Палсона. В исследованиях Л.Н. Дроздова-Тихомирова используется разработанный в 1985 году пакет программ FLUX, ориентированный на работу в среде DOS. Программное обеспечение FLUX имело неудобный интерфейс и обладало серьезным недостатком — чувствительностью к тому, в каком порядке перечислены реакции моделируемой системы в задающем моделируемую систему списке биохимических реакций. Подбор вручную порядка перечисления реакций, при котором программа FLUX находит решение задачи распределения скоростей в системе, может занять неопределенно большое время, что в некоторых случаях сильно затрудняет работу. Кроме того, результаты расчета представляются программой FLUX в не очень удобном для понимания и сравнения виде.

Задачей настоящей работы было создать программу, работающую в среде Windows и максимально автоматизирующую построение модели, с удобным интерфейсом, с возможностью представления результатов в любом виде по выбору исследователя (в том числе, и в графическом) и, что самое главное, свободную от указанного выше недостатка программы FLUX, связанного с заикливанием в некоторых случаях алгоритма линейного программирования.

Материалы и методы

Принципы построения потоковой модели полиферментной системы. Потоковый подход (метод баланса стационарных метаболических потоков — БСМП), который может быть использован для построения математической модели метаболизма клетки, опирается на закон сохранения материи. Уравнения потоковой модели составляются для системы взаимодействующих метаболитов, являющейся открытой термодинамической системой, находящейся в стационарном состоянии обмена с внешней средой. В этом состоянии система с постоянной скоростью включает в себя определенные метаболиты из внешней среды — субстраты. Поток субстратов является входным материальным потоком. Вошедшие в клетку субстраты вступают между собой в реакции, образуя множество внутренних компонентов системы — промежуточных метаболитов, или интермедиатов. Концентрация каждого интермедиата в системе в стационарном состоянии остается постоянной за счет того, что суммарная скорость притока из всех реакций, в которых он образуется, равна суммарной скорости оттока в реакциях, в которых он потребляется. На определенном этапе в системе происходят необратимые реакции, в результате которых образуются «продукты» — метаболиты, не вступающие более в реакции с промежуточными метаболитами. Эти продукты накапливаются с постоянной скоростью, образуя выходной материальный поток метаболизма. Согласно закону сохранения материи, атомарный состав и количество атомов вещества в выходном потоке должны быть равны атомарному составу и количеству атомов во входном потоке.

Уравнения потоковой модели представляют собой фактически запись закона сохранения материи для пула каждого из метаболитов рассматриваемой метаболической системы, включая субстраты и продукты.

Для интермедиатов, концентрации которых в системе остаются постоянными, уравнения баланса потоков

записываются как равенство между суммарной скоростью притока из всех реакций, в которых они образуются, и суммарной скоростью оттока во все реакции, в которых они потребляются.

Для продуктов и субстратов уравнения баланса записываются как равенство скоростей их притока (или оттока) некоторым постоянным величинам, задаваемым при постановке задачи. Ясно, что величины задаваемых скоростей накопления продуктов (выходной поток) и притока субстратов (входной поток) не должны противоречить закону сохранения материи.

Совокупность уравнений баланса потоков, написанных для каждого из компонентов метаболической системы, образует систему уравнений, являющуюся потоковой математической моделью рассматриваемой метаболической системы.

Построение потоковой модели метаболизма клетки. Метаболизм клетки, находящейся в стадии стационарного роста, можно считать стационарным. Для построения потоковой математической модели стационарного метаболизма некоторой конкретной клетки требуются следующие данные:

- список метаболитов, являющихся компонентами метаболической системы клетки;
- список реакций, которые могут происходить между метаболитами клетки, определяемый составом ферментов, имеющихся в клетке;
- список субстратов, которые клетка использует для роста;
- список молекулярного состава биомассы клетки и удельных скоростей выделения клеткой продуктов биосинтеза в среду;
- величина удельной скорости роста клетки на заданных субстратах.

Эти данные являются входной информацией, на основе которой строится математическая потоковая модель метаболизма рассматриваемой клетки, представляющая собой систему уравнений:

$$\sum_{i=1}^n S_{ij} v_i = F_j, j = 1, 2, \dots, m, \text{ где}$$

n — число возможных реакций (различных ферментов) в клетке;

m — число различных метаболитов в клетке;

S_{ij} — стехиометрические коэффициенты i -ой реакции (число молекул j -го метаболита, которое потребляется (-) или образуется (+) в одном акте i -ой реакции);

v_i — скорость i -ой реакции;

F_j — результирующий поток (приток/отток) j -го метаболита (скорость изменения концентрации метаболита в клетке).

Уравнения модели описывают баланс метаболитов трех типов.

1. *Метаболиты-продукты.* Это — целевые продукты метаболизма (ферменты, структурные белки, РНК, ДНК, компоненты мембран и др.), необходимые для самовоспроизведения, и низкомолекулярные продукты биосинтеза, выделяемые клеткой в среду. Величины F_j в уравнениях баланса для этих метаболитов задаются на основе списка молекулярного состава биомассы клетки и скоростей выделения клеткой в среду тех или других продуктов биосинтеза.

2. *Внутренние промежуточные метаболиты (интермедиаты)* — метаболиты, концентрация которых в стационарном состоянии остается постоянной. Образование этих метаболитов в клетке уравновешено их расходом. Величины F_j в уравнениях баланса этих метаболитов равны нулю.

3. *Внешние метаболиты* — метаболиты, поступающие из среды в клетку или выходящие из клетки в среду за счет транспорта через мембрану. Все субстраты роста являются внешними метаболитами. Величины потоков потребления субстратов F_j , если они измерены, могут быть указаны в списке субстратов.

Если величины F_j определены для всех метаболитов рассматриваемой метаболической системы (включая внешние метаболиты), то полученная система уравнений будет полной потоковой моделью метаболизма клетки.

Система уравнений полной модели метаболизма клетки, как правило, имеет однозначное решение, позволяющее получить действительную картину распределения скоростей реакций в метаболической сети рассматриваемой клетки, если измерены все входные и выходные потоки и определен молекулярный состав биомассы клетки.

Определение максимально возможных значений экономических коэффициентов метаболической системы клетки (оптимизационная задача). Для построения полной математической модели какой-либо конкретной клетки в настоящее время, к сожалению, не хватает требующегося для этой цели набора экспериментальных данных.

Однако, располагая данными только о молекулярном составе биомассы и о ферментном составе клетки, которые в настоящее время известны для клеток многих организмов, можно решать очень важные задачи, отно-

сящиеся к проблемам экономики метаболизма клетки, так называемые оптимизационные задачи.

Одним из уникальных достоинств, которыми обладает метод БСМП, является его способность к определению потенциальных возможностей продуктивной работы метаболической машины клетки, то есть определения значений предельно возможных экономических коэффициентов для различных продуктов биосинтеза клетки. Потребляя субстрат роста (источник углерода) из среды, растущая клетка синтезирует определенное количество продуктов: биополимеры, образующие основную часть биомассы клетки, и низкомолекулярные продукты биосинтеза, выделяемые в среду. Выход того или иного продукта на единицу потребленного клеткой субстрата называют экономическим коэффициентом его биосинтеза. Величина экономических коэффициентов зависит от совершенства регуляции скоростей происходящих в клетке взаимосвязанных ферментативных реакций.

Для решения оптимизационной задачи производится редукция математической модели исследуемой метаболической системы, которая осуществляется путем исключения из исходной полной модели уравнений баланса всех внешних метаболитов, в том числе субстратов роста. Полученная редуцированная система линейных уравнений содержит меньше уравнений, чем исходная, и то же число переменных (скоростей реакций), то есть становится недоопределенной. Решение такой оптимизационной задачи при заданной целевой функции может быть получено с использованием методов линейного программирования. Целевая функция оптимизационной задачи очевидна — это либо поток потребления субстрата (субстратов) при заданном потоке образования продукта (минимизация), либо поток образования продукта при заданном потоке потребления субстрата (максимизация).

Мы не обсуждаем здесь различные соображения о возможных вариантах построения и трактовки целевой функции в оптимизационной задаче, высказанные в литературе [1, 3, 4], потому что это выходит за рамки настоящей статьи.

Результаты

Программное обеспечение для математического моделирования метаболизма клетки и решения оптимизационных задач. Итак, мы поставили очень интересную и важную задачу — найти такое распределение скоростей в метаболической сети клетки, при котором

синтез целевых продуктов клетки, обеспечивающих ее самовоспроизведение, и выделение некоторых побочных продуктов биосинтеза в среду будет осуществляться при минимально возможном входном потоке заданных субстратов роста. В общем случае это может быть любая комбинация субстратов роста, в том числе, и просто один из них. Программный комплекс FLUX II предназначен для решения таких оптимизационных задач метаболизма клетки.

На первом этапе работы программы строится исходная система уравнений, представляющая собой полную модель исследуемой метаболической системы, правые части которой пока не определены. Для этого используется полная стехиометрическая матрица всех реакций, происходящих в клетке (включая транспортные реакции обмена со средой). Затем исходная система уравнений редуцируется путем исключения из нее уравнений для тех метаболитов, баланс образования и расходования для которых не задан в условии задачи. В результате число уравнений редуцированной системы становится меньше числа переменных, равному числу происходящих в системе реакций. Подчеркнем, что число реакций (число переменных) в редуцированной системе остается тем же, что было в исходной.

Далее формируется целевая функция задачи и на основе данных о молекулярном составе биомассы и скорости выделения заданных продуктов биосинтеза в среду, определяются правые части редуцированной системы уравнений.

Целевая функция оптимизационной задачи задается как сумма входных потоков рассматриваемых субстратов роста, уравнения баланса которых не присутствуют в редуцированной системе уравнений. В зависимости от того, в каких единицах предполагается определять экономические коэффициенты (в молях субстратов на 1 моль продукта, в граммах субстратов на 1 грамм продукта или каких-либо других), величины входных потоков входят в целевую функцию с различными весовыми коэффициентами, которые задаются исследователем.

Рассматриваемая оптимизационная задача является канонической задачей линейного программирования и может быть записана в матричной форме в следующем виде:

$$Sv = f \quad (1)$$

$$Q(v) = \sum_{1 \leq j \leq n} q_j v_j \rightarrow optimum \quad (2)$$

$$v_j \geq 0, \quad 1 \leq j \leq n \quad (3)$$

Система уравнений (1) описывает баланс потоков. Здесь

$f^T = (f_1, \dots, f_m)$ — вектор-столбец потоков (символ транспонирования T переводит столбец в строку);

$S = (S_{ij})$, $1 \leq i \leq m$, $1 \leq j \leq n$ — матрица коэффициентов, в данном случае это стехиометрическая матрица;

$v = (v_1, \dots, v_n)$ — скорости реакций.

Уравнение системы с номером k — это уравнение материального баланса для k -го метаболита.

$$\sum_{1 \leq j \leq n} S_{kj} v_j = f_k$$

Мы говорим, что метаболит с номером k имеет положительный, отрицательный или нулевой материальный баланс соответственно при $f_k > 0$, $f_k < 0$, $f_k = 0$. Неравенства (3) — типичные условия канонической задачи линейного программирования. Содержательный смысл этих ограничений заключается в том, что скорости всех реакций должны быть неотрицательны. Однако скорости обратимых реакций могут иметь произвольные знаки. Для того чтобы не выходить за рамки канонической задачи линейного программирования, каждая обратимая реакция заменяется двумя: прямой и обратной. Обе они имеют неотрицательные скорости. Этот прием позволяет удовлетворить условиям (3).

Из сказанного следует, что данная задача линейного программирования (1)–(3) соответствует m метаболитам (m уравнений баланса), участвующим в n химических реакциях (n переменных, скоростей реакций). В оптимизационной задаче всегда имеет место неравенство $n \geq m$.

Условие (2) задает целевую функцию $Q(v)$, в которую входят весовые коэффициенты q_j . Для общности целевая функция задается как взвешенная линейная комбинация всех потоков. При решении задачи нахождения максимальных/минимальных значений экономических коэффициентов используется самый простой вид целевой функции с весовыми коэффициентами, равными 1 для потоков заданных субстратов и равными 0 для всех остальных.

Оптимизационная задача может рассматриваться как задача поиска либо максимума, либо минимума целевой функции. При этом оптимизируется или выход биомассы при заданном потреблении субстрата (субстратов), или расход субстрата (или их комбинации) на производство заданного количества биомассы.

Таким образом, сформулированная задача является задачей линейного программирования. Линейное программирование представляет собой математический аппарат, разработанный для решения оптимальных задач с линейными выражениями для критерия оптимальности и линейными ограничениями на область изменения переменных. Для решения большого круга задач линейного программирования имеется практически универсальный алгоритм — симплекс-метод, позволяющий за конечное число итераций находить оптимальное решение. Тип используемых ограничений (равенства или неравенства) не сказывается на возможности применения указанного алгоритма. Дополнительной проверки на оптимальность для получаемых решений не требуется.

Особенностями задачи является то, что стехиометрическая матрица и вектор потоков сильно разрежены, а погрешности экспериментальных измерений значений потокового вектора иногда могут привести к несовместности системы.

В задаче линейного программирования (1)–(3) фигурируют два векторных пространства. Одно из них размерности n — оно содержит все векторы v , которые являются решением системы (1). Второе пространство имеет размерность m и содержит вектор потоков f и векторы-столбцы матрицы S . При рассмотрении классического алгоритма мы будем считать, что ранг матрицы S равен m ($\text{rank}(S) = m$).

Множество решений системы (1) образует многогранник, обозначим его R_h (многогранник решений) размерности $(n-m)$, $f_k \geq 0 \forall k$. Так как целевая функция достигает своего экстремума в одной из вершин R_h , то нужно осуществить некоторый просмотр этих вершин.

Каждому решению $v = (v_1, v_2, \dots, v_n)$ системы (1) сопоставим множество индексов положительных компонент вектора v , которое обозначим $I^+(v)$. Такой вектор v является вершиной R_h тогда и только тогда, когда векторы-столбцы $S_{j \cdot}$, с индексами $j \in I^+(v)$ линейно независимы. Так как $\text{rank}(S) = m$, то вершина имеет не более m положительных компонент. Вершина v называется невырожденной, если она имеет m положительных компонент, в противном случае она называется вырожденной. Всякое подмножество из m независимых столбцов матрицы S называется базисом задачи линейного программирования — далее, кратко, базисом.

Из вышесказанного следует, что выбор очередной вершины многогранника R_h для просмотра можно заменить выбором базиса. Находясь в текущей вершине, симплекс-метод определяет правило выбора базиса и вычисления вершины многогранника R_h , отвечающей

этому базису. Полученная вершина объявляется текущей. Если текущая вершина не вырождена, то вершина, вычисленная по выбранному базису, отлична от текущей и целевая функция в ней уменьшается. Понятно, что если R_h состоит только из невырожденных вершин, то симплекс-метод обязательно приведет нас к минимуму целевой функции, поскольку число вершин многогранника R_h конечно.

Если текущая вершина вырождена, то вершина, вычисленная по выбранному базису, может совпадать с текущей вершиной. В этом случае симплекс-метод может зациклиться, что иногда и наблюдается на практике. При этом последовательность выбираемых базисов циклически повторяется, а значение целевой функции не меняется. Сделав шаг симплекс-метода, мы остаемся в той же точке, лишь заменив один ее базис на другой. Это может быть обусловлено особенностями решаемой задачи, например, погрешностями при задании метаболической системы списком биохимических реакций, влиянием погрешностей входных экспериментальных данных и погрешностями округления при построении симплекс-таблиц.

Антициклин — это метод выбора очередного базиса, гарантированно спасающий программу от закливания на этапе выбора очередного базиса. Известен ряд антициклинов [35]. Однако использование тех или иных методов борьбы с закливаниями бывает связано с затратами оперативной памяти, занятыми громоздкими таблицами, дублирующими столбцы симплекс-таблицы, либо с дополнительными вычислительными временами, необходимыми для постоянного переупорядочивания столбцов.

В связи с тем, что реализация антициклинов более трудоемка, чем классический выбор базиса, в литературе рекомендуется включать антициклин только при подозрении на закливание, например, если значение целевой функции не изменяется на большом числе итераций. Здесь необходимо выбирать между эффективностью программного кода и удобством пользователя. Мы сделали выбор в пользу последнего. Созданное нами программное обеспечение содержит антициклин, это обеспечивает удобство для пользователя, не обязанного знать о трудностях симплекс-метода и особенностях задачи.

Созданное программное обеспечение FLUX II осуществляет построение математической модели стационарного метаболизма живой клетки на основе данных о биохимической структуре клетки с использованием метода БСМП. Программа производит решение за-

данной оптимизационной задачи и расчет распределения скоростей реакций, обеспечивающих предельные значения экономических коэффициентов для заданных продуктов биосинтеза при росте на заданных субстратах. Программа обладает развитым пользовательским интерфейсом и большими возможностями при исследовании метаболических систем различных клеток.

Программное обеспечение представляет собой специализированную систему управления базой данных по метаболическим системам клеток и их фрагментам, включающую в себя расчетный модуль и пользовательский интерфейс. Программа имеет удобный оконный интерфейс. С программой может работать как начинающий, так и продвинутый пользователь. Начиная пользователь может изменять параметры метаболических систем, собранных в прилагаемую к программной компоненте базу данных `tasks.mbd`. Таким образом, он может моделировать различные сценарии работы реальных метаболических систем. Продвинутый пользователь может вводить данные о новых метаболических системах, записывать созданные метаболические системы в базу данных, моделировать различные сценарии и т.д. Созданный оконный интерфейс с помощью подсвечивания доступных в данный момент работы кнопок подсказывает пользователю дальнейшие шаги работы.

Программная разработка представляет собой две подсистемы:

1. Подсистема управления базой данных (БД).
2. Подсистема построения, анализа и расчета потоковой модели по данным из БД, включающая в себя:
 - подпрограмму автоматического формирования системы уравнений модели;
 - подпрограмму анализа системы уравнений и проведения диагностики ошибок;
 - подпрограмму решения системы уравнений модели;
 - подпрограмму представления результатов расчета в заданном виде (цифровом и графическом).

Обе подсистемы реализованы в виде одной расчетно-информационной оболочки, которая имеет 4 уровня вложенности (рис. 1): задача, реакции, анализ, результат. Уровень «задача» первоначально реализует работу с БД по метаболическим системам, он является основным в процессе работы программы. Все связи между данными и процессами отражаются на этом уровне работы приложения. Например, когда пользователь выбрал метаболическую систему в БД и нажал кнопку «загрузить», то на экране появляются новые кнопки и доступные уровни («реакции», «анализ»), когда после этого он нажимает

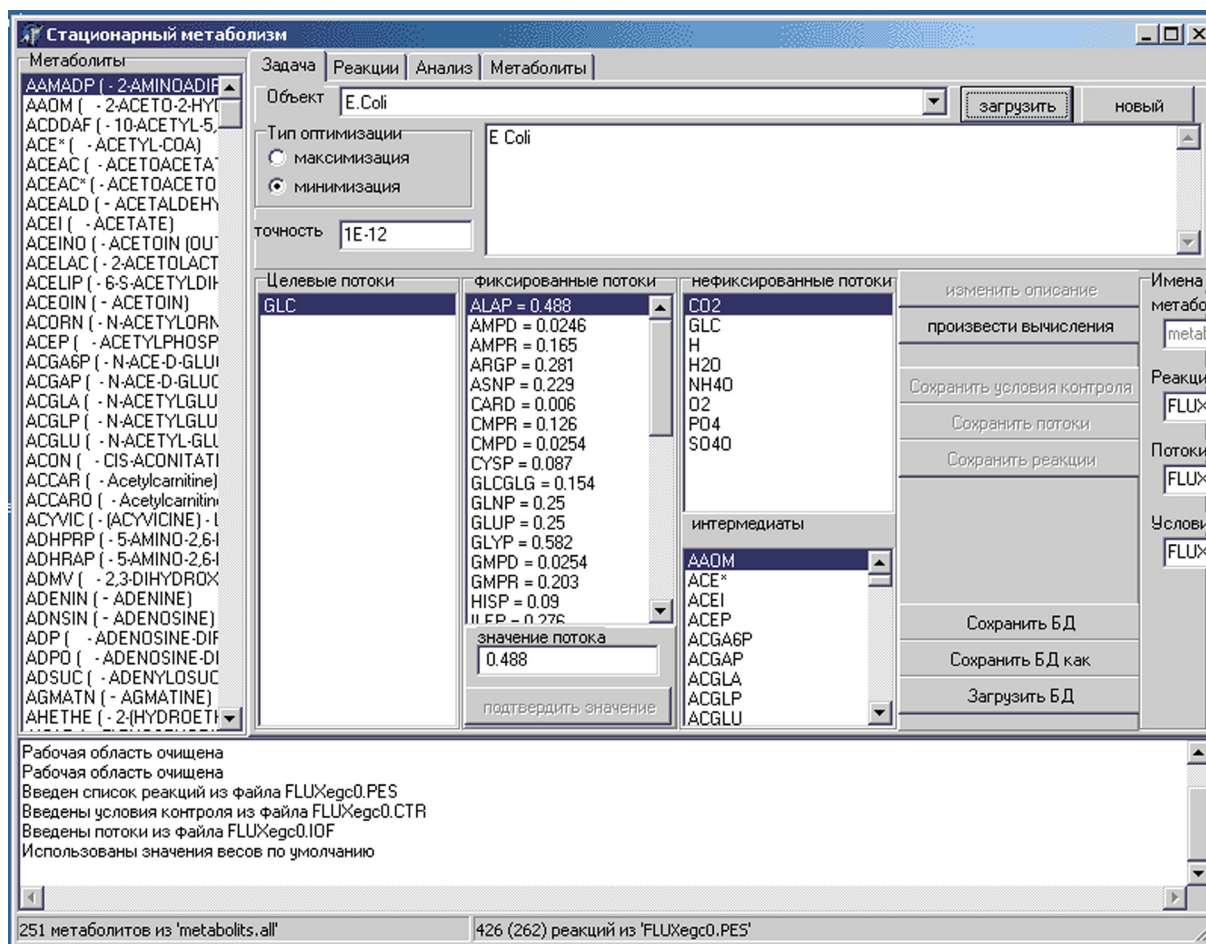


Рис. 1. Вид интерфейса программы FLUX II. Загружена метаболическая система митохондрий дрожжей, растущих на сахаре в анаэробных условиях. Доступны сервисы Анализ, Реакции, Метаболиты, Задача

кнопку «произвести вычисления», то становится доступным новый уровень «результаты».

Вид представления результатов (рис. 2.) определяет пользователь. Выходные данные — скорости реакций и значения балансов потоков метаболитов. Имеется возможность выдачи результатов в числовом виде или в виде диаграмм. Численные значения результатов, а также значения входных данных в любом объеме (задается пользователем) могут быть записаны в текстовый файл протокола, который можно хранить, редактировать, распечатывать по желанию пользователя. Содержимое протокола можно скомпоновать из полного множества, включающего в себя:

- контрольную полную копию входных данных задачи;
- список величин скоростей реакций в искомом состоянии метаболической системы, при котором система синтезирует заданные продукты, потребляя заданные субстраты с предельным значением

(максимальным или минимальным) экономического коэффициента;

- сформированная стехиометрическая матрица системы;
- список ферментативных реакций с указанием рассчитанной скорости для каждой из реакций;
- полный список величин балансов потоков образования/расхода для всех метаболитов системы.

Экранный вывод результатов включает дополнительно графическое представление распределения скоростей и величин потоков в искомом оптимальном состоянии системы.

Исследуемая метаболическая система определяется заданием 4 текстовых файлов:

- список ферментативных реакций, которые могут происходить в клетке (файл с расширением .PES);
- список метаболитов, участвующих в реакциях (файл с расширением .MET);

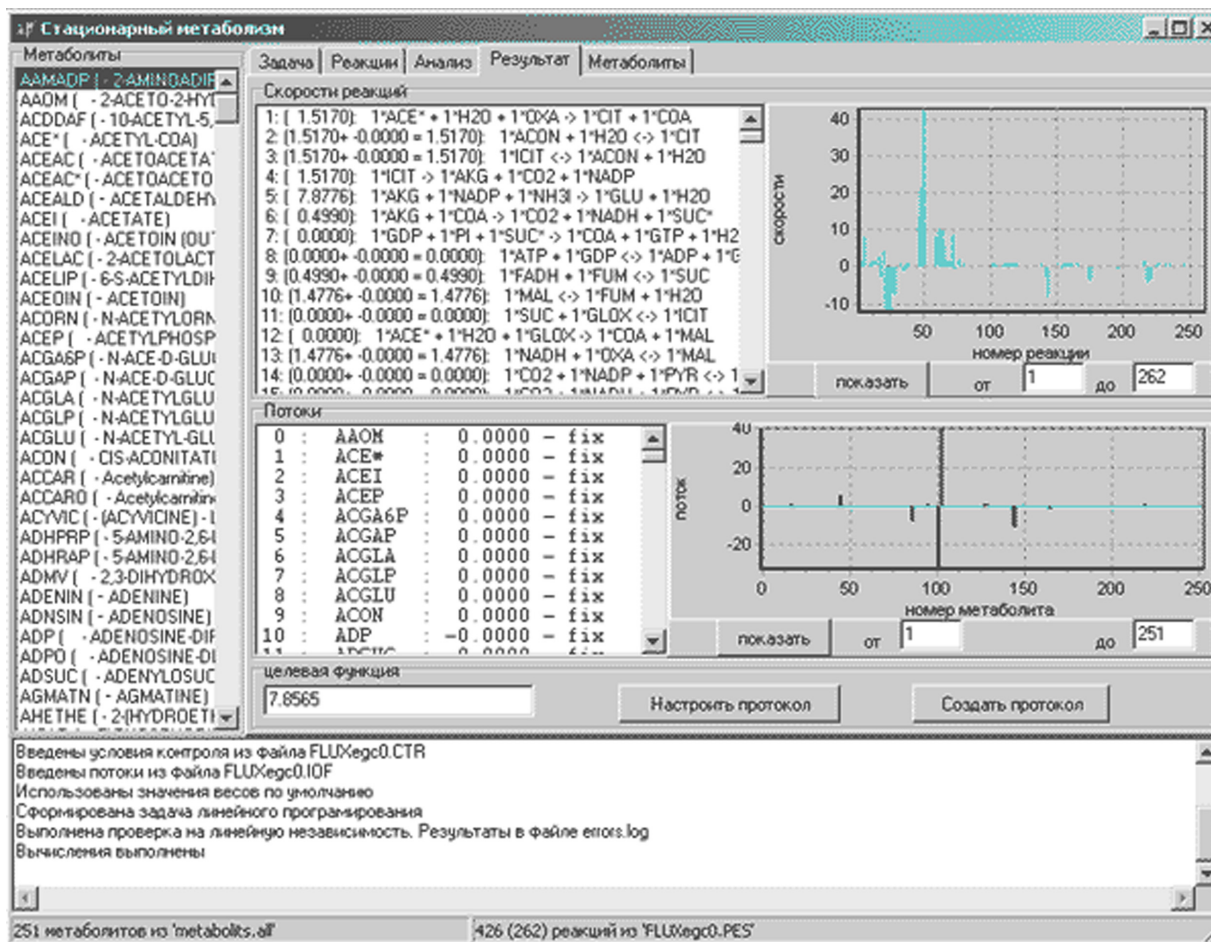


Рис. 2. Представление результатов расчета метаболизма митохондрий дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, растущих на сахаре в анаэробных условиях. Выведены биохимические реакции со значениями рассчитанных скоростей, диаграммы значений скоростей, значений всех потоков системы; в отдельном окошке выведены значения рассчитанных потоков

- список величин фиксированных потоков метаболитов (файл с расширением .IOF);
- список метаболитов, баланс потоков расхода/образования которых не фиксируется (файл с расширением .CTR); в него входят также те метаболиты, сумма величин потоков расхода/образования которых образует целевую функцию;

Для пользователя существуют две возможности формирования метаболической системы — создание новой метаболической системы с использованием интерфейса программы FLUX II и модификация существующей метаболической системы и запоминание ее под новым именем. Программа содержит базу данных, включающую в себя в настоящее время входные данные для построения модели метаболизма, происходящего в клетке кишечной палочки *E. coli*, в митохондриях дрожжей *S. cerevisiae* и во фрагменте метаболического пути окислительного фосфорилирования дрожжевой митохондрии. Встроенная

БД обеспечивает неограниченное накопление входных данных для новых объектов моделирования.

Обсуждение

Создано программное обеспечение FLUX II, осуществляющее на основе метода БСМП построение математической модели метаболизма клетки, находящейся в состоянии стационарного роста (самовоспроизведения), и производящее расчет такого распределения скоростей метаболических реакций клетки, при котором экономический коэффициент для некоторого заданного продукта биосинтеза (в том числе для биомассы клетки) при росте на заданной комбинации субстратов имеет максимальное значение.

С помощью программы FLUX II была построена математическая модель метаболизма митохондрий пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, расту-

щих на сахаре в анаэробных условиях (система 235 ферментативных реакций — приложение № 1). Работа проводилась совместно с лабораторией биологического окисления Института биохимии им. А.Н. Баха РАН. С помощью созданной модели были получены интересные результаты.

Проведенный расчет распределения метаболических скоростей в модели показал, что в этих условиях цикл Кребса в митохондриях не работает (скорости реакций, входящих в цикл лимонной кислоты, оказались равными 0). Нулевые скорости имеют также более половины реакций (138 из 234), и самовоспроизведение митохондрий (стационарный рост) обеспечивается за счет транспорта из цитоплазмы клетки дрожжей белков, всех аминокислот, GDP, CDP, ионов Fe_2O , протопорфирина 9 и АТР.

Расчет показывает, что для обеспечения необходимой скорости транспорта всех этих веществ через мембрану и протекания внутримитохондриальных метаболических реакций требуется, чтобы одна аденин-нуклеотидтранслоказа митохондрий, осуществляющая в аэробных условиях реакцию:

$$> ADP_0 + PO_4 + 2Hm + ATP = ATP_0 + ADP + Pi + 2H,$$

(в результате которой АТР транспортируется из митохондрии в цитоплазму дрожжевой клетки, а ADP_0 , наоборот, из цитоплазмы в митохондрию), работала в обратном направлении (то есть осуществляла перенос АТР в митохондрии) со скоростью не менее 1,034 ммоль АТР на грамм сухой биомассы митохондрий в час при росте клеток дрожжей с удельной скоростью 1,5 час⁻¹. При этом другая нуклеотидтранслоказа, осуществляющая в аэробных условиях реакцию:

$$> PP_0 + PO_4 + 2Hm + ATP = ATP_0 + PP + Pi + 2H$$

должна работать в том же направлении, как в аэробных условиях, со скоростью 0,192 ммоль/час, обеспечивая митохондрию пирогосфатом из цитоплазмы и вынужденно выбрасывая из митохондрии АТР, доставленный туда первой транслоказой (возвращается $\approx 20\%$ АТР).

При таком распределении скоростей реакций в метаболической сети (рис. 3) достигается стационар по всем промежуточным метаболитам (Pi , PP , ADP , АТР, АК_i, и т.д.), по рН и по мембранному потенциалу митохондрии.

Проведенные расчеты в основном (качественно) соответствуют тому, что наблюдается в эксперименте. Если бы было известно реальное распределение скоростей реакций в исследуемой клетке, то можно было бы более детально оптимизировать метаболическую систему. Реальное распределение скоростей в заданной

метаболической системе можно получить, решив систему уравнений полной модели, распределение разности скоростей между оптимальным распределением и реальным даст дифференциальный спектр скоростей. Детальное изучение дифференциального спектра скоростей позволило бы обнаружить реакции (ферменты), ответственные за неэкономное использование источника энергии АТР₀, выявить узкие места изучаемой метаболической системы. Полученная при анализе дифференциального спектра скоростей информация могла бы быть использована для проведения модификации генома митохондрий *Saccharomyces cerevisiae* современными генно-инженерными методами для получения регуляторных мутантов с более высоким экономическим коэффициентом использования АТР при анаэробном росте.

К сожалению, в настоящее время в мировой литературе ни для каких живых клеток нельзя найти набор экспериментальных данных, необходимых для построения полной модели метаболизма и расчета реально существующего в клетке распределения скоростей метаболических реакций.

В рассмотренном примере решения оптимизационной задачи — нахождения минимально возможного расхода АТР на синтез суммарной биомассы митохондрии, мы имели дело с простейшим случаем задания целевой функции. Целевой функцией в этом случае был просто поток АТР из цитоплазмы дрожжевой клетки в митохондрию. При этом было неважно, в каких единицах мы определяем экономический коэффициент, в граммах биомассы на 1 ммоль субстрата или в граммах биомассы на 1 г субстрата.

Предусмотренная в программе FLUX II возможность построения целевой функции как суммы потоков нескольких заданных субстратов, каждый из которых вводится со своим весовым коэффициентом, позволяет решать более сложные задачи. Например, можно решать задачу оптимизации распределения скоростей в метаболической системе в случае, когда клетка потребляет из среды не один, а несколько различных субстратов роста. В этом случае, в зависимости от того, в каких единицах мы будем измерять экономический коэффициент (в г/ммоль или г/г), будут определены не один, а два оптимальных режима в метаболической системе.

Первый режим, при котором на образование грамма продукта потребляется наименьшее количество ммоль субстратов, будет получен, если минимизировать суммарное число молекул во входных потоках заданных субстратов. Целевая функция при этом должна быть определена как сумма потоков с весами, равными 1.

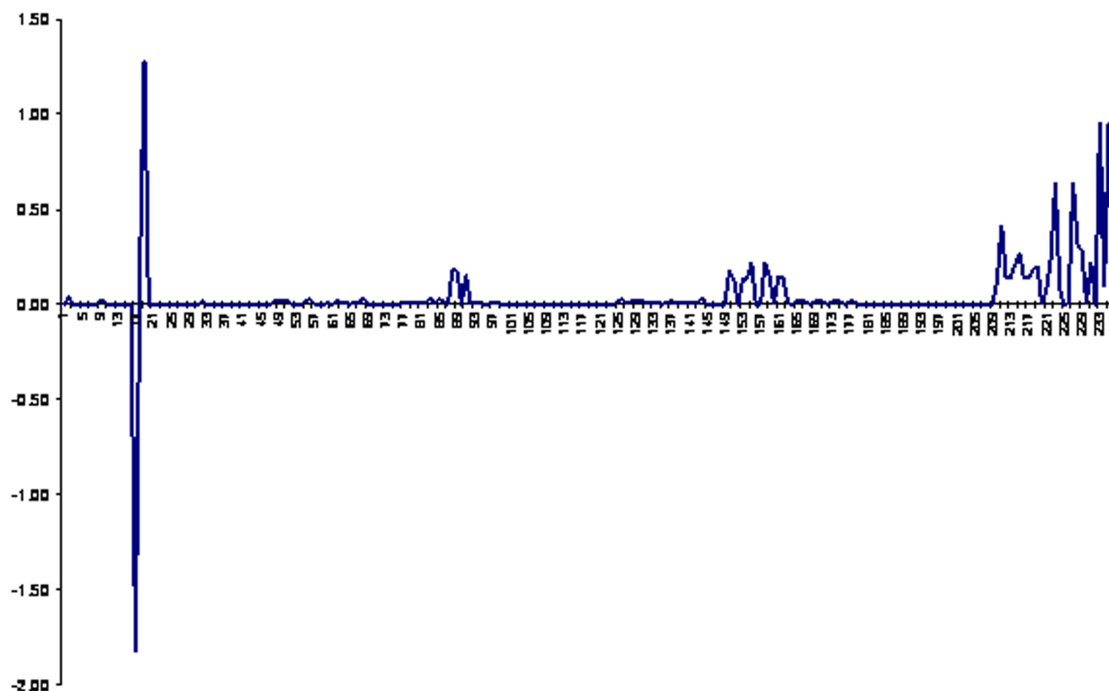


Рис. 3. Распределение скоростей реакций в метаболической системе митохондрии дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, растущих на сахаре в анаэробных условиях, обеспечивающее максимально возможный экономический коэффициент образования биомассы. По оси абсцисс отложены номера реакций (см. приложение № 1), по оси ординат — значения скоростей (в ммоль на 1 г сухой массы клетки в час)

Второй режим, при котором на образование одного грамма продукта потребляется наименьшая суммарная масса субстратов (г), будет получен, если минимизировать суммарную массу входных потоков заданных субстратов. Целевая функция при этом должна быть определена как сумма потоков с массами, равными молекулярным массам заданных субстратов.

Программа FLUX II позволяет решать оптимизационные задачи, связанные с нахождением решений (распределений скоростей) как минимизирующих, так и максимизирующих заданную целевую функцию. Это открывает возможность решать задачу нахождения наиболее экономичного режима путем задания в целевой функции не входных потоков субстратов, а выходных потоков продуктов и искать режимы, максимизирующие целевую функцию.

Работа была поддержана грантом Министерства образования и науки РФ по приоритетному направлению «Развитие новых направлений биотехнологии и обеспечение биобезопасности», госконтракт № 01.106.11.0019, и частично грантами РФФИ № 06-07-89274 и № 07-07-00313.

Литература

1. *Holzhuetter H.-G.* The principle of flux minimization and its application to estimate stationary fluxes in metabolic networks // *Eur. J. Biochem.* — 2004. — Vol. 271. — P. 2905–2922.
2. *Papoutsakis E.T.* Equations and calculations for fermentations of butyric acid bacteria // *Biotechnology and Bioengineering.* — 1984. — Vol. 26. — P. 174–187.
3. *Desai R.P., Nielsen L.K., Papoutsakis E.T.* Stoichiometric modeling of *Clostridium acetobutylicum* fermentations with non-linear constraints // *J. of Biotechnology.* — 1999. — Vol. 71. — P. 191–205.
4. *Watson M.R.* A discrete model of bacterial metabolism // *CABIOS.* — 1986. — Vol. 2(1). — P. 23–27.
5. *Fell D., Small J.R.* Fat synthesis in adipose tissue // *Biochem. J.* — 1986. — Vol. 238. — P. 781–786.
6. *Drozdov-Tikhomirov L.N., Scurida G.I., Serganova V.V.* Inner metabolic fluxes in multienzyme systems: Lysine synthesis on acetate by *Corynebacterium glutamicum* // *Biotechnologia (Moscow).* — 1986. — Vol. 2(8). — P. 28–37.
7. *Drozdov-Tikhomirov L.N., Scurida G.I., Serganova V.V.* Flux stoichiometric models of cell metabolism / Reports of International Conference «Modeling and Computer Methods

- in Molecular Biology and Genetics». — N.Y.: Nova Science Publisher. — 1992. — P. 329–334.
8. Drozdov-Tikhomirov L.N., Scurida G.I., Davidov A.V., Alexandrov A.A., Zvyagil'skaya R.A. Mathematical modeling of living cell metabolism using the method of steady-state stoichiometric flux balance // J. of Bioinformatics and Computational Biology. — 2006. — Vol. 4(4). — P. 865–885.
 9. Назипова Н.Н., Елькин Ю.Е., Панюков В.В., Дроздов-Тихомиров Л.Н. Расчет скоростей метаболических реакций в живой растущей клетке методом баланса стационарных метаболических потоков (метод БСМП) // Математическая биология и биоинформатика (электронный журнал). — 2007. — Т. 2. — № 1. — С. 98–119. [http://www.matbio.org/downloads/Nazipova2007\(2_98\).pdf](http://www.matbio.org/downloads/Nazipova2007(2_98).pdf)
 10. Schuster R. & Schuster S. Refined algorithm and computer program for calculating all non-negative fluxes admissible in steady states of biochemical reaction systems with or without some flux rates fixed // Comput. Appl. Biosci. — 1993. — Vol. 9. — P. 79–85.
 11. Savinell J.M., Palsson B.O. Network analysis of intermediary metabolism using linear optimization. I. Development of mathematical formalism // J. Theor. Biol. — 1992. — Vol. 154(4). — P. 421–454.
 12. Varma A. & Palsson B. Metabolic capabilities of *Escherichia coli*. II. Optimal growth patterns // J. Theor. Biol. — 1993. — Vol. 165. — P. 503–522.
 13. Varma A., Palsson B.O. Metabolic flux balancing: basic concepts, scientific and practical use // Bio/Technology. — 1994. — Vol. 12. — P. 994–998.
 14. Edwards J.S., Ramakrishna R., Schilling C.H., Palsson B.O. Metabolic flux balance analysis / In: Metabolic engineering. S.Y. Lee and E.T. Papoutsakis (ed.). — N.Y.: Marcel Dekker, 1999. — P. 13–57.
 15. Edwards J.S., Covert M., Palsson B.O. Metabolic modelling of microbes: the flux-balance approach // Environ. Microbiol. — 2002. — Vol. 4. — P. 133–140.
 16. Foster J., Famili I., Fu P.C., Palsson B.O. and Nielsen I. Genome-scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network // Genome Res. — 2003. — Vol. 13. — P. 244–253.
 17. Forster J., Famili I., Palsson B.O., Nielsen J. Large-scale evaluation of in silico gene deletions in *Saccharomyces cerevisiae* // OMICS. — 2003. — Vol. 7(2). — P. 193–202.
 18. Famili I., Forster J., Nielsen J., Palsson B.O. *Saccharomyces cerevisiae* phenotypes can be predicted by using constraint-based analysis of a genome-scale reconstructed metabolic network // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2003. — Vol. 100(23). — P. 13134–13139.
 19. Fong S.S., Marciniak J.Y., Palsson B.O. Description and interpretation of adaptive evolution of *Escherichia coli* K-12 MG1655 by using a genome-scale in silico metabolic model // J. Bacteriol. — 2003. — Vol. 185(21). — P. 6400–6408.
 20. Ibarra R.U., Fu P., Palsson B.O., DiTonno J.R., Edwards J.S. Quantitative analysis of *Escherichia coli* metabolic phenotypes within the context of phenotypic phase planes // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. — 2003. — Vol. 6(2). — P. 101–108.
 21. Allen T.E., Herrgard M.J., Liu M., Qiu Y., Glasner J.D., Blattner F.R., Palsson B.O. Genome-scale analysis of the uses of the *Escherichia coli* genome: model-driven analysis of heterogeneous data sets // J. Bacteriol. — 2003. — Vol. 185(21). — P. 6392–6399.
 22. Duarte N.C., Herrgard M.J., Palsson B.O. Reconstruction and validation of *Saccharomyces* iND750, a fully compartmentalized genome-scale metabolic model // Genome Res. — 2004. — Vol. 14(7). — P. 1298–1309.
 23. Duarte N.C., Palsson B.O., Fu P. Integrated analysis of metabolic phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae* // BMC Genomics. — 2004. — Vol. 5(1). — P. 63.
 24. Reed J.L., Palsson B.O. Genome-scale in silico models of *E. coli* have multiple equivalent phenotypic states: assessment of correlated reaction subsets that comprise network states // Genome Res. — 2004. — Vol. 14(9). — P. 1797–1805.
 25. Covert M.W., Knight E.M., Reed J.L., Herrgard M.J., Palsson B.O. Integrating high-throughput and computational data elucidates bacterial networks // Nature. — 2004. — Vol. 429(6987). — P. 92–96.
 26. Wiback S.J., Mahadevan R., Palsson B.O. Using metabolic flux data to further constrain the metabolic solution space and predict internal flux patterns: the *Escherichia coli* spectrum // Biotechnol. Bioeng. — 2004. — Vol. 86(3). — P. 317–331.
 27. Reed J.L., Vo T.D., Schilling C.H., Palsson B.O. An expanded genome-scale model of *Escherichia coli* K-12 (iJR904 GSM/GPR) // Genome Biol. — 2004. — Vol. 4(9). — R54.
 28. Famili I., Palsson B.O. Systemic metabolic reactions are obtained by singular value decomposition of genome-scale stoichiometric matrices // J. Theor. Biol. — 2004. — Vol. 224(1). — P. 87–96.
 29. Fong S.S., Palsson B.O. Metabolic gene-deletion strains of *Escherichia coli* evolve to computationally predicted growth phenotypes // Nat. Genet. — 2004. — Vol. 36(10). — P. 1056–1058.
 30. Fong S.S., Burgard A.P., Herring C.D., Knight E.M., Blattner F.R., Maranas C.D., Palsson B.O. In silico design and adaptive evolution of *Escherichia coli* for production of lactic acid // Biotechnol. Bioeng. — 2005. — Vol. 91(5). — P. 643–648.
 31. Mahadevan R., Palsson B.O. Properties of metabolic networks: structure versus function // Biophys. J. — 2005. — Vol. 88(1). — L07–L09.

32. *Tempest D.W., Neussell O.M.* Growth yield and energy distribution in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* / In: Cellular and Molecular Biology. Ed. F.C. Neidhard. Washington: Am. Soc. for Microbiology, N.W., 1987. – Vol. 1. – P. 797.
33. *Stouthamer A.N.* The search for correlation between theoretical and experimental growth yield // Int. Rev. Biochem. – 1979. – Vol. 21. – P. 1–47.
34. *Перт С. Дж.* Основы культивирования микроорганизмов и клеток. – М.: Мир, 1978. – С. 104.
35. *Васильев Ф.П., Иваницкий А.Ю.* Линейное программирование. – М.: Факториал Пресс, 2003.

Приложение № 1

Список реакций, использованных при расчете модели метаболизма, происходящего в метаболической системе митохондрий пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

1	:	>	$PYRo + Hm + Pi = PYR + H + PO_4$
2	:	>	$PYR + COA + NAD = ACE^* + NADH + H + CO_2$
3	:	>	$ACE^* + OXA + H_2O = CIT + COA + H$
4	:		$CIT = ACON + H_2O$
5	:		$ACON + H_2O = ICIT$
6	:	>	$ICIT + NAD = AKG + NADH + H + CO_2$
7	:	>	$ICIT + NADP = AKG + NADPH + H + CO_2$
8	:	>	$AKG + COA + NAD = SUC^* + NADH + H + CO_2$
9	:	>	$SUC^* + ADP + Pi = SUC + ATP + COA$
10	:	>	$SUC + eFAD = FUM + eFADH$
11	:		$FUM + H_2O = MAL$
12	:		$MAL + NAD = OXA + NADH + H$
13	:	>	$PO_4 + Hm = Pi + H$
14	:	>	$ADP + Pi + 2Hm = ATP + H_2O + 2H$
15	:	>	$ATP + H_2O + H = ADP + Pi + Hm$
16	:		$ADP_o + PO_4 + 2Hm + ATP = ADP + Pi + 2H + ATP_o$
17	:	>	$PP_o + PO_4 + 2Hm + ATP = PP + Pi + 2H + ATP_o$
18	:	>	$PP + H_2O = 2Pi$
19	:		$NADH + H + FP = FPH_2 + NAD$
20	:		$Q + FPH_2 + 4H = QH_2 + FP + 4Hm$
21	:	>	$LACTdo + CITc = PYRo + CITr$
22	:	>	$LACTlo + CITc = PYRo + CITr$
23	:	>	$QH_2 + 2H + CITc = Q + 2Hm + CITr$
24	:	>	$2CITr + O_2 + 8H = 2CITc + 4Hm + 2H_2O$
25	:	>	$NADHo + Ho + FP1 = FP1H_2 + NADo$
26	:	>	$NADPHo + Ho + FP1 = FP1H_2 + NADPo$
27	:	>	$Q + FP1H_2 = QH_2 + FP1$
28	:	>	$Q + eFADH + H = QH_2 + eFAD$

29	:	>	$GL3Po + FP2 + H = G3Po + FP2H_2 + Hm$
30	:		$Q + FP2H_2 = QH_2 + FP2$
31	:	>	$NADH + ATP = NADPH + ADP$
32	:	>	$ACE^* + AKG + H_2O = HCIT$
33	:		$HCIT = HACON + H_2O$
34	:		$HACON = HICIT$
35	:		$HICIT + NAD = OXAD + NADH + H$
36	:	>	$OXAD + COA + NAD = GLUCOA + NADH + H$
37	:	>	$GLUCOA + NAD + eFAD = ACE^* + NADH + eFADH + 2H$
38	:	>	$ACE^* + GLU = ACEGLU + COA$
39	:	>	$ACEGLU + ATP = ACGLP + ADP$
40	:	>	$ACGLP + NADPH + H = ACGLA + NADP$
41	:	>	$ACORN + GLU = ORN + ACEGLU$
42	:	>	$AKGo + Pi + Hm = AKG + PO_4 + H$
43	:	>	$MALo + Pi + Hm = MAL + PO_4 + H$
44	:	>	$CITo + MAL + Pi + Hm = MALo + CIT + PO_4 + H$
45	:	>	$MAL + KMV_o + Pi + Hm = KMV + MALo + PO_4 + H$
46	:	>	$MAL + KIC_o + Pi + Hm = MALo + KIC + PO_4 + H$
47	:	>	$2PYR = ACELAC + CO_2$
48	:	>	$ACELAC + NADPH + H = DIV + NADP$
49	:	>	$DIV = KIV + H_2O$
50	:		$KIV + GLU = AKG + VAL$
51	:	>	$GLU_o + ASP + Pi + Hm = GLU + ASP_o + PO_4 + H$
52	:	>	$GDP_o + GTP + Pi + Hm = GDP + GTP_o + PO_4 + H$
53	:	>	$ARG_o + ORN + Pi + Hm = ARG + ORN_o + PO_4 + H$
54	:	>	$ARG_o + Hm = ARG + H$
55	:	>	$ALA_o + Hm = ALA + H$
56	:	>	$HIS_o + ORN + Hm + Pi = HIS + ORN_o + PO_4 + H$
57	:	>	$LYS_o + ORN + Hm + Pi = LYS + ORN_o + PO_4 + H$
58	:	>	$SAM_o + SAHCYS + Hm = SAM + SAHCSo + H$
59	:	>	$PHE_o + Hm = PHE + H$
60	:	>	$PRO_o + GLU + Hm + Pi = PRO + GLU_o + PO_4 + H$
61	:	>	$LYS_o + Hm = LYS + H$
62	:	>	$SER_o + Hm = SER + H$
63	:	>	$THRo + Hm = THR + H$
64	:	>	$TRPo + Hm = TRP + H$
65	:	>	$TYRo + Hm = TYR + H$
66	:	>	$VAL_o + Hm = VAL + H$
67	:	>	$GLU_o + Hm = GLU + H$
68	:	>	$ACCAR_o + CARN + Hm = ACCAR + CARN_o + H$
69	:	>	$CARN_o + Hm = CARN + H$
70	:	>	$RIBFL_o + Hm = RIBOFL + H$

71	:	>	RIBOFL + ATP = FMN + ADP
72	:	>	FMN + ATP = FAD + PP
73	:	>	COAo + Hm = COA + H
74	:	>	FORMo + Hm = FORM + H
75	:	>	FAD + ATP + H ₂ O = FADo + ADP + Pi
76	:	>	METo + Hm = MET + H
77	:	>	ASPo + Hm = ASP + H
78	:	>	GLNo + Hm = GLN + H
79	:	>	ASNo + Hm = ASN + H
80	:	>	CYSo + Hm = CYS + H
81	:	>	PROo + Hm = PRO + H
82	:	>	GLYo + Hm = GLY + H
83	:	>	HISo + Hm = HIS + H
84	:	>	LEUo + Hm = LEU + H
85	:	>	ILEo + Hm = ILE + H
86	:	>	PRPORo + Hm = PRPOR + H
87	:	>	PHSERo + Hm = PHSERm + H
88	:	>	PHSERm = PEAm + CO ₂
89	:	>	PEAm + ATP + H ₂ O = PEAo + ADP + Pi
90	:	>	PHCHo + Hm = PHCHm + H
91	:	>	PGPo + Hm = PGPm + H
92	:	>	PGPm = PHLGLm + CO ₂
93	:	>	CDPDGo + Hm = CDPDGm + H
94	:	>	PHLGLm + CDPDGm = CARDm + CMP
95	:		CMP + ATP = CDP + ADP
96	:	>	PHAo + Hm = PHAm + H
97	:	>	PHLNo + Hm = PHLNm + H
98	:	>	ACE* + GLU = ACEGLU + COA
99	:	>	ACEGLU + ATP = ACGLP + ADP
100	:	>	ACGLP + NADPH + H = ACGLA + NADP
101	:	>	ACGLA + GLU = AKG + ACORN
102	:	>	ACORN + GLU = ORN + ACEGLU
103	:	>	AKG + OXADo + Hm = AKGo + OXAD + H
104	:	>	OXAD + COA + NAD = GLUCOA + NADH + H
105	:	>	GLUCOA + NAD + eFAD = ACE* + NADH + H + eFADH ₂
106	:	>	KMVo + Hm = KMV + H
107	:		KMV + GLU = ILE + AKG
108	:		KIC + GLU = LEU + AKG
109	:		PRO + FAD = PYRL + FADH ₂
110	:	>	PYRL + NAD + 2H ₂ O = GLU + NADH + H
111	:	>	THFo + MAL + Pi + Hm = THF + MALo + PO ₄ + H
112	:		SER + THF = GLY + H ₂ O + MTTHF
113	:	>	GLY + NAD + THF = MTTHF + NADH + H + CO ₂ + NH ₃

114	:	>	NH ₃ + 1/2ATP + 1/2H ₂ O = NH _{3o} + 1/2ADP + 1/2Pi
115	:	>	MTTHF + H ₂ O = FTHF
116	:	>	FTHF + ADP + Pi = THF + FORM + ATP
117	:	>	GLY + SUC* = AML + CO ₂ + COA
118	:	>	AML + MALo + Pi + Hm = AMLo + MAL + PO ₄ + H
119	:	>	PRPGo + Hm = PRPG + H
120	:	>	PRPG + O ₂ = PRPOR + 2H ₂ O
121	:	>	PRPOR + Fe ₂ = PRHEM + 2H
122	:	>	PRHEM = PRHEM1
123	:	>	PRHEM + ATP + H ₂ O = PRHEMo + ADP + Pi
124	:	>	ARG + 2GTP + ATP = ARGp1 + 2GDP + 2Pi + AMP + PP
125	:	>	ALA + 2GTP + ATP = ALAp1 + 2GDP + 2Pi + AMP + PP
126	:	>	HIS + 2GTP + ATP = HISp1 + 2GDP + 2Pi + AMP + PP
127	:	>	LYS + 2GTP + ATP = LYSp1 + 2GDP + 2Pi + AMP + PP
128	:	>	ILE + 2GTP + ATP = ILEp1 + 2GDP + 2Pi + AMP + PP
129	:	>	LEU + 2GTP + ATP = LEUp1 + 2GDP + 2Pi + AMP + PP
130	:	>	PHE + 2GTP + ATP = PHEp1 + 2GDP + 2Pi + AMP + PP
131	:	>	PRO + 2GTP + ATP = PROp1 + 2GDP + 2Pi + AMP + PP
132	:	>	SER + 2GTP + ATP = SERp1 + 2GDP + 2Pi + AMP + PP
133	:	>	THR + 2GTP + ATP = THRp1 + 2GDP + 2Pi + AMP + PP
134	:	>	TRP + 2GTP + ATP = TRPp1 + 2GDP + 2Pi + AMP + PP
135	:	>	TYR + 2GTP + ATP = TYRp1 + 2GDP + 2Pi + AMP + PP
136	:	>	VAL + 2GTP + ATP = VALp1 + 2GDP + 2Pi + AMP + PP
137	:	>	MET + 2GTP + ATP = METp1 + 2GDP + 2Pi + AMP + PP
138	:	>	ASN + 2GTP + ATP = ASNP1 + 2GDP + 2Pi + AMP + PP
139	:	>	GLN + 2GTP + ATP = GLNP1 + 2GDP + 2Pi + AMP + PP
140	:	>	CYS + 2GTP + ATP = CYSp1 + 2GDP + 2Pi + AMP + PP
141	:	>	GLU + 2GTP + ATP = GLUp1 + 2GDP + 2Pi + AMP + PP
142	:	>	ASP + 2GTP + ATP = ASPP1 + 2GDP + 2Pi + AMP + PP
143	:	>	GLY + 2GTP + ATP = GLYP1 + 2GDP + 2Pi + AMP + PP

144	:	>	$OXAD + AKG_o + P_i + H_m = OXAD_o + AKG + PO_4 + H$	184	:		$A34DHH + SAM = MHHBZ + SAHCYS$
145	:	>	$KIV_o + MAL + P_i + H_m = KIV + MAL_o + PO_4 + H$	185	:	>	$MHHBZ = H6MP + CO_2$
146	:	>	$KIV + ACE^* + H_2O = IPM$	186	:	>	$H6MP + O_2 = H6MBQ$
147	:	>	$IPM_o + MAL + P_i + H_m = IPM + MAL_o + PO_4 + H$	187	:		$H6MBQ + SAM = HMMBQ + SAHCYS$
148	:	>	$ATP + H_2O = AMP + PP$	188	:	>	$HMMBQ + O_2 = HMHMQ$
149	:	>	$ATP = AMPR + PP$	189	:		$HMHMQ + SAM = Q + SAHCYS$
150	:	>	$CDP_o + H_m + P_i + ATP = ATP_o + H + PO_4 + CDP$	190	:	>	$Q + ATP + H_2O = QP1 + ADP + P_i$
151	:	>	$CDP_o + ADP + H_m = ADP_o + CDP + H$	191	:	>	$Q + ATP + H_2O = Q_o + ADP + P_i$
152	:	>	$CDP + ATP = CTP + ADP$	192	:		$ACCAR + COA = CARN + ACE^*$
153	:	>	$CTP = CMPR + PP$	193	:	>	$Fe_2o + H_m = Fe_2 + ADP + H$
154	:	>	$GDP_o + H_m + P_i + ATP = ATP_o + H + PO_4 + GDP$	194	:	>	$2Fe_2 + 2SULF = Fe_2S_2$
155	:	>	$GDP_o + ADP + H_m = ADP_o + GDP + H$	195	:	>	$3Fe_2 + 4SULF = Fe_3S_4$
156	:	>	$GDP + ATP = GTP + ADP$	196	:	>	$4Fe_2 + 4SULF = Fe_4S_4$
157	:	>	$GTP = GMPR + PP$	197	:	>	$Fe_2S_2 = Fe_2S_2P$
158	:	>	$UDP_o + H_m + P_i + ATP = ATP_o + H + PO_4 + UDP$	198	:	>	$Fe_3S_4 = Fe_3S_4P$
159	:	>	$UDP_o + ADP + H_m = ADP_o + UDP + H$	199	:	>	$Fe_4S_4 = Fe_4S_4P$
160	:	>	$UDP + ATP = UTP + ADP$	200	:	>	$Fe_2S_2 + ATP + H_2O = Fe_2S_2o + ADP + P_i$
161	:	>	$UTP = UMPR + PP$	201	:	>	$Fe_3S_4 + ATP + H_2O = Fe_3S_4o + ADP + P_i$
162	:	>	$dADP_o + H_m + P_i + ATP = ATP_o + H + PO_4 + dADP$	202	:	>	$Fe_4S_4 + ATP + H_2O = Fe_4S_4o + ADP + P_i$
163	:	>	$dADP_o + ADP + H_m = ADP_o + dADP + H$	203	:	>	$ACE^* + 7NADH + 7NADPH + 7MALON^* = FA16m + 7NAD + 7NADP + 7H_2O$
164	:	>	$dADP + ATP = dATP + ADP$	204	:	>	$ACE^* + 8NADH + 8NADPH + 8MALON^* = FA18m + 8NAD + 8NADP + 8H_2O$
165	:	>	$dATP = dAMPD + PP$	205	:	>	$ACE^* + 9NADH + 9NADPH + 9MALON^* = FA20m + 9NAD + 9NADP + 9H_2O$
166	:	>	$dCDP_o + H_m + P_i + ATP = ATP_o + H + PO_4 + dCDP$	206	:	>	$FA10o = FA10m$
167	:	>	$dCDP_o + ADP + H_m = ADP_o + dCDP + H$	207	:	>	$FA12o = FA12m$
168	:	>	$dCDP + ATP = dCTP + ADP$	208	:	>	$FA14o = FA14m$
169	:	>	$dCTP = dCMPD + PP$	209	:	>	$ARGP_o + 1/200H_m = ARGp + 1/200H$
170	:	>	$dGDP_o + H_m + P_i + ATP = ATP_o + H + PO_4 + dGDP$	210	:	>	$ALAP_o + 1/200H_m = ALAP + 1/200H$
171	:	>	$dGDP_o + ADP + H_m = ADP_o + dGDP + H$	211	:	>	$HISP_o + 1/200H_m = HISP + 1/200H$
172	:	>	$dGDP + ATP = dGTP + ADP$	212	:	>	$LYSP_o + 1/200H_m = LYSP + 1/200H$
173	:	>	$dGTP = dGMPD + PP$	213	:	>	$ILEP_o + 1/200H_m = ILEP + 1/200H$
174	:	>	$dTDP_o + H_m + P_i + ATP = ATP_o + H + PO_4 + dTDP$	214	:	>	$LEUP_o + 1/200H_m = LEUP + 1/200H$
175	:	>	$dTDP_o + ADP + H_m = ADP_o + dTDP + H$	215	:	>	$PHEP_o + 1/200H_m = PHEP + 1/200H$
176	:	>	$dTDP + ATP = dTTP + ADP$	216	:	>	$PROP_o + 1/200H_m = PROP + 1/200H$
177	:	>	$dTTP = dTMPD + PP$	217	:	>	$SERP_o + 1/200H_m = SERP + 1/200H$
178	:	>	$MICIT_o + MAL + P_i + H_m = MICIT + MAL_o + PO_4 + H$	218	:	>	$THRP_o + 1/200H_m = THRP + 1/200H$
179	:	>	$MICIT = PYR + SUC$	219	:	>	$TRPP_o + 1/200H_m = TRPP + 1/200H$
180	:	>	$MALN^*_o + CARN + H_m = MALON^* + CARN_o + H$	220	:	>	$TYRP_o + 1/200H_m = TYRP + 1/200H$
181	:	>	$PPDP_o + H_m = PPDP + H$	221	:	>	$VALP_o + 1/200H_m = VALP + 1/200H$
182	:	>	$PPDP = P4HBZ + PP$	222	:	>	$METP_o + 1/200H_m = METP + 1/200H$
183	:	>	$P4HBZ + O_2 = A34DHH$	223	:	>	$ASNP_o + 1/200H_m = ASNP + 1/200H$
				224	:	>	$GLNP_o + 1/200H_m = GLNP + 1/200H$
				225	:	>	$CYSP_o + 1/200H_m = CYSP + 1/200H$
				226	:	>	$GLUP_o + 1/200H_m = GLUP + 1/200H$
				227	:	>	$ASPp_o + 1/200H_m = ASPp + 1/200H$

228	:	>	$GLYP_o + 1/200H_m = GLYP + 1/200H$	232	:	>	$GTP_o + H_m + P_i + GDP = GDP_o + H + PO_4 + GTP$
229	:	>	$CMP + ATP + H_2O = CMP_o + ADP + P_i$	233	:		$AMP + GTP = ADP + GDP$
230	:	>	$AMP + ATP = ADP + ADP$	234	:	>	$ADP_o + H_m = ADP + H$
231	:	>	$AMP + ATP + H_2O = AMP_o + ADP + P_i$	235	:		$NAD + ATP = NADP + ADP$

MATHEMATICAL MODELLING OF A METABOLISM OF THE LIVING GROWING CELL BY A METHOD OF STEADY STATE METABOLIC FLUXES BALANCE

N.N. NAZIPOVA¹, V.V. PANJUKOV¹, R.A. ZVYAGILSKAYA²,
L.N. DROZDOV-TIKHOMIROV³

¹ *Institute of Mathematical Problems of Biology RAS, Pushchino;*

² *A.N. Bach Institute of biochemistry RAS,*

³ *Institute of molecular genetics RAS, Moscow*

The software was developed for construction of mathematical model of a stationary metabolism of the growing cell, allowing to count optimum economic coefficients of growth of a biomass and excretion of products of biosynthesis, achievable at ideal regulation of processes, and corresponding these optimum modes of a metabolism distribution of speeds of reactions inside of a cell and in its compartments, including speeds of an exchange of metabolites between compartments. Created program FLUX II worked in Windows environment. The program had the convenient interface, it was provided by the means excluding cycling of algorithm and allowing to make the substantial analysis of the constructed model. The program provided also a representation of results of calculation and the analysis of model in the digital and graphic form. By means of the created program the mathematical model of a mitochondrial metabolism of the yeast growing on sugar in anaerobic conditions was constructed and investigated. The satisfactory consent of results of calculations and the analysis with the data received in experiment was shown. Possible ways of use of the program were discussed at the decision of practical problems of modern biotechnology.

Keywords: mathematical modelling, model of a stationary cellular metabolism, economic factor of biosynthesis, optimizing problems, linear programming.

НОВАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА РЕСТРИКЦИИ AluVI ИЗ *ARTHROBACTER LUTEUS* B – ИЗОШИЗОМЕР AluI, НЕЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ К ПРИСУТСТВИЮ 5-МЕТИЛЦИТОЗИНА В САЙТЕ УЗНАВАНИЯ AGCT

В.А. ЧЕРНУХИН*, А.А. БОЛТЕНГАГЕН, Г.В. ТАРАСОВА, В.С. ДЕДКОВ, С.Х. ДЕГТЯРЕВ

НПО «СибЭнзим», Новосибирск

Описаны свойства новой эндонуклеазы рестрикции, AluVI, узнающей и расщепляющей последовательность AGCT и являющейся изошизомером хорошо известной рестриктазы AluI. Фермент AluVI, в отличие от AluI, расщепляет ДНК в случае, когда цитозинные основания в сайте узнавания метилированы в положении С5. AluVI также расщепляет последовательность узнавания с одним С5-метилированным и другим N4-метилированным цитозинами, однако не расщепляет ДНК при модификации обоих цитозинов в положении N4.

Ключевые слова: эндонуклеаза рестрикции, чувствительность к метилированию.

Эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы, ЭР) являются сайт-специфическими ДНК-эндонуклеазами бактерий и, как правило, входят в состав так называемых систем рестрикции-модификации.

В настоящее время описано более 250 различных сайтов узнавания ЭР второго типа и более 2000 различных изошизомеров рестриктаз, то есть аналогов ранее обнаруженных ферментов, которые, в свою очередь, называются прототипами.

Хотя изошизомеры и прототип имеют одинаковый сайт узнавания, они могут отличаться по способности гидролизовать узнаваемую последовательность ДНК при наличии в ней метилированных оснований. Изошизомеры, отличающиеся по способности гидролизовать модифицированную ДНК, широко применяются при изучении статуса метилирования природных ДНК [1–5, 16]. Однако известно всего несколько примеров таких пар изошизомеров (EcoRII – MvaI [6, 7], HpaII-MspI [8]), используемых в практике исследований.

ЭР AluI из штамма бактерии *Arthrobacter luteus*, узнающая и расщепляющая последовательность AGCT, известна уже более 30 лет [9]. Этот фермент нашел

практическое применение в биотехнологии и молекулярной биологии и стал одной из наиболее используемых эндонуклеаз рестрикции.

Помимо эндонуклеазы рестрикции в систему рестрикции-модификации (РМ-систему) AluI входит ДНК-метилтрансфераза, которая метилирует 5-е положение цитозина в узнаваемой последовательности AGCT [14]. Такая модификация предотвращает гидролиз собственной ДНК *Arthrobacter luteus* эндонуклеазой рестрикции AluI, тогда как чужеродная неметилированная ДНК расщепляется рестриктазой AluI.

В данной работе описаны выделение и свойства новой эндонуклеазы рестрикции AluVI, способной расщеплять как немодифицированную ДНК, так и сайт узнавания AGCT, метилированный по 5-му положению цитозина.

Материалы и методы

В работе использовались реактивы производства «Sigma» (США), Serva (Германия), «ICN» (США) и «Хеликон» (Россия).

Выращивание штамма и выделение фермента. Колонии *Arthrobacter luteus* B выращивали на агаризованной среде ЛБ и затем переносили в колбы, содержащие 300 мл жидкой питательной среды ЛБ, и культивировали на качалках при 30 °С и перемешивании – 150 об/мин. в течение двух суток до достижения стационарной фазы роста. Клетки осаждали в течение 30 минут в роторе JA-

* Автор для переписки:

© 2007 г. Чернухин Валерий Алексеевич

НПО «СибЭнзим»

630117 Новосибирск, ул. Акад. Тимакова, 2/12

Тел./факс: 8-383-333-49-91

E-mail: valera@sibenzyme.ru

6 на центрифуге J2-21 при 5000 об/мин. и температуре 4 °С. Выход биомассы составил 5 г/л среды.

Выделение фермента проводили при 4 °С путем колоночной хроматографии.

37 г замороженной биомассы суспендировали в 100 мл буфера А (10 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 0,1 мМ ЭДТА, 7 мМ β-меркаптоэтанол), содержащего 0,05 М NaCl, 0,3 мг/мл лизоцим, 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторид (PMSF), и инкубировали в течение 1 ч при постоянном перемешивании. Далее клетки разрушали ультразвуком и центрифугировали в течение 30 мин. в роторе JA-20 при 15000 об/мин.

Супернатант пропускали через колонку с фосфоцеллюлозой P-11 («Whatman», Англия) объемом 45 мл, предварительно уравновешенную буфером А, содержащим 0,05 М NaCl; затем белок элюировали линейным градиентом NaCl (0,05 М–0,6 М) в буфере А объемом 500 мл, собирая фракции по 10 мл.

Фракции, содержащие эндонуклеазу, объединяли, диализовали против 20 объемов буфера А и наносили на колонку с 7 мл гепарин-сефарозы («Bio-Rad», США).

Элюцию проводили линейным градиентом NaCl (0,05 М–0,5 М) в буфере А объемом 120 мл, собирая

фракции по 3 мл. Активные фракции объединяли и наносили на колонку с гидроксипатитом объемом 4 мл, предварительно уравновешенную буфером В (0,01 М K₂HPO₄, рН 7,2, 7 мМ β-меркаптоэтанол).

Колонку промывали 10 мл буфера В и проводили элюцию линейным градиентом, собирая фракции объемом по 2 мл. Активные фракции объединяли и диализовали против 20 объемов концентрирующего буфера (50% глицерин, мМ Трис-НСl, рН 7,55, 0,1 мМ ЭДТА, 7 мМ β-меркаптоэтанол, 0,05 М NaCl). Препарат хранили при -20 °С.

Выход фермента составил 2,5 мл препарата с концентрацией 5000 ед./мл.

Препараты ферментов. Для экспериментов использовали эндонуклеазы рестрикции AluI (концентрация 3000 ед./мкл), AluV I (концентрация 3000 ед./мкл), T4 полинуклеотидкиназу и буферные растворы производства НПО «Сибэнзим» (Россия).

Определение чувствительности к метилированию сайта узнавания на синтетических олигонуклеотидных дуплексах. Олигодезоксирибонуклеотиды следующего состава, служившие субстратом для эндонуклеаз Alu I и AluV I, были синтезированы в НПО «Сибэнзим» (Россия).

Alu1: 5'-GGT ATA GGA TGA AGCT TTC GCG GGT TAA GG-3'

Alu2: 5'-CC TTA ACC CGC GAA AGCT TCA TCC TAT TCC-3'

Alu3: 5'-GGT ATA GGA TGA (M6A)GCT TTC GCG GGT TAA GG-3'

Alu4: 5'-CC TTA ACC CGC GAA (M6A)GCT TCA TCC TAT TCC-3'

Alu5: 5'-GGT ATA GGA TGA AG(M5C)T TTC GCG GGT TAA GG-3'

Alu6: 5'-CC TTA ACC CGC GAA AG(M5C)T TCA TCC TAT TCC-3'

Alu7: 5'-GGT ATA GGA TGA AG(M4C)T TTC GCG GGT TAA GG-3'

Alu8: 5'-CC TTA ACC CGC GAA AG(M4C)T TCA TCC TAT TCC-3'

Олигонуклеотиды с четным номером комплементарны олигонуклеотидам с нечетным номером. Все олигонуклеотидные дуплексы имеют одинаковую первичную структуру и отличаются друг от друга наличием или отсутствием метилированного основания в последовательности AGCT (сайт AGCT, узнаваемый AluI и AluVI, подчеркнут).

Приготовление γ-[32P]АТР-меченных олигонуклеотидных дуплексов. Одну из цепей олигонуклеотидного дуплекса модифицировали по 5'-концу с помощью T4-полинуклеотидкиназы и γ-[32P]АТР. После очистки олигонуклеотида от побочных продуктов реакции к нему добавляли комплементарный

немеченный олигонуклеотид и пробирку прогревали 2 минуты при 65 °С с последующим охлаждением до комнатной температуры на рабочем столе.

Гидролиз олигонуклеотидных дуплексов эндонуклеазами Alu I и AluV I. Реакцию гидролиза проводили добавлением 1 мкл препарата фермента AluI или AluVI, содержащего 3 единицы активности, в 20 мкл реакционной смеси, содержащей SE-буфер «Y» (33 мМ Tris ацетат рН 7.9 (при температуре 25 °С), 10 мМ Mg(CH₃COO)₂, 66 мМ KCH₃COO, 1 мМ DTT) и олигонуклеотидный дуплекс в концентрации 66,7 нМ при температура 37 °С в течение 50 минут.

Результаты и обсуждение

Описание штамма. Штамм *Arthrobacter luteus* В был выделен из природных изолятов в ходе поиска продуцентов рестриктаз, как описано ранее [10].

Штамм *Arthrobacter luteus* В характеризуется следующими признаками:

Культурально-морфологические признаки. На среде Лурия – Бертрани он образует белые, гладкие, блестящие, непрозрачные, выпуклые, круглые колонии 4 мм в диаметре. Клетки кокковидные, одиночные, в парах или в коротких цепочках.

Физиолого-биохимические признаки. Таксономическая принадлежность штамма-продуцента рестриктазы AluVI определялась по его морфологическим и биохимическим свойствам, как описано ранее [11]. Клетки бактерии грамположительны. Не способны к анаэробному росту, каталазоположительны, оксидазоотрицательны. Растут при температуре 10–40 °С. Содержание гуанина и цитозина в ДНК штамма, установленное с помощью ранее предложенного метода [12], составляет 73–77%.

На основании анализа морфологических и биохимических свойств штамм идентифицировали как вид бактерии *Arthrobacter luteus* В, а продуцируемую им эндонуклеазу рестрикции назвали AluVI согласно общепринятой номенклатуре [13].

Определение специфичности эндонуклеазы рестрикции AluI. Специфичность фермента определяли по картинам расщепления различных ДНК (рис. 1).

В качестве субстратов для выявления специфичности расщепления использовали ДНК фагов λ и T7. После инкубации в оптимальных условиях (37 °С, SE-буфер «У» – 33 мМ Tris-ацетат, рН 7,9, 10 мМ MgCl₂, 66 мМ калия ацетат, 1 мМ DTT) в течение 60 мин. при концентрации плазмидной ДНК 0,02 мг/мл продукты реакции разделяли путем электрофореза в 1% агарозном геле.

На рисунке 1 представлена электрофореграмма продуктов расщепления ДНК фагов λ и T7 эндонуклеазами рестрикции AluI и AluVI. Видно, что при обработке ДНК фагов λ и T7 эндонуклеазами рестрикции AluI и AluVI образуются фрагменты одинаковой длины. Эти результаты говорят о том, что AluI и AluVI узнают и расщепляют одну и ту же последовательность ДНК.

Определение позиций расщепления ДНК сайт-специфической эндонуклеазой AluVI. Определение позиций расщепления ДНК сайт-специфической эндонуклеазой AluVI осуществляли путем сравнения

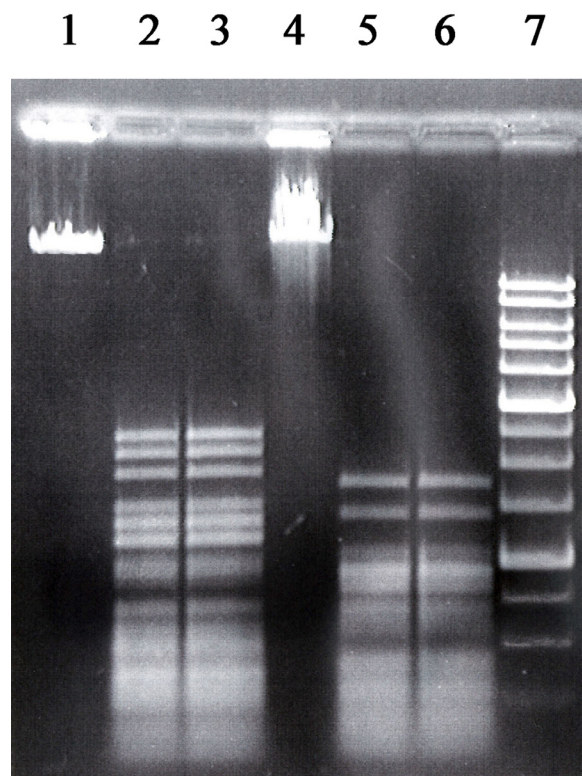


Рис. 1. Гидролиз ДНК фагов лямбда и T7 эндонуклеазами рестрикции AluI и AluVI. Дорожки:

- 1 – ДНК фага λ;
- 2 – ДНК фага λ, ЭР AluI;
- 3 – ДНК фага λ, ЭР AluVI;
- 4 – ДНК фага T7;
- 5 – ДНК фага T7, ЭР AluI;
- 6 – ДНК фага T7, ЭР AluVI;
- 7 – маркер молекулярной массы ДНК 1 кб (производство НПО «СибЭнзим»)

длин фрагментов, образуемых при расщеплении олигонуклеотидных дуплексов Alu1*/Alu2 и Alu2*/Alu1 (меченая цепь помечена символом «*»), имеющих неметилированную последовательность узнавания AGCT, эндонуклеазами рестрикции AluI и AluVI.

В качестве маркера длин фрагментов использовали продукты частичного расщепления этих же дуплексов экзонуклеазой EcoIII. Результаты расщепления данных олигонуклеотидных дуплексов приведены на рисунке 2.

Как видно из рисунка 2, длины фрагментов, образованных при гидролизе олигонуклеотидных дуплексов Alu1*/Alu2 и Alu2*/Alu1 обоими ферментами, одинаковы.

Таким образом, эндонуклеаза рестрикции AluVI расщепляет сайт узнавания в той же позиции, что и AluI, то есть после гуанина.

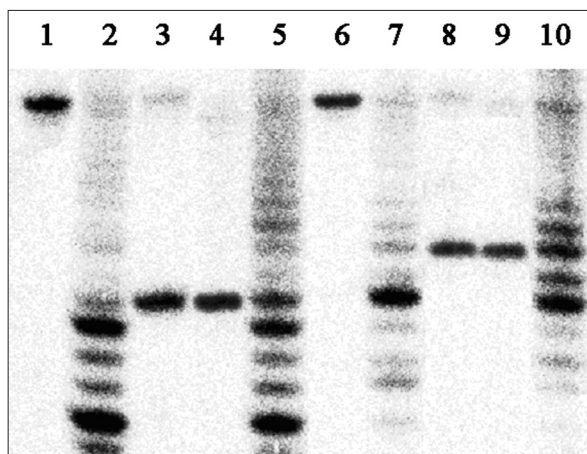


Рис. 2. Определение места расщепления ДНК эндонуклеазой рестрикции AluBI.

Дорожки:

- 1 – дуплекс Alu1*/ Alu2;
- 2, 5 – дуплекс Alu1*/ Alu2, экзонуклеаза III из *E. coli*;
- 3 – дуплекс Alu1*/ Alu2, ЭР AluI;
- 4 – дуплекс Alu1*/ Alu2, ЭР AluBI;
- 6 – дуплекс Alu2*/ Alu1;
- 7, 10 – дуплекс Alu2*/ Alu1, экзонуклеаза III из *E. coli*;
- 8 – дуплекс Alu2*/ Alu1, ЭР AluI;
- 9 – дуплекс Alu2*/ Alu1, ЭР AluBI

Определение и сравнение чувствительности к метилированию сайта узнавания AluI и AluBI.

Результаты расщепления метилированных и неметилированных синтетических олигонуклеотидных дуплексов приведены на рисунках 3–5.

На рисунке 3 приведена электрофореграмма продуктов расщепления ферментами AluI и AluBI олигонуклеотидных дуплексов, содержащих сайт узнавания этих ферментов либо без метилированных оснований, либо только с одним метилированным основанием (полуметилированный сайт). Как видно, AluI и AluBI, расщепляют олигонуклеотидный дуплекс, содержащий неметилированный сайт узнавания (дорожки 2, 3). Однако оба фермента не способны расщеплять ДНК, если в сайте узнавания в комплементарной цепи метилирован аденозин (дорожки 4, 5). При наличии в комплементарной цепи метилированного в 4-е или 5-е положение цитозина, AluBI расщепляет немодифицированную цепь (дорожки 7, 9), тогда как AluI не расщепляет (дорожки 6, 8).

На рисунках 4 и 5 приведены электрофореграммы продуктов расщепления ферментами AluI и AluBI олигонуклеотидных дуплексов, гидролизуемая цепь которых

содержит 5-метилцитозин (рис. 4) или N4-метилцитозин (рис. 5) в сайте узнавания.

Как видно из рисунка 4, AluBI расщепляет цепь с 5-метилцитозином, если комплементарная цепь немодифицирована (дорожка 3) или содержит 5-метилцитозин в сайте узнавания (дорожка 5); при этом AluI такую метилированную ДНК не расщепляет (дорожки 2, 4). Следовательно, AluBI, в отличие от AluI, гидролизует обе цепи ДНК в сайте узнавания при наличии в нем одного или двух 5-метилцитозиновых оснований. Однако цепь с 5-метилцитозином не гидролизуется AluI и AluBI, если комплементарная цепь ДНК содержит в сайте узнавания N6-метиладенин (дорожки 6, 7). И, наконец, AluBI, в отличие от AluI, расщепляет цепь с 5-метилцитозином при наличии N4-метилцитозина в комплементарной цепи (дорожки 8, 9).

Как видно из рисунка 5, AluBI, в отличие от AluI, гидролизует цепь с N4-метилцитозином в сайте узнавания, если комплементарная цепь не модифицирована (дорожки 2 и 3). Однако как AluI, так и AluBI не расщепляют олигонуклеотид, если он содержит два N4-метилцитозина в сайте узнавания (дорожки 4, 5).

Это свидетельствует о том, что AluBI, в отличие от AluI, способен расщеплять ДНК, если узнаваемая последовательность содержит только один N4-метилцитозин. Цепь с N4-метилцитозином также гидролизуется

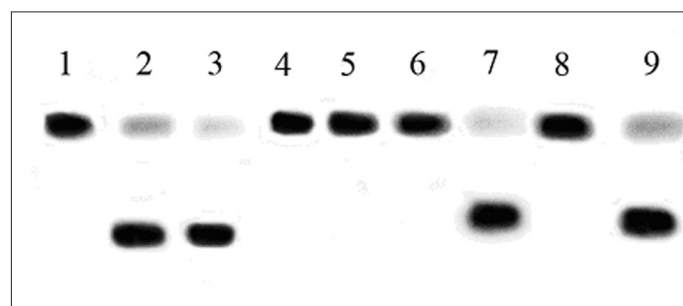


Рис. 3. Определение чувствительности ферментов AluI и AluBI к метилированным основаниям в сайте узнавания

Дорожки:

- 1 – дуплекс Alu1*/ Alu2;
- 2 – дуплекс Alu1*/ Alu2, ЭР AluI;
- 3 – дуплекс Alu1*/ Alu2, ЭР AluBI;
- 4 – дуплекс Alu1*/ Alu4, ЭР AluI;
- 5 – дуплекс Alu1*/ Alu4, ЭР AluBI;
- 6 – дуплекс Alu1*/ Alu6, ЭР AluI;
- 7 – дуплекс Alu1*/ Alu6, ЭР AluBI;
- 8 – дуплекс Alu1*/ Alu8, ЭР AluI;
- 9 – дуплекс Alu1*/ Alu8, ЭР AluBI

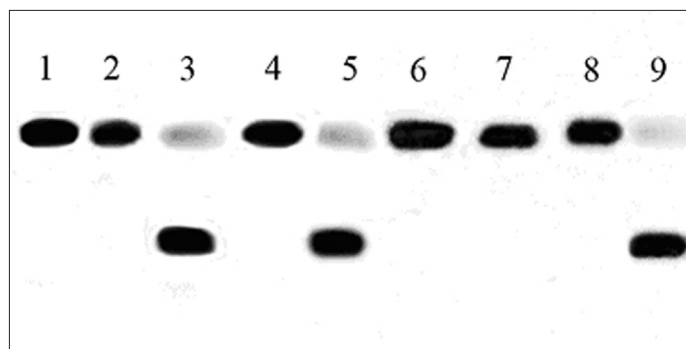


Рис. 4. Определение чувствительности ферментов AluI и AluBI к метилированным основаниям в сайте узнавания

Дорожки:

- 1 – дуплекс Alu5*/ Alu2;
- 2 – дуплекс Alu5*/ Alu2, ЭР AluI;
- 3 – дуплекс Alu5*/ Alu2, ЭР AluBI;
- 4 – дуплекс Alu5*/ Alu6, ЭР AluI;
- 5 – дуплекс Alu5*/ Alu6, ЭР AluBI;
- 6 – дуплекс Alu5*/ Alu4 ЭР AluBI;
- 7 – дуплекс Alu5*/ Alu4, ЭР AluI;
- 8 – дуплекс Alu5*/ Alu8, ЭР AluI;
- 9 – дуплекс Alu5*/Alu8, ЭР AluBI

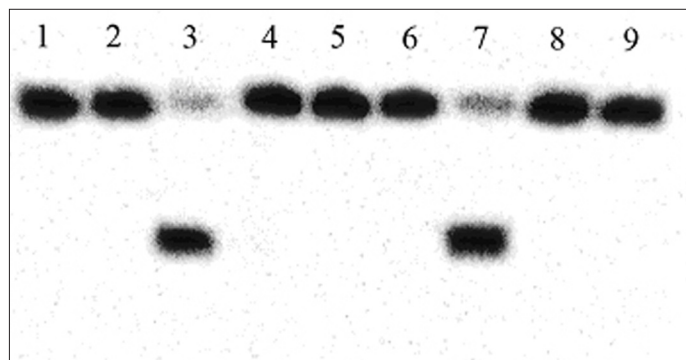


Рис. 5. Определение чувствительности ферментов AluI и AluBI к метилированным основаниям в сайте узнавания

Дорожки:

- 1 – дуплекс Alu7*/ Alu2;
- 2 – дуплекс Alu7*/ Alu2, ЭР AluI;
- 3 – дуплекс Alu7*/ Alu2, ЭР AluBI;
- 4 – дуплекс Alu7*/ Alu8, ЭР AluI;
- 5 – дуплекс Alu7*/ Alu8, ЭР AluBI;
- 6 – дуплекс Alu7*/ Alu6, ЭР AluI;
- 7 – дуплекс Alu7*/ Alu6, ЭР AluBI;
- 8 – дуплекс Alu7*/ Alu4, ЭР AluI;
- 9 – дуплекс Alu7*/ Alu4, ЭР AluBI

ферментом AluBI, но не AluI, если комплементарная цепь узнаваемой последовательности содержит 5-метилцитозин (дорожки 6 и 7). При этом, как и следовало ожидать, олигонуклеотид не расщепляется обоими ферментами, если в состав его сайта узнавания входит N6-метиладенин (дорожки 8 и 9).

Таким образом, в отличие от AluI, ЭР AluBI способна расщеплять ДНК, если в сайте узнавания метилированы один или два цитозина в положении С5 или один цитозин в положении N4.

Возможности использования ЭР AluI и AluBI для определения статуса метилирования хромосомных ДНК и для избирательного гидролиза С5-метилированных ДНК.

Благодаря различной чувствительности ферментов AluI и AluBI к сайтам узнавания, содержащим 5-метилцитозин, эта пара эндонуклеаз рестрикции может использоваться для определения модифицированных оснований в последовательности 5'-AGCT-3' в хромосомных ДНК.

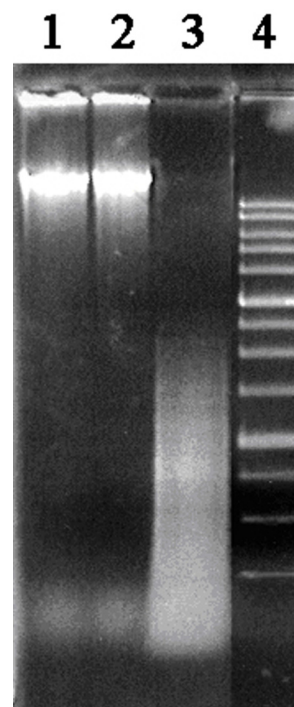


Рис. 6. Расщепление хромосомной ДНК *Arthrobacter luteus* эндонуклеазами рестрикции AluI и AluBI.

Дорожки:

- 1 – хромосомная ДНК *Arthrobacter luteus*;
- 2 – хромосомная ДНК *Arthrobacter luteus*, ЭР AluI;
- 3 – хромосомная ДНК *Arthrobacter luteus*, ЭР AluBI;
- 4 – маркер молекулярной массы ДНК 1 kb (производство НПО «СибЭнзим»)

Известно [14], что хромосомная ДНК штамма *Arthrobacter luteus* — продуцента AluI — содержит 5-метилцитозин в сайте 5'-AGCT-3'.

В соответствии с описанными выше свойствами ферментов AluI и AluVI, хромосомная ДНК *Arthrobacter luteus* — продуцента AluI — не гидролизуется рестриктазой AluI, но эффективно расщепляется рестриктазой AluVI (рис. 6).

Анализ статуса метилирования ДНК с помощью пары AluI и AluVI возможен также и для эукариотических геномов. Для некоторых из них показано образование 5-метилцитозина в результате метилирования последовательностей ДНК CNG [15] и СТ [16].

В этом случае при перекрытии этих сайтов метилирования с последовательностью AGCT AluVI будет расщеплять модифицированную последовательность узнавания, тогда как AluI — нет.

Патент по данной работе находится в стадии оформления.

Литература

1. McClelland M. The effect of sequence specific DNA methylation on restriction endonuclease cleavage // *Nucleic Acids Res.* — 1981. — Vol. 9 — P. 5859–5866.
2. McClelland M. and Nelson M. The effect of site specific methylation on restriction endonuclease digestion // *Nucleic Acids Res.* — 1985. — Vol.13 (Suppl.). — P. 201–207.
3. McClelland M. et al. Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases // *Nucleic Acids Res.* — 1994. — Vol. 22. — P. 3640–3659.
4. Cooper D.N., Taggart M.H., Buildings K., Bird A.P. Unmethylated domains in vertebrate DNA // *Nucleic Acid Res.* — 1983. — Vol.11. — P. 647–658.
5. Bird A., Taggart M., Frommer M., Miller O.J., Macleod D. A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA // *Cell.* — 1985. — Vol. 40. — P. 91–99.
6. Buryanov Ya.I. et al. Site specificity and chromatographic properties of *E. coli* K12 and EcoRII DNA-cytosine methylases // *FEBS Letters.* — 1978. — Vol. 88. — P. 251–254.
7. Butkus V. et al. Investigation of restriction-modification enzymes from *M. varians* RFL19 with a new type of specificity toward modification of substrate // *Nucleic Acids Res.* — 1985. — Vol.13. — P. 5727–5746.
8. Waalwijk C., Flavell R.A. MspI, an isochizomer of HpaII which cleaves both unmethylated and methylated HpaII sites // *Nucleic Acids Res.* — 1978. — Vol. 5. — P. 3231–3236.
9. Roberts R.J., Myers P.A., Morrison A., Murray K. A specific endonuclease from *Arthrobacter luteus* // *J. Mol. Biol.* — 1976. — Vol. 102. — P. 157–165.
10. Белавин П.А., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Метод определения эндонуклеаз рестрикции в колониях бактерий // *Прикладная биохимия и микробиология.* — 1988. — Т. 24. — № 1. — С. 50–51.
11. *Определитель бактерий Берджи* / Под ред. Дж. Холта и др.: 9-е изд. в 2 томах: Пер. с англ. под ред. акад. РАН Г.А. Заварзина. — М., 1997.
12. Дедков В.С. Определение содержания G+C в ДНК бактерий при помощи эндонуклеаз рестрикции // *Биотехнология.* — 2004. — № 4. — С. 77–82.
13. Smith H.O., Nathans D. A suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes // *J. Mol. Biol.* — 1973. — Vol. 81. — P. 419–423.
14. Zhang B., Tao T., Wilson G.G., Blumenthal R.M. The M.AluI DNA-(cytosine C5)-methyltransferase has an unusually large, partially dispensable, variable region // *Nucleic Acids Res.* — 1993. — Vol. 25. — P. 905–911.
15. Naveh-Many T. and Cedar H. Topographical distribution of 5-methylcytosine in animal and plant DNA // *Mol. Cell. Biol.* — 1982. — Vol. 2. — P. 758–762.
16. Oakeley E.J. and Jost J.-P. Non-symmetrical cytosine methylation in tobacco pollen DNA // *Plant Molecular Biology.* — 1996. — Vol.31. — P. 927–930.

Список сокращений

ЭР — эндонуклеаза рестрикции;

Трис — трис-(оксиметил)-аминометан;

ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота.

**NEW RESTRICTION ENDONUCLEASE AluBI
FROM ARTHROBACTER LUTEUS B – AluI ISOSHIZOMER,
NONSENSITIVE TO PRESENCE OF 5-METHYLCYTOSINE
IN THE RECOGNITION SEQUENCE AGCT**

V.A. CHERNUKHIN*, A.A. BOLTENGAGEN, G.V. TARASOVA,
V.S. DEDKOV, S.Kh. DEGTYAREV

SibEnzyme Ltd., Novosibirsk

A new restriction endonuclease AluBI has been discovered and characterized. AluBI is an isoshizomer of well known restriction endonuclease AluI, which recognizes DNA sequence AGCT. Unlike AluI, enzyme AluBI is able to cleave DNA when recognition sequence contains 5-methylcytosines. AluBI also cleaves recognition sequence with two methylated cytosines, one modified at N4 and other at C5 positions. However, new enzyme doesn't cleave DNA with two N4-methylcytosines in the recognition site.

Keywords: restriction endonuclease, sensitivity to methylation.

САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА *BlsI* УЗНАЕТ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ДНК 5'-G(5mC)N↓GC-3' И РАСЩЕПЛЯЕТ ЕЕ С ОБРАЗОВАНИЕМ 3'-ВЫСТУПАЮЩИХ КОНЦОВ

В.А. ЧЕРНУХИН*, Ю.Э. ТОМИЛОВА, Е.В. ЧМУЖ, О.О. СОКОЛОВА,
В.С. ДЕДКОВ, С.Х. ДЕГТЯРЕВ

НПО «СибЭнзим», Новосибирск

Из природных изолятов выделен бактериальный штамм *Bacillus simplex 23*, продуцент сайт-специфической эндонуклеазы *BlsI*. Этот фермент узнает метилированную последовательность ДНК 5'-G(5mC)N↓GC-3', как и обнаруженная ранее сайт-специфическая эндонуклеаза *BisI* (сайт узнавания 5'-G(5mC)↓NGC-3'), но, в отличие от последней, расщепляет ДНК с образованием однонуклеотидных 3'-выступающих концов. Благодаря своей способности расщеплять только метилированную ДНК фермент *BlsI* может найти практическое применение в генно-инженерных работах, а также для определения статуса метилирования ДНК эукариот.

Ключевые слова: метил-зависимые сайт-специфические ДНК эндонуклеазы, метилирование ДНК.

В настоящее время известны и достаточно изучены только три сайт-специфические эндонуклеазы, которые узнают и расщепляют исключительно метилированную ДНК, не требуют кофакторов помимо ионов Mg^{2+} и, вследствие этого, могут рассматриваться как метил-зависимые сайт-специфические эндонуклеазы ПМ типа [1].

Это — эндонуклеаза рестрикции *DpnI* и ее изошизомеры, которые узнают и расщепляют последовательность нуклеотидов 5'-G(6mA)↓TC-3' [2], и описанные в наших исследованиях сайт-специфические эндонуклеазы *BisI* и *GlaI*, узнающие и расщепляющие нуклеотидные последовательности ДНК 5'-G(5mC)↓NGC-3' [3] и 5'-G(5mC)↓G(5mC)-3' [4, 5], соответственно.

В данной работе описан новый представитель этой группы, фермент *BlsI*, неошизомер обнаруженной недавно эндонуклеазы *BisI* [3]. Фермент узнает нуклеотидную последовательность 5'-G(5mC)N↓GC-3' и расщепляет ее как указано стрелкой с образованием однонуклеотидных 3'-выступающих концов.

Материалы и методы

Выращивание штамма-продуцента. Бактериальный штамм *Bacillus simplex 23* выделен из почвы в результате направленного систематического поиска штаммов-продуцентов сайт-специфических эндонуклеаз, как описано ранее [6]. Культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства штамма изучали с использованием методик [7]. Штамм идентифицировали по определителю [8], а также с помощью анализа первичной последовательности фрагмента 16S рибосомной РНК [9].

Выращивание штамма проводили в ферментере при температуре 30 °С в 20 л питательной среды, содержащей 1% триптона (Organotechnie, Франция), 0,5% дрожжевого экстракта (Organotechnie, Франция), 0,5% NaCl и 0,05% $MgCl_2$, при pH 7,5 с аэрацией 10 л/мин. и перемешиванием 200 об/мин. При достижении культурой поздней логарифмической стадии роста клетки осаждали с помощью центрифугирования при 5000 об/мин. при 4 °С. В результате получили 100 г биомассы, которую хранили при -20 °С.

Выделение фермента. Все процедуры выделения фермента проводили при температуре 4 °С. 40 г сырой биомассы суспендировали в 100 мл буфера А (10 mM Трис-НСl, pH 7,5, 0,1 mM ЭДТА, 7 mM β-меркаптоэтанол), содержащего 0,2 M KCl, 0,3 мг/мл лизоцима и 0,1 mM фенилметилсульфонилфторида (PMSF). Клетки

* Автор для переписки:

© 2007 г. Чернухин Валерий Алексеевич

НПО «СибЭнзим»

630117 Новосибирск, ул. Акад. Тимакова, 2/12

Тел./факс: 8-383-333-49-91

E-mail: valera@sibenzyme.ru

разрушали ультразвуком на дезинтеграторе Soniprep 150 («MSE», Англия) 10 раз по 1 мин. с интервалами по 1 мин. для охлаждения суспензии. Разрушенные клетки осветляли центрифугированием в течение 30 мин. при 12000 об/мин. Препарат фермента получали путем хроматографической очистки супернатанта в три стадии на следующих сорбентах: 30 мл фосфоцеллюлозы P-11 («Whatman», Англия), 5 мл гидроксипатита («Bio-Rad», США), 7 мл гепарин-сефарозы («Bio-Rad», США).

Супернатант пропускали через колонку с фосфоцеллюлозой P-11, предварительно уравновешенную буфером А, содержащим 0,2 М КСl. Колонку промывали 60 мл буфера А с 0,2 М КСl, затем линейным градиентом концентрации КСl (0,2 М – 1,5 М) в буфере А. Фракции, содержащие эндонуклеазу, объединяли и наносили на колонку с гидроксипатитом, предварительно уравновешенную буфером В (10 мМ $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_4\text{O}_7$, рН 7,5, 0,1 мМ ЭДТА, 7 мМ β -меркаптоэтанол, 0,2 М КСl). Колонку промывали 10 мл буфера В, затем проводили элюцию белка линейным градиентом концентрации $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_4\text{O}_7$ (0,01 М – 0,5 М) в буфере В. Активные фракции объединяли, диализовали против 20 объемов буфера А и наносили на колонку с гепарин-сефарозой, уравновешенную буфером А с 0,2 М КСl. Колонку промывали 14 мл буфера А, содержащего 0,2 М КСl. Фермент элюировали линейным градиентом концентрации КСl (0,2 М – 1 М) в буфере А. Активные фракции объединяли и диализовали против концентрирующего буфера (50% глицерин, 10 мМ Tris-HCl, рН 7,5, 0,1 мМ ЭДТА, 7 мМ β -меркаптоэтанол, 0,2 М КСl). Препарат хранили при -20°C .

Выявление активности фермента. В качестве субстрата для определения активности BslI использовали ДНК плазмиды pFsp4HI1 [9]. Эта плазида содержит ген ДНК-метилтрансферазы Fsp4HI из *Flavobacterium* sp. 4H, которая модифицирует первое цитозиновое основание в последовательности нуклеотидов 5'-GCNGC-3' с образованием 5-метилцитозина. Таким образом, плазида pFsp4HI1 содержит метилированные сайты 5'-G(5mC)NGC-3'.

Как было предварительно установлено, наибольшую активность BslI проявляет в буфере следующего состава: 10 мМ Tris-HCl, рН 8,5, 5 мМ MgCl_2 , 100 мМ NaCl и 1 мМ β -меркаптоэтанол с добавлением БСА (бычий сывороточный альбумин) до конечной концентрации 0,1 мг/мл. Поэтому все эксперименты по расщеплению ДНК ферментом BslI проводили в данном буфере.

Активность сайт-специфической эндонуклеазы BslI в хроматографических профилях определяли, инкубируя аликвоты из фракций с ДНК плазмиды pFsp4HI1. Для этого к 40 мкл реакционной смеси, содержащей 2 мкг ДНК плазмиды pFsp4HI1 в реакционном буфере, добавляли аликвоту 2 мкл из соответствующей фракции хроматографического профиля. Реакционную смесь инкубировали 30 мин. при 30°C . Продукты реакции разделяли в 1% агарозном геле.

За единицу активности (ед) принимали минимальное количество фермента, необходимое для полного расщепления 1 мкг ДНК плазмиды pFsp4HI1 в течение 1 часа при температуре 30°C в 20 мкл реакционной смеси.

Определение сайта узнавания и позиций гидролиза ДНК. Специфичность фермента BslI определяли по картинам специфического расщепления различных ДНК. В качестве субстратов для выявления специфичности расщепления использовали различные ДНК плазмид и фагов, а также синтетические олигонуклеотидные ДНК-дуплексы, содержащие или не содержащие метилированные основания. Сайт узнавания сайт-специфической эндонуклеазы BslI установили путем сравнения картины гидролиза ДНК плазмиды pFsp4HI1 ферментами BslI и BsiI. Расщепление ДНК проводили в оптимальных условиях (30°C , реакционный буфер – 10 мМ Tris-HCl, рН 8,5, 5 мМ MgCl_2 , 100 мМ NaCl, 1 мМ β -меркаптоэтанол, 0,1 мг/мл БСА) в течение 1 часа. Продукты расщепления плазмидной ДНК разделяли гель-электрофорезом в 1,5% агарозе. Определенный таким образом сайт узнавания был подтвержден в экспериментах по расщеплению синтетических олигонуклеотидных дуплексов.

Позиции гидролиза ДНК сайт-специфической эндонуклеазой BslI были установлены путем сравнения длин фрагментов, образующихся при расщеплении [^{32}P]-меченного синтетического олигонуклеотидного дуплекса, содержащего сайт узнавания, эндонуклеазами BslI и BsiI. В качестве маркера длин фрагментов использовали продукты частичного расщепления этого же дуплекса экзонуклеазой III из *E. coli* (ExoIII). Для разделения продуктов гидролиза применяли электрофорез в 20% ПААГ с 7 М мочевиной в трис-боратном буфере.

Результаты и обсуждение

Бактериальный штамм-продуцент фермента BslI был выделен из образца почвы. Штамм имеет следующие характеристики. На среде Лурия – Бертрани штамм образует гладкие, выпуклые, непрозрачные колонии размером 4 мм. Колонии белого цвета. Клетки палочко-

видные, размером $1 \times (3-5)$ мкм, одиночные, в парах или в коротких цепочках. Образуют эллиптические центрально расположенные споры, не раздувающие спорангий. Грамположительны. Не способны к анаэробному росту, каталазоположительны, оксидазоотрицательны. Растут при температуре $10-40$ °С. На основании анализа морфологических и биохимических свойств, а также с помощью анализа первичной последовательности фрагмента 16S рибосомной РНК, штамм идентифицировали как вид бактерии *Bacillus simplex* 23, а продуцируемую им сайт-специфическую эндонуклеазу назвали BslI.

Фермент выделяли из клеточного экстракта путем последовательных хроматографических процедур, как описано в «Материалы и методы». Выход фермента — 200 ед/г сырой биомассы, удельная активность — 1000 ед/мл.

Эндонуклеаза BslI не гидролизует стандартные вирусные и плазмидные ДНК, используемые для нахождения и определения активности эндонуклеаз рестрикции, такие как ДНК фагов λ и Т7, аденовируса-2, плазмид рUC19 и рBR322. В экспериментах по расщеплению ДНК были протестированы также плазмиды, содержащие гены некоторых бактериальных метилаз, модифицирующих цитозиновые основания в ДНК: M.Fsp4HI метилирует ДНК с образованием последовательности 5'-G(5mC)NGC-3' [10], M.HspAI модифицирует ДНК с образованием последовательности 5'-G(5mC)GC-3' [5], M.FauIA и M.FauIB метилируют ДНК с образованием последовательностей 5'-C(5mC)CGC-3' и 5'-G(5mC)GGG-3', соответственно [11].

Результаты показали, что фермент BslI специфически расщепляет только ДНК плазмиды рFsp4HI1, которая метилирована по сайтам 5'-GCNGC-3', благодаря содержащемуся в ней гену метилазы Fsp4HI, тогда как в случае остальных плазмид гидролиз ДНК не происходит. Следовательно, полученные данные указывают на то, что фермент BslI обладает специфичностью к определенной последовательности ДНК, содержащей 5-метилцитозиновые основания.

На рисунке 1 представлены результаты расщепления ДНК плазмид рUC19 и рFsp4HI1 сайт-специфической эндонуклеазой BslI. Исходная плаزمида рUC19 не содержит метилированных цитозиновых оснований в последовательности 5'-GCNGC-3' и, как видно из электрофореграммы, она не расщепляется эндонуклеазой BslI. Плазмида рFsp4HI1 включает в себя ген ДНК-метилтрансферазы M.Fsp4HI, которая метилирует первое цитозиновое основание в последовательности 5'-GCNGC-3'. Эта плазмида содержит только метилированные последовательности 5'-G(5mC)NGC-3' и,

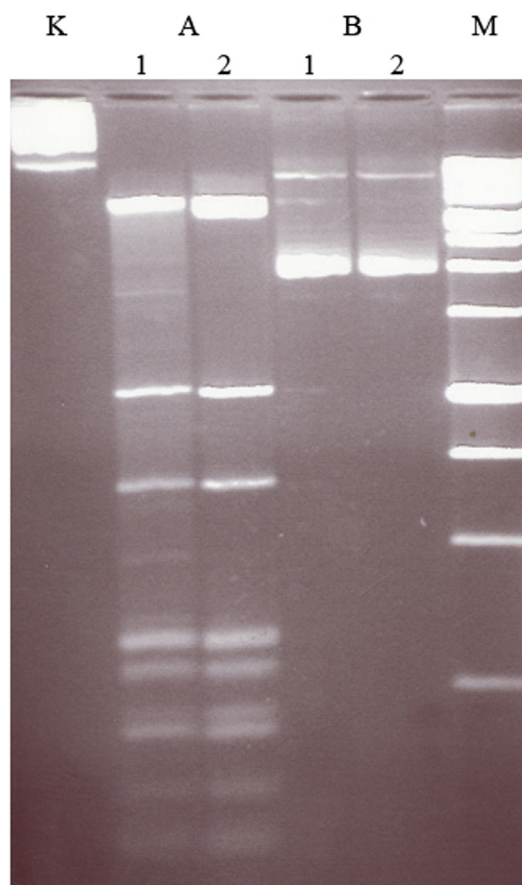


Рис. 1. Расщепление ДНК плазмид рFsp4HI1 (А) и рUC19 (В) эндонуклеазами BslI (дорожка 1) и BspI (дорожка 2). Электрофорез в 1,5% агарозном геле. К — ДНК рFsp4HI1, М — маркер молекулярной массы 1 Кб (НПО «СибЭнзим») со следующими длинами фрагментов ДНК (т.п.н.): 10; 8; 6; 5; 4; 3x2; 2,5; 2; 1,5; 1x3; 0,75; 0,5x2; 0,25

как видно из рисунка, расщепляется ферментом BslI, а образовавшиеся в результате гидролиза фрагменты ДНК идентичны фрагментам, получаемым при расщеплении той же плазмиды ферментом BspI. Полученные данные доказывают, что сайт-специфическая эндонуклеаза BslI расщепляет только метилированную ДНК, причем узнаваемая последовательность нуклеотидов совпадает с таковой для фермента BspI. Таким образом, сайтом узнавания сайт-специфической эндонуклеазы BslI является метилированная последовательность 5'-G(5mC)NGC-3'.

Для подтверждения этих данных и определения места гидролиза ДНК были проведены эксперименты по расщеплению синтетических олигонуклеотидных дуплексов, содержащих метилированный или неметилированный сайт узнавания (последовательность 5'-GCNGC-3' подчеркнута):

NN01: 5' GCTTGTACTTTTAGCGGGCATTGATTCTCACCACG 3'
 NN02: 5' CGTGGTGAGAATCAATGCCGCTAAAGTACAAGC 3'
 NN1: 5' GCTTGTACTTTTAG(5mC)GGCATTGATTCTCACCACG 3'
 NN2: 5' CGTGGTGAGAATCAATG(5mC)CGCTAAAGTACAAGC 3'

Как видно из рисунка 2, эндонуклеаза BslI расщепляет дуплекс NN1*/NN2, содержащий метилированную последовательность 5'-GCNGC-3', но не расщепляет дуплекс NN01*/NN02, который содержит такую же неметилированную последовательность. Таким образом, BslI действительно расщепляет лишь метилированные нуклеотидные последовательности 5'-G(5mC)NGC-3'.

Определение места расщепления ДНК сайт-специфической эндонуклеазой BslI осуществляли путем сравнения длин фрагментов, образующихся при расщеплении олигонуклеотидного дуплекса NN1/NN2 эндонуклеазами BslI и BisI (рис. 3). Из рисунка 3 видно, что длины продуктов расщепления ДНК этими ферментами различаются на 1 нуклеотид, причем при расщеплении ДНК эндонуклеазой BslI образуется более длинный 5'-меченый олигонуклеотидный фрагмент, что свидетельствует о смещении места расщепления ДНК эндонуклеазой BslI на 1 нуклеотид в сторону 3'-конца относительно места расщепления ДНК эндонуклеазой

BisI. Таким образом, BslI расщепляет последовательность узнавания, как показано стрелками:



Результаты работы по изучению способности BslI расщеплять сайт узнавания с различным распределением метилированных цитозиновых оснований будут приведены отдельно.

Таким образом, в настоящей работе охарактеризована сайт-специфическая эндонуклеаза BslI, являющаяся неоизомером фермента BisI. Фермент BslI относится к редкой группе сайт-специфических эндонуклеаз, которые узнают и расщепляют только метилированную ДНК. Эндонуклеазы BisI и BslI узнают нуклеотидную последовательность 5'-G(5mC)NGC-3', но BslI, в отличие от BisI [3], расщепляет ее с образованием однонуклеотидных 3'-выступающих концов. Следует отметить, что BslI — это первый обнаруженный представитель данной группы ферментов, расщепляющий ДНК с образованием 3'-выступающих концов.

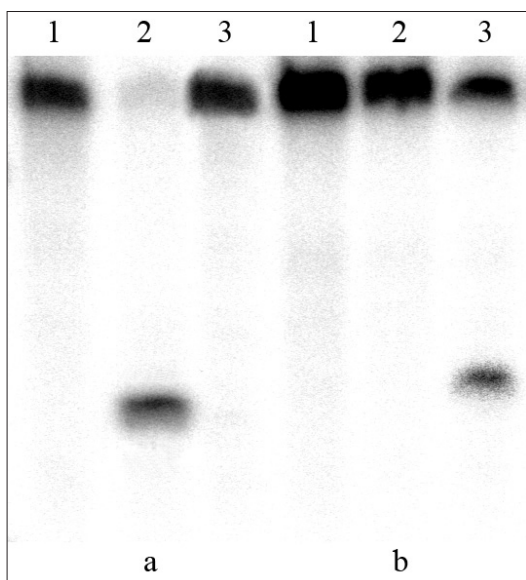


Рис. 2. Расщепление олигонуклеотидных дуплексов NN01*/NN02 (a) и NN1*/NN2 (b) эндонуклеазами Fsp4HI (сайт узнавания 5'-GCNGC-3') (дорожка 2) и BslI (дорожка 3). Дорожка 1 — контроль. Меченые олигонуклеотиды отмечены знаком «*»

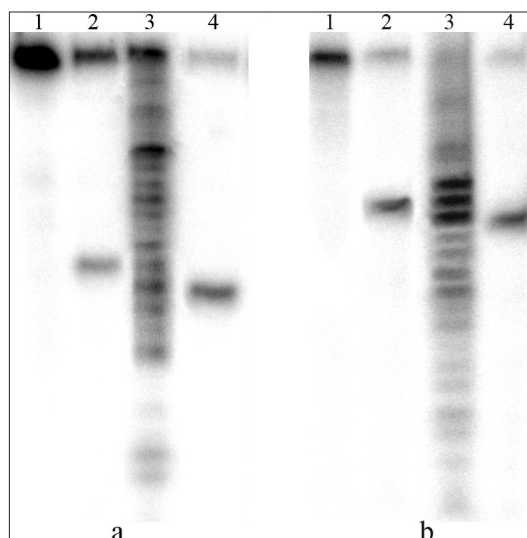


Рис. 3. Расщепление олигонуклеотидных дуплексов NN1*/NN2 (a) и NN2*/NN1 (b) экзонуклеазой III из E. Coli (дорожка 3) эндонуклеазами BslI (дорожка 2) и BisI (дорожка 4). Дорожка 1 — контроль. Меченые олигонуклеотиды отмечены знаком «*»

Так как оба фермента *BisI* и *BlsI* обнаружены в бактериальных штаммах, относящихся роду *Bacillus*, можно предположить, что их существование в клетках этого рода микроорганизмов играет какую-то особую роль, характерную для клеток *Bacillus*.

Наиболее вероятным представляется высказанное нами ранее предположение, что эти ферменты обеспечивают защиту бактерий от заражения фагами, содержащими метилированную ДНК [3].

Известно, что ряд бактериофагов, размножающихся именно на бактериальных клетках рода *Bacillus*, содержит гены сайт-специфических ДНК-метилтрансфераз, что приводит к метилированию ДНК фагов по ряду нуклеотидных последовательностей, в том числе и по сайту 5'-GCNGC-3' [12].

В этом случае роль ферментов *BisI* и *BlsI* может заключаться в расщеплении проникающей в клетку метилированной ДНК бактериофагов и предотвращении, таким способом, заражения клетки вирусом.

Мы полагаем, что *BisI* и *BlsI* могут найти применение для выявления и анализа метилированных участков ДНК эукариот, которые обычно содержат значительную долю 5-метилцитозиновых оснований. Как известно, метилирование ДНК играет значительную роль в регуляции клеточных процессов, но до сих пор остается недостаточно изученным [13].

Патент по данной работе находится в стадии оформления.

Литература

1. Roberts R.J., Belfor M., Bestor T., Bhagwat A.S., Bickle T.A. et al. A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes // *Nucleic Acids Res.* — 2003. — Vol. 31. — P. 1805–1812.
2. Lacks S., and Greenberg B.J. A deoxyribonuclease of *Diplococcus pneumoniae* specific for methylated DNA // *Biol. Chem.* — 1975. — Vol. 250. — P. 4060–4066.
3. Чмуж Е.В., Каширина Ю.Г., Томилова Ю.Э., Мезенцева Н.В., Дедков В.С., Гончар Д.А., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х. Новая эндонуклеаза рестрикции *BisI* из *Bacillus subtilis* T30 узнает метилированную последовательность ДНК 5'G(m5C)^NGC-3' // *Биотехнология.* — 2005. — № 3. — С. 22–26.
4. Чернухин В.А., Наякшина Т.Н., Абдурашитов М.А., Томилова Ю.Э., Мезенцева Н.В., Дедков В.С., Михненко Н.А., Гончар Д.А., Дегтярев С.Х. Новая эндонуклеаза рестрикции *GlaI* узнает метилированную последовательность 5'G(m5C)^GC-3' // *Биотехнология.* — 2006. — № 4. — С. 23–28.
5. Томилова Ю.Э., Чернухин В.А., Дегтярев С.Х. Зависимость активности сайт-специфической эндонуклеазы *GlaI* от количества и положения последовательности 5'-CCGC-3' // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова.* — 2006. — Т. 2. — № 1. — С. 30–39.
6. Белавин П.А., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Метод определения эндонуклеаз рестрикции в колониях бактерий // *Прикладная биохимия и микробиология.* — 1988. — Т. 24. — № 1. — С. 121–124.
7. *Руководство к практическим занятиям по микробиологии* / Под ред. Н.С. Егорова. — М., 1995.
8. *Определитель бактерий Берджи* / Под ред. Хоулта Дж. и др.: 9-е изд. в 2-х томах: Пер. с англ. под ред. акад. РАН Г.А. Заварзина. — М., 1997.
9. Madden T.L., Tatusov R.L., Zhang J. Applications of network BLAST server // *Meth. Enzymol.* — 1996. — Vol. 266. — P. 131–141.
10. Чмуж Е.В., Каширина Ю.Г., Томилова Ю.Э., Чернухин В.А., Охупкина С.С., Гончар Д.А., Дедков В.С., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х. Клонирование генов, сравнительный анализ структуры белков системы рестрикции-модификации *Fsp4NI* и биохимическая характеристика рекомбинантной ДНК-метилтрансферазы *M.Fsp4NI* // *Молекулярная биология.* — 2007. — Т. 41. — № 1. — С. 1–9.
11. Чернухин В.А., Каширина Ю.Г., Суханова К.С., Абдурашитов М.А., Гончар Д.А., Дегтярев С.Х. ДНК-метилтрансфераза *FauIA*, модифицирующая второй остаток цитозина в непалиндромной последовательности 5'-CCCCG-3' // *Биохимия.* — 2005. — Т. 70. — № 6. — С. 829–837.
12. Lange C., Noyer-Weidner M., Trautner T.A., Weiner M., Zahler S.A. M.H2I, a multispecific 5C-DNA methyltransferase encoded by *Bacillus myloliquefaciens* phage H2 // *Gene.* — 1991. — Vol. 100. — P. 213–218.
13. Costello J.F., and Plass C. Methylation matters // *J. Med. Genet.* — 2001. — Vol. 38. — P. 285–303.

**SITE-SPECIFIC ENDONUCLEASE B_lI FROM BACILLUS SIMPLEX 23
RECOGNIZES METHYLATED DNA SEQUENCE 5'-G(M5C)N ↓ GC-3' AND
CLEAVES IT PRODUCING 3' ENDS**

V.A. CHERNUKHIN*, Yu.E. TOMILOVA, E.V. CHMUZH, O.O. SOKOLOVA,
V.S. DEDKOV, S.Kh. DEGTYAREV

SibEnzyme Ltd., Novosibirsk

A bacterial strain *Bacillus simplex* 23, a producer of a methyl-directed site-specific DNA endonuclease has been discovered. The enzyme, designated as B_lI, recognizes methylated nucleotide sequence 5'-G(m5C)N ↓ GC-3' and cleaves it as shown by arrow, producing 3' ends. B_lI is a neoschizomer of B_lS, which recognizes nucleotide sequence 5'-G(m5C) ↓ NGC-3'. B_lI may be used in genetic engineering experiments and in determination of methylation status of eukaryotic DNA.

Keywords: methyl-directed site-specific DNA endonucleases, DNA methylation.

СВЯЗЫВАНИЕ ЦИТРАТСИНТАЗЫ И МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ С ВНУТРЕННЕЙ МЕМБРАНОЙ МИТОХОНДРИЙ

И.Г. МОРГУНОВ*, С.В. КАМЗОЛОВА

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН,
Пушино, Московская обл.*

В данной работе предпринята попытка показать, что два митохондриальных фермента цикла трикарбоновых кислот — цитратсинтаза и малатдегидрогеназа — способны связываться с внутренней мембраной митохондрий. В качестве доказательства приводятся результаты экспериментов по сорбции цитратсинтазы и малатдегидрогеназы из раствора на препараты митопластов и «вывернутых» субмитохондриальных частиц. Сорбция оценивалась посредством измерения активности ферментов в указанных препаратах и обнаружения их с помощью иммуноэлектронной микроскопии.

Ключевые слова: субмитохондриальные частицы, митопласты, цикл трикарбоновых кислот, малатдегидрогеназа, цитратсинтаза.

После разрушения эукариотических клеток и последующего дифференциального центрифугирования ферменты обнаруживаются как в различных фракциях осадка, так и в надосадочной жидкости. Надосадочная жидкость содержит так называемые «растворимые» ферменты, то есть ферменты, которые могут быть экстрагированы водными растворами в виде отдельных единиц, сохраняющих каталитическую активность. Относительная легкость выделения и кристаллизации сделала эти белки популярными объектами исследований, и большая часть наших сведений о структуре и функциях ферментов получена именно при изучении растворимых ферментов.

При разрушении митохондрий происходит реализация в раствор шести ферментов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК): цитратсинтазы (КФ 4.1.3.7), аконитазы (КФ 4.2.1.3), НАД-изоцитратдегидрогеназы (КФ 1.1.1.41), сукцинил-КоА-синтазы (КФ 6.2.1.4), фумаразы (КФ 4.2.1.2) и малатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.37). Пируватдегидрогеназный и кетоглутаратдегидрогеназный (КФ 2.3.1.61, 1.6.4.3, 1.2.4.1) комплексы остаются частично связанными с мембранами, но могут быть легко экстрагированы из них [12]. Сукцинатдегидрогеназа

(КФ 1.3.99.1) прочно связана с внутренней мембраной митохондрий и иногда рассматривается как мембранный компонент. Вместе с тем показано, что сукцинатдегидрогеназа может быть выделена из мембран после жесткой (но без применения детергентов) обработки [16].

Согласно современным представлениям, ферменты ЦТК внутри нативных митохондрий способны связываться между собой и с поверхностью мембран, образуя высокоорганизованные комплексы. Для обозначения надмолекулярных комплексов ферментов одного метаболического пути П. Шрере был предложен термин метаболон [16, 23]. Экспериментальные данные, подтверждающие эту точку зрения, суммированы в обзорах [1, 21, 22]. Необходимо отметить, что существует ряд методологических проблем в демонстрации такого рода фермент-ферментных взаимодействий.

В серии предшествующих работ с использованием различных методологических подходов соавторами настоящего исследования продемонстрировано взаимодействие между двумя последовательными ферментами ЦТК — митохондриальной цитратсинтазой (ЦС1) и митохондриальной малатдегидрогеназой (мМДГ). Был сконструирован фьюжен-протеин, состоящий из ЦС1 и мМДГ, который был экспрессирован и транспортирован в митохондрии мутантных дрожжевых клеток, лишенных ЦС1 [18]. Показано, что ЦС1 и мМДГ из сердца свиньи осаждаются в 14%-ном растворе полиэтиленгликоля. При этом ни цитозольная малатдегидрогеназа (цМДГ), ни бычий сывороточный альбумин, ни многие другие

* Автор для переписки:

© 2007 г. Моргунов Игорь Григорьевич,
к.б.н., старший научный сотрудник,
ИБФМ РАН, руководитель лаборатории,
142290 Пушино Московской обл.,
e-mail: morgunovs@rambler.ru

исследованные белки не осаждались при этих условиях [14]. При применении данного метода для осаждения дрожжевых ЦС и мМДГ получены сходные результаты [25]. Предполагалось, что взаимное ориентирование двух молекул ферментов, находящихся в непосредственной близости друг от друга, может создать некоторые кинетические преимущества для системы ЦС/мМДГ, по сравнению с отдельно функционирующими ферментами в растворе. Фьюжен-протеин и система ЦС/мМДГ и свободные ферменты ЦС и МДГ были проанализированы в присутствии аспаратаминотрансферазы — фермента ливерной оксалоацетата. Аспаратаминотрансфераза была менее эффективным ингибитором в реакции, катализируемой фьюжен-протеином или системой ЦС/мМДГ по сравнению со свободными ферментами, что позволяет предположить, что внутри комплекса существует субстратный канал для оксалоацетата. Кроме того, была определена электростатическая природа субстратного канала [14], которая также была подтверждена моделью, рассчитанной с использованием уравнений броуновской динамики [25].

Целью данного исследования было обнаружение доказательств способности цитратсинтазы и малатдегидрогеназы связываться с внутренней митохондриальной мембраной. Сорбция ферментов из раствора на «вывернутые» субмитохондриальные частицы (СМЧ) и митопласты оценивалась посредством измерения активности ферментов в указанных препаратах и обнаружения их с помощью иммуноэлектронной микроскопии.

Материалы и методы

Материалы. В работе использовали следующие коммерческие очищенные препараты — митохондриальная цитратсинтаза (ЦС) из сердца свиньи (КФ 4.1.3.7) и митохондриальная МДГ (мМДГ) из сердца свиньи (КФ 1.1.1.37) (Boehringer Mannheim), цитозольная МДГ (цМДГ) из сердца свиньи (КФ 1.1.1.37) (Sigma). С целью удаления примесей сульфата аммония коммерческие ферменты были центрифугированы, растворены в 50 мМ Tris-HCl (рН 8,0) и профильтрованы на колонке Sephadex G-50. Субстраты и ферменты для измерения активности ферментов были получены из Sigma и P-L Biochemicals (США). Первичными антителами к цитратсинтазе являлись очищенные и концентрированные иммуноглобулины кроликов, иммунизированных в течение длительного периода (18 мес.) небольшими порциями (100–500 мкг) препарата ЦС. Иммунизацию проводили по схеме, описанной в работе Moriyama and Srege, 1971

[15]. Для мечения ЦС и МДГ были использованы вторичные антитела, конъюгированные с коллоидным золотом (Amersham, США).

Выделение митохондрий. Митохондрии были выделены из сердца белых лабораторных крыс массой тела 200–250 г, используя метод, описанный ранее [13] с незначительными модификациями. Сердце перфузировали физиологическим раствором, содержащим 0,5 мг/мл (10 мг/на сердце) протеазы Nagarse (Сигма, США). Сердце гомогенизировали с использованием стеклянного гомогенизатора Поттера в 10 объемах среды, содержащей 220 мМ маннитола, 70 мМ сахарозы, 2 мМ HEPES, 0,1% БСА, рН 7,4. Гомогенат центрифугировали при 1000 г в течение 10 мин. для удаления ядер и крупных фрагментов. Для осаждения митохондрий супернатант центрифугировали дважды при 14000 г в течение 10 мин. Выход митохондрий составлял 15–18 мг белка из одного сердца. Концентрация белка была определена с использованием коммерческого кита, основанного на определении микроколичеств белка методом Лоури (Sigma).

Получение митопластов и СМЧ. Для удаления внешней мембраны и получения митопластов митохондрии обрабатывали 0,75% раствором дигитонина в течение 10 мин. [9]. СМЧ получали с помощью обработки митопластов ультразвуком [10]. Митопласты (50 мг по белку) суспендировали в 25 мл дистиллированной воды, центрифугировали при 10000 г 10 мин., ресуспендировали в 1 мл воды и обрабатывали ультразвуком (20 кГц/сек., 40 Вт) на льду. Обработку повторяли 8 раз по 15 сек. и последний раз — 30 сек. Полученный препарат центрифугировали (10000 г, 10 мин.) для удаления больших «невывернутых» везикул. СМЧ промывали 2 мМ HEPES буфером, рН 7,0 (буфер А) и собирали центрифугированием при 100000 г в течение 1 часа.

Связывание ЦС и МДГ с митопластами и СМЧ. Для изучения связывания препараты митопластов и СМЧ и коммерческие препараты ЦС и мМДГ диализовали против буфера А. Препараты мембран инкубировали 15 мин. в растворе БСА (1 мг/мл) для блокирования возможных участков неспецифического связывания белка, затем промывали буфером А. Мембраны (700 мкг по белку) и препараты ферментов (100 мкг) инкубировали 15 мин. при 0 °С в 500 мкл буфера А, содержащего 0,5 мМ дитиотрейтола. Мембраны осаждали центрифугированием (100000 г, 30 мин.) и промывали в буфере А. Конечный осадок растворяли в 500 мкл буфера А и измеряли активности ЦС и МДГ в надосадочной жидкости и в суспензиях мембран.

Определение активности ферментов. ЦС определяли в реакционной среде следующего состава: 0,2 мМ ацетил-КоА, 0,5 мМ оксалоацетата, 0,1 мМ ДТНБ, 100 мМ трис-НСL-буфер, рН 7,5 при поглощении 412 нм [20]. Малатдегидрогеназа была определена при 340 нм в реакционной смеси следующего состава: 0,1 мМ НАДН и 0,1 мМ оксалоацетата в 50 мМ трис-НСL-буфер, рН 7,5 [8]. Активность НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы измеряли при 340 нм. Стандартная реакционная смесь содержала: 0,5 мМ НАД, 1 мМ изоцитрат, 5 мМ MgCl₂, 0,5 мМ АМР и 50 мМ КН₂РО₄, рН 7,4 [11]. Активность аконитатгидратазы измеряли при 240 нм в реакционной смеси, содержащей 50 мМ калий-фосфатного буфера, рН 7,5 и 5 мМ изоцитрата [5]. Реакционная смесь для определения аспаратаминотрансферазы содержала 200 мМ Tris-НСL (рН 8,1), 30 мМ аспартата натрия, 2,5 мМ кетоглутарата натрия, 0,05 мМ пиридоксинфосфата, 2 Ед./мл малатдегидрогеназы, 0,15 мМ НАДН [6].

Иммуноэлектронная микроскопия. Для электронной микроскопии препараты мембран со связанными ферментами помещали на никелевые сетки. После промывки буфером А с 2% альбумином сетки инкубировали с первичными антителами для ЦС или МДГ (30 мин., 4 °С), промывали и переносили в смесь вторичных антител, конъюгированных с коллоидным золотом (Amersham, США); для мечения МДГ использовали частицы золота диаметром 5 нм, для ЦС – 15 нм. После инкубации (30 мин. при 4 °С) и отмывки препарат фиксировали в 2%-ном растворе глутарового альдегида и сетки анализировали в электронном микроскопе (Phillips, EM301).

Результаты и обсуждение

После удаления внешней мембраны митохондрий из сердца крыс дигитонином, обработки ультразвуком часть митопластов инвертирует и образует СМЧ, в которых внутренняя сторона митохондриальной мембраны обращена наружу. Препараты СМЧ не содержали активности ЦС, МДГ, НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы, аспаратаминотрансферазы (данные не представлены). Препараты СМЧ и митопласты инкубировали с коммерческими очищенными препаратами митохондриальных ЦС и мМДГ, как описано в разделе «Материалы и методы». После промывки и осаждения мембран центрифугированием определяли процентное содержание ферментов в суспензиях мембран и надосадочной жидкости. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

Связывание ЦС и МДГ с мембранами митохондрий

Ферменты/ мембраны	Количество связавшегося фермента (%)	Количество несвязавшегося фермента (%)
ЦС + митопласты	12 ± 3	88 ± 5
ЦС + СМЧ	61 ± 2	39 ± 3
мМДГ + митопласты	6 ± 1	95 ± 6
мМДГ + СМЧ	89 ± 3	12 ± 3
цМДГ + митопласты	0	100
цМДГ + СМЧ	0	100

Пояснение. Препараты митопластов и СМЧ и препараты ЦС, мМДГ, цМДГ инкубировали в 2 мМ Нерес буфере (рН 7,0), содержащем 0,5 мМ дитиотрейтола в течение 15 мин. при 0 °С. Мембраны осаждали центрифугированием и измеряли активности ЦС и МДГ в суспензиях мембран и надосадочной жидкости. В таблице представлены средние значения результатов трех экспериментов

Как видно, 61% ЦС и 89% мМДГ осаждалось с препаратом СМЧ. Связывание обоих ферментов с СМЧ является специфичным, так как ни ЦС, ни мМДГ не взаимодействовали с интактными митопластами, то есть с внешней стороной внутренней мембраны (процентное содержание ЦС и мМДГ с митопластами составляло 12 и 6%, соответственно); цМДГ не осаждался при этих условиях ни с препаратом митопластов, ни с препаратом СМЧ.

Следует отметить, что связывание СЦ и мМДГ с СМЧ практически не изменялось с увеличением ионной силы и рН среды (рис. 1). Подобные закономерности были нами отмечены и при замене КСL на NaCL, фосфорнокислый калий, а также при замене 2 мМ Нерес на 2 мМ Tris-НСL.

Кроме физико-химических подходов, для демонстрации связывания ЦС и МДГ с СМЧ нами был использован иммуноцитохимический метод. Для этого препараты СМЧ фиксировали на сеточках для электронной микроскопии и инкубировали с препаратами ЦС или мМДГ и соответствующими первичными антителами. Далее сеточки инкубировали в растворе вторичных антител, в качестве которых использовали антитела против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные

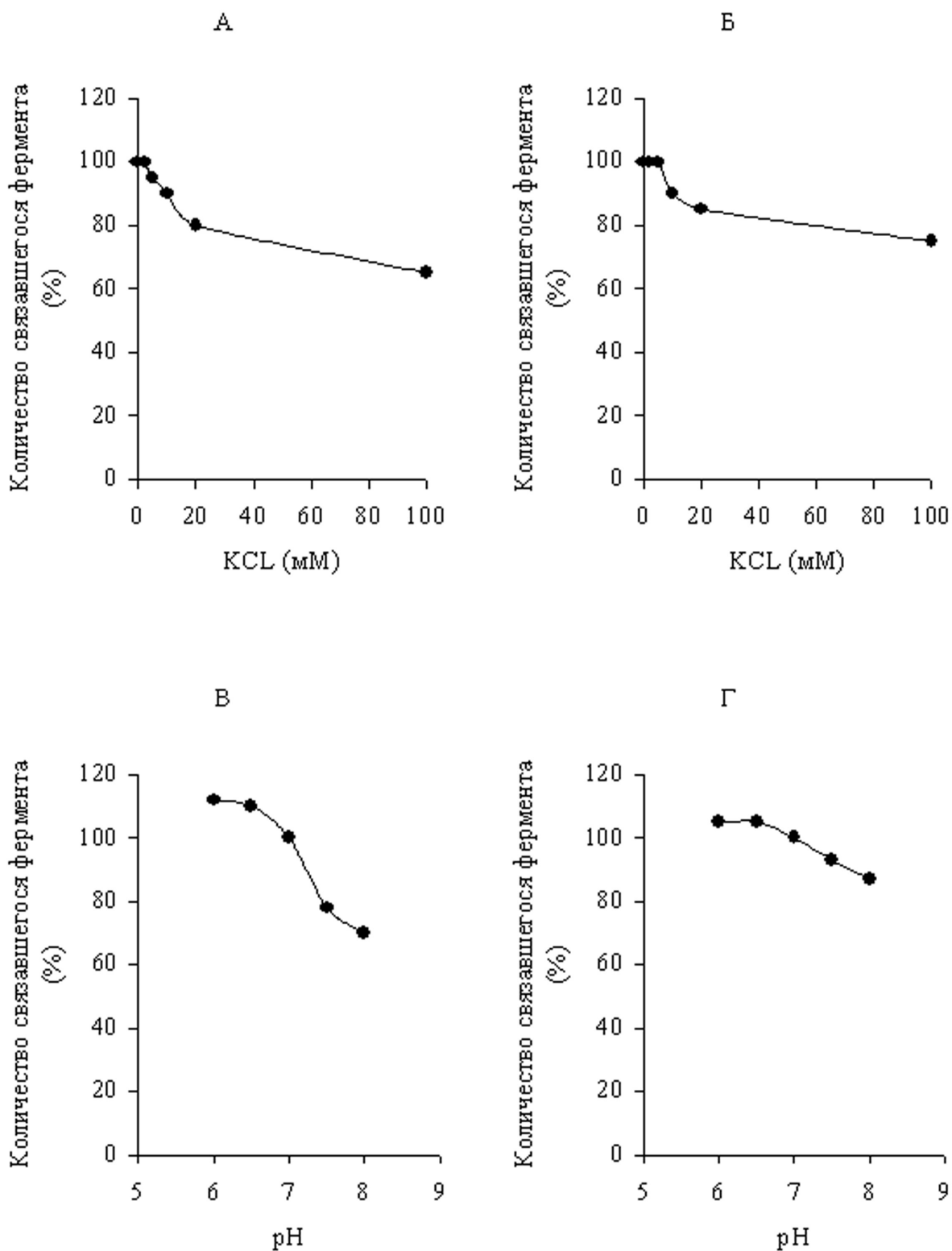


Рис. 1. Влияние KCl и pH среды на связывание ЦС (А, В) и мМДГ (Б, Г) с СМЧ

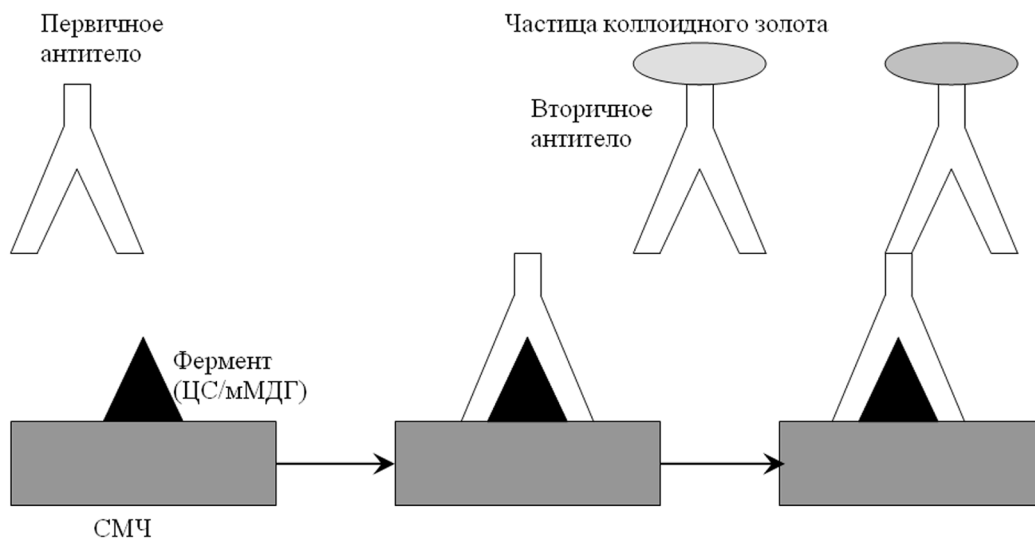


Рис. 2. Схематическое изображение процедуры мечения ЦС и мМДГ коллоидным золотом

с коллоидным золотом (рис. 2) диаметром частиц 5 или 15 нм для ЦС и мМДГ, соответственно. Препарат обрабатывали в 2%-ном растворе глутарового альдегида и сетки просматривали в электронном микроскопе. На рисунке 3 представлены фотографии, полученные при помощи электронной микроскопии. Как для мМДГ, так и для ЦС метка коллоидного золота обнаруживалась на мембранах СМЧ. В качестве контроля препараты мембран, не обработанных ферментами, инкубировали с антителами; на этих препаратах частицы коллоидного золота не обнаруживались (данные не представлены).

Таким образом, полученные результаты демонстрируют существование взаимодействий ферментов ЦТК, в частности, ЦС и МДГ с внутренними мембранами митохондрий, и поддерживают идею надмолекулярной организации ферментов, которая реализуется в большинстве случаев в виде ферментных ансамблей, для поддержания которых необходимы мембраны и структурные белки.

Целенаправленные исследования ферментных ансамблей осуществлены в Институте белка РАН (А.С. Спирин и А.Г. Рязанов). По представлениям А.Г. Рязанова и А.С. Спирина [2, 3, 4, 17, 19], адсорбированные ферменты могут обеспечивать компартментализацию метаболитов у поверхности субклеточных структур, на которых адсорбированы эти ферменты. Модель, предложенная этими авторами и названная «эстафетой у поверхности», учитывает возможность прямой передачи

интермедиата из активного центра одного фермента в активный центр следующего фермента данного метаболического пути.

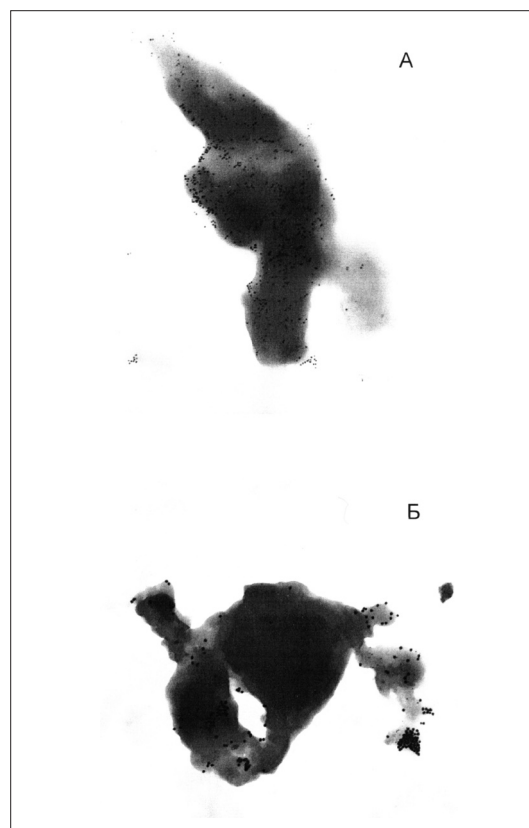


Рис. 3. СМЧ со связанными мМДГ (А) и ЦС (Б) после мечения антителами с коллоидным золотом. Диаметр частиц коллоидного золота для мечения мМДГ — 5 нм, для ЦС — 15 нм

Результатом действия ферментов по эстафетному механизму будет то, что интермедиаты метаболического пути остаются вблизи поверхности. При этом продукты ЦТК — электроны в форме восстановительных эквивалентов (НАДН и ФАДН₂) могут передаваться на белки дыхательной цепи, также ассоциированные с внутренней мембраной митохондрий.

Связывание ферментов ЦТК на внутренней мембране митохондрий может быть обусловлено их взаимодействием со специфическими белками, локализованными на внутренней мембране [7]. Ранее было показано, что дегидрогеназы ЦТК были способны связываться с липосомами, содержащими комплекс I, и не взаимодействовали с теми же липосомами, но содержащими комплекс II [24].

Такая организация метаболического пути в ЦТК может создавать ряд преимуществ для клетки:

1) создается возможность для формирования «субстратных каналов», при котором субстраты передаются от одного фермента пути к последующему, без выхода в раствор, где они могут быть захвачены ферментами других метаболических путей;

2) внутри комплексов ферментов создается микроокружение, в котором концентрация субстратов может существенно повышаться даже при наличии ограниченного числа молекул этих субстратов и

3) клетка имеет возможность эффективно и направленно регулировать собственный метаболизм.

Литература

1. Курганов Б.И. Физико-химические механизмы регуляции активности ферментов. — М.: Наука, 1992. — 62 с.
2. Рязанов А.Г., Спиринов А.С. Компартиментализация биохимических процессов на полирибосомах и других субклеточных структурах // Успехи биол. химии. — 1988. — Т. 29. — № 3. — С. 44.
3. Рязанов А.Г., Спиринов А.С. Организация ферментов на внутриклеточных структурах: эстафета у поверхности // Биохимия. — 1989. — Т. 54. — № 5. — С. 709–716.
4. Спиринов А.С. Энергетика и динамика белоксинтезирующего аппарата // Успехи биол. химии. — 1989. — Т. 30. — С. 3–25.
5. Anfinsen Ch.B. Aconitase from pig heart muscle / In: Methods in enzymology. Eds. Colowics S.P., Kaplan N.O. — N.-Y.—L.: Acad. Press 1. — 1955. — P. 695–698.
6. Dixon G.H., Kornberg H.L. Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle // Biochem. J. — 1959. — Vol. 72. — P. 31–37.
7. D'Souza S.F., and Srere P.A. Cross-linking of mitochondrial matrix proteins in situ // Biochim. Biophys. Acta. — 1983. — Vol. 724. — P. 40–51.
8. Englard S., Siegel L. Mitochondrial L-malate dehydrogenase of beef heart / In: Lowenstein J.M. (ed.). Methods in Enzymology. — Academic Press, New York, XIII, 1969. — P. 99–106.
9. Greenawalt J.W. The isolation of outer and inner mitochondrial membranes // Methods Enzymol. — 1974. — Vol. 31. — P. 310–323.
10. Hackenbrock C.R., and Hammon K.M. Cytochrome C oxidase in live mitochondria. Distribution and orientation determined with affinity purified immunoglobulin and ferritin conjugates // J. Biol. Chem. — 1975. — Vol. 250. — P. 9185–9197.
11. Kornberg A., Pricer W.E.J. Di- and triphosphopyridine nucleotide isocitric dehydrogenases in yeast // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 189. — P. 123–136.
12. Matlib M.A., O'Brien P.J. Compartmentation of enzymes in the rat liver mitochondrial matrix // Arch. Biochem. Biophys. — 1975. — Vol. 167 (1). — P. 193–202.
13. Matlib M.A., Shannon W.A.Jr., Srere P.A. Measurement of matrix enzyme activity in isolated mitochondria made permeable with toluene // Arch. Biochem. Biophys. — 1977. — Vol. 178 (2). — P. 396–407.
14. Morgunov I., Srere P.A. Interactions between citrate synthase and malate dehydrogenase. Substrate channeling of oxaloacetate // J. Biol. Chem. — 1998. — Vol. 273 (45). — P. 29540–29544.
15. Moriyama T. and Srere P.A. Purification of rat heart and rat liver citrate synthases. Physical, kinetic, and immunological studies // J. Biol. Chem. — 1971. — Vol. 246 (10). — P. 3217–3223.
16. Robinson J.B., and Srere P.A. Organization of Krebs tricarboxylic acid cycle enzymes in mitochondria // J. Biol. Chem. — 1985. — Vol. 260. — P. 10800–10805.
17. Ryazanov A.G. Organization of soluble enzymes in the cell. Relay at the surface // FEBS Lett. — 1988. — Vol. 373. — P. 1–4.
18. Shatalin K., Morgunov I., Srere P.A. Electostatic channeling between citrate synthase and malate dehydrogenase fusion protein // FASEB J. — 1997. — Vol. 11 (9). — P. 928.
19. Spirin A.S., and Ajtkozhin M.A. Informosomes and polyribosome-associated proteins in eucaryotes // Trends Biochem. Sci. — 1985. — Vol. 10. — P. 162–165.
20. Srere P.A. Citrate synthase / In: Methods in Enzymol. Ed. Lowenstein J.M. — N.-Y.—L.: Acad. Press, 1963. — Vol. 13. — P. 3–11.
21. Srere P. A. Complexes of sequential metabolic enzymes // Annu. Rev. Biochem. — 1987. — Vol. 56. — P. 89–124.
22. Srere P.A. Macromolecular interactions: tracing the roots // Trends Biochem. Sci. — 2000. — Vol. 25. — P. 150–153.

23. *Srere P.A.* The metabolon // *Trends Biochem. Sci.* – 1985. – Vol. 10. – P. 109–110.
24. *Sumegi B., and Srere P.A.* Complex I binds several mitochondrial NAD-coupled dehydrogenases // *J. Biol. Chem.* – 1984. – Vol. 259 (24). – P. 15040–15045.
25. *Velot Ch., Lebreton S., Morgunov I., Usher K., Srere P.* Metabolic studies on mislocalized mitochondrial and peroxisomal citrate synthase in yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Biochemistry.* – 1999. – Vol. 38. – P. 16195–16204.

BINDING OF CITRATE SYNTHASE AND MALATE DEHYDROGENASE WITH INNER MITOCHONDRIAL MEMBRANE

I.G. MORGUNOV, S.V. KAMZOLOVA

*G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms of RAS,
Pushchino, Moscow Region*

The question is to prove can two mitochondrial enzymes of Krebs tricarboxylic acid cycle – citrate synthase and malate dehydrogenase – bind to inner mitochondrial membrane. As evidence of such possibility the results of experiments with a sorbtion of citrate synthase and malate dehydrogenase from solution on mitoplasts and «everted» submitochondrial particles were presented. The sorbtion was evaluated by measuring of enzyme activities in above mentioned preparations and their discovering by means of electronmicroscopic immunocytochemistry.

Keywords: submitochondrial particles, mitoplasts, Krebs tricarboxylic acid cycle, malate dehydrogenase, citrate synthase.

БИОТЕХНОЛОГИЯ И ПРОБЛЕМЫ СОХРАНЕНИЯ БИОРАЗНООБРАЗИЯ: ВОЗМОЖНЫЕ МЕТОДЫ МОНИТОРИНГА ЭКОСИСТЕМНЫХ РИСКОВ ГМО

В.С. ФРИДМАН^{1*}, М.В. ФРИДМАН²

¹ Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,

² ГНЦ «ГосНИИгенетика», Москва

I. Экосистемные риски ГМО: основания для понимания проблемы. Экосистемные риски ГМО заранее не очевидны. В оценке экосистемных рисков ГМО ученые и общество делятся на две неравные части. Одна часть экспертов-генетиков и биотехнологов считает эти риски несущественными, а опасность трансформации экосистем недоказанными и неопределенными (риски типа Пифия — вероятность наступления нежелательного события и тяжесть последствий неопределенны: Вельков, 2004). Это представители именно тех 1–2% стран, где выращивают трансгенные растения (ТР) и где соответствующий рынок прирастает на 20% в год (объем рынка ТР в 2005 году составил \$5 млрд., Вельков, 2005 [3]).

Другая часть экспертов (экологи), широкая публика и общественность оценивают экосистемный риск от распространения ТР и других ГМО по типу Кассандра (вероятность негативного события и тяжесть последствий велики, однако недооцениваются). Эти экспертные оценки отводят экосистемным рискам ГМО наивысший балл опасности вот уже 1,5–2 десятилетия именно в силу неочевидности последствий распространения ГМО, особенно отдаленных, и неконтролируемости экосистемных последствий стандартными методами экологического мониторинга — от «Летописей природы», практикуемых в заповедниках и других ООПТ, до точных инструментальных методов анализа, вроде бы позволяющих установить факт присутствия ГМ-компонента в биообъекте или его производных. Подавляющее большинство кри-

тически настроенных экспертов представляют страны, запрещающие посевы ТР на своей территории и жестко регулирующие поступление ГМО, так же, как и производимых из них продуктов.

При такой неустранимой противоположности в экспертных оценках риска следует использовать метод системных гомологий и параллелизмов. Риск от распространения ГМО в биогеоценозах как сложных системах обусловлен не столько свойствами самих ГМО, которые и оценивают эксперты, а сколько ответом системы на присутствие, размножение или скрещивание ГМО с близкими «дикими» формами. Данный ответ как раз обеспечивает риск наступления неблагоприятных экосистемных последствий от распространения ГМО, однако он не может быть определен непосредственно, например, по той схеме полевых и лабораторных испытаний ТР, которая описана в статье В.В. Велькова (2005) [3]. Тем более здесь от действия фактора (распространения ГМО) до отклика системы на воздействие должно пройти не меньше 10–15 лет. Даже расы насекомых, устойчивых к пестицидам — продукт элементарных эволюционных явлений, возникли в среднем через 20–30 лет применения ядохимикатов, а отбор там был более жесткий.

С точки зрения эколога, отличие ДНК-технологий от традиционной селекции заключается в исключительно высокой эффективности и скорости создания организмов с новыми, хозяйственно-ценными свойствами. Для потребителя столь высокий рост эффективности сельскохозяйственных технологий за такой короткий срок (всего 20 лет) является несомненным достоинством, но именно по этой причине для экосистем оно — потенциальный риск и проблема. Если эффективность рыболовной снасти возрастает во времени слишком быстро, рыбаки вылавливают опромышляемые популяции целиком, так как их сознание не успевает учесть риск возможного

* Автор для переписки:

© 2007 г. Фридман Владимир Семенович
119992 Москва, ГСП-2, Ленинские горы, 1, стр. 12,
Биологический факультет МГУ, кафедра высших растений,
лаборатория экологии и охраны природы
E-mail: wolf17@list.ru

перелова. Исключительно быстрый рост эффективности технологий создания организмов с новыми свойствами для нужд интенсивного сельского хозяйства за счет генетической модификации приводит к тому, что новосозданные ГМО «не укладываются» в ту иерархию размеров, экологических ниш и специализаций, которая сложилась исторически в природных сообществах. Для того чтобы локальные экосистемы, а тем более биомы были устойчивы в условиях природных и антропогенных «возмущений» на их территории, должна быть соблюдена определенная пропорция между видами г- и К-стратегами, специалистами и генералистами, крупными и мелкими формами, и так для каждой из гильдий, на которые делится пространство экологических ниш [2, 4].

Практически все созданные ГМО (по крайней мере, все ТР) никак не укладываются в эту «шкалу»: они или слишком скороспелые, или слишком урожайные, или слишком специализированные в отношении почвенных условий и агротехники. Распространение их в природных сообществах, тем более путем поглотительного скрещивания с ближайшими «дикими» родственниками создает потенциальный риск снижения устойчивости и разрушения естественных экосистем.

Этот риск сейчас недооценивают, успокаивая себя позитивными результатами краткосрочных тестов, показавших низкий потенциальный риск самих ГМО — в отношении ли здоровья людей, в отношении ли переноса генов устойчивости к «диким» родственникам или сорнякам (так называемая проблема «сверхсорняков») и пр. Однако в случае обсуждаемой опасности главным фактором риска являются не свойства самих ГМО, а реакции экосистемы на их постоянное присутствие и особенно замещение аналогичных форм в их собственной нише. Оценка этого риска требует многолетнего комплексного мониторинга, осуществляемого экологами и на уровне естественных экосистем (может быть, даже с «острым опытом» интродукции в частично нарушенные природные сообщества, там, где этот процесс идет уже сам собой), и требует десятилетий.

Иначе может получиться так же, как с недооценкой опасности от поглотительного скрещивания местных, узкоареальных, эндемичных форм птиц и млекопитающих с интродуцированными близкородственными домашними видами. Например, в результате поглотительного скрещивания с полувольной кряквой фактически исчезло 3–4 близких диких вида в Австралии, Новой Зеландии, Северной Америке [6]. Поскольку процесс развивается экспоненциально, сперва он малозаметен и кажется не угрожающим, а когда интрогрессия становится очевид-

ной, сохранить поглощаемую форму в чистоте обычно уже не удастся.

Статья написана с целью поставить проблему экосистемного риска ГМО на обсуждение и предложить несколько возможных путей ее решения с точки зрения того, что экологической теории уже известно об устойчивости, структуре и функционировании экосистем и их реакции на попадание туда популяций организмов с новыми свойствами [7]. «С точки зрения сообщества» это то же самое, что «нашествие» новых видов растений и животных, также связанные с антропогенным преобразованием биосферы, и при разработке методов мониторинга следует исходить из моделей уже реализованных рисков, не связанных с ГМО (табл. 1). Широкое внедрение ГМО в хозяйственную практику, скорее всего, лишь увеличит скорость всех отмеченных в таблице процессов, сделает их более глобальными.

Причины, обеспечивающие формирование экосистемных рисков ГМО, имеют свои системные аналоги не только в процессах, связанных с хозяйственной деятельностью человека (см. табл. 1), но и в дикой природе. Например, в работах отечественного генетика М.Е. Евгеньева показано, что природные векторы в масштабах эволюционного времени могут перемещаться даже между разными типами беспозвоночных. Геномы практически всех организмов содержат следы таких инвазий, чаще всего не одной, а нескольких. Можно предположить, что моменты таких инвазий совпадали с моментами наиболее интенсивного перемешивания популяций. Дело в том, что большинство таких векторов активно распространяется лишь в геномах, не несущих значительного количества копий вектора. Поэтому в изолированной популяции их распространение обычно прекращается уже через несколько поколений, зато начинается деградация интегрировавшихся в геном копий за счет мутационного процесса.

Какие выводы следуют из рассмотрения природных и антропогенных аналогов процессов, интересующих нас с природоохранной точки зрения как потенциальные факторы риска для экосистем?

Первый: экосистемные последствия распространения ГМО (как и процессов, перечисленных в таблице) пока плохо поддаются предсказанию, поэтому необходим детальный мониторинг происходящего, не связанный априорными гипотезами.

Второй: придавать этим процессам гораздо больший временной и пространственный масштаб может перемешивание изолированных природных популяций, стимулированное антропогенными изменениями и особенно урбанизацией.

Опасения по поводу ГМО: потенциальные риски ГМО и аналогичные процессы современности

Упомянутые потенциальные риски	Однотипные действительные проблемы, возникающие без ДНК-технологий
Неконтролируемое замещение обычных продуктов продуктами с ГМО. Отсутствие информации о составе продукта. Опасность неконтролируемого развития аллергических реакций, нарушения религиозных запретов.	Неконтролируемое замещение обычных продуктов суррогатными (растительные жиры в молоке, соя вместо мяса). Отсутствие информации о составе продукта. Опасность неконтролируемого развития аллергических реакций, нарушения религиозных запретов.
«Неестественная» биохимия и физиология ГМО, ориентированных лишь на продуктивность и/или скороспелость. Потенциальная неустойчивость к вредителям и конкурентам. Ориентация с/х на интенсивный путь развития, обязательность «больших доз» определенных удобрений, стимуляторов и ядохимикатов.	Общая ориентация селекционеров на максимальную продуктивность/скороспелость, быстрый искусственный отбор при нехватке времени на отбор стабилизирующий (в том числе на устойчивость к вредителям и конкурентам). Ориентация с/х на интенсивный путь развития, обязательность «больших доз» определенных удобрений, стимуляторов и ядохимикатов.
Принудительное вытеснение старых сортов сортами ГМО за счет терминаторных или иных технологий. Утрата генетического разнообразия, повсеместное присутствие определенных генетических маркеров, потенциальная неустойчивость к болезням и диверсиям.	Диктат монополий на рынке семенного материала, потеря уникальных местных сортов как вековая тенденция. Утрата генетического разнообразия, повсеместное присутствие определенных генетических маркеров, потенциальная неустойчивость к болезням и диверсиям (эпифитотия гельминтоспороза, поразившая кукурузу с T-цитотипом).
Опасности неконтролируемой рекомбинации ГМО, нарушение природной изменчивости (особенно микроорганизмов).	Неконтролируемое распространение плазмид устойчивости к антибиотикам в больницах и на птицефермах и другие неконтролируемые формы природной изменчивости.
Распространение ГМО как воздействие, последствия которого невозможно будет адекватно оценить (ввиду повсеместного проникновения и отсутствия должного контроля).	Таких воздействий за прошлый век было уже слишком много (телевидение, синтетические материалы, разнообразные продукты «большой химии», световое загрязнение — возможный источник акселерации). Невозможность адекватно оценить их последствия.

Примечание. Анализ некоторых проблем правого столбца см. Ю.П. Алтухов (2003) [1]

Поэтому при организации такого мониторинга необходимы экологи-специалисты как по ненарушенным, так и по экотонным, антропогенно-трансформированным местообитаниям.

Третий: Наиболее опасна модификация «диких» видов, особенно родственных угрожаемым.

Меры безопасности должны исходить, в первую очередь, из того, что окультуренные или узкоспециализированные виды, которые могли бы стать источником чужеродной ДНК в подобных скрещиваниях, крайне редко способны выжить в дикой природе. Например, таковы расы растений, адаптированные к росту в среде с высокой концентрацией тяжелых металлов, и те ТР

Arabidopsis thaliana, которые пытаются использовать для очистки геохимических аномалий в городах, особенно вдоль дорог. Организмы и популяции обладают естественными механизмами, позволяющие им держать под контролем внедрение чужеродной ДНК. Существенную опасность подобные инвазии могут представлять лишь для видов, уже находящихся под угрозой вымирания. Перенос чужеродной ДНК чаще всего осуществляется посредством скрещивания, описываемые инвазии в неродственный вид — явление редкое, обычно наблюдаемое лишь в эволюционных масштабах. Еще раз следует подчеркнуть, что векторы, используемые в генной инженерии, — это «ослабленный

вариант» природных векторов, лишенных способности к неконтролируемому перемещению. Так что рассматриваемый сценарий — наихудший из возможных; он может реализоваться, например, в маловероятном случае, когда такой вектор вновь приобретет способность к перемещению в результате рекомбинации ДНК.

Четвертый. Необходимо маркирование ГМО-конструкций безвредными и не вызывающими негативной психологической реакции визуально наблюдаемыми маркерами. Технически это легко осуществимо и лишь оно может обеспечить мониторинг распространения ГМО «полевыми» зоологами и ботаниками, которые и должны осуществлять данный контроль (естественно, привлекая современные молекулярно-генетические методы для точной идентификации). Ненаблюдаемый источник потенциальной угрозы вызывает большее число фобий, чем наблюдаемый (как в случае радиофобии), и эти фобии опасны для здоровья населения сами по себе, независимо от реального вреда.

II. Экосистемные риски от распространения ГМО: подходы и возможности управления. Поэтому программа мониторинга экосистемных последствий распространения ГМО, с одной стороны, безусловно необходима, в силу того, что интенсивность человеческой деятельности все больше нарушает устойчивость природы и «перемешивает» те виды, популяции и сообщества, которые вне антропогенного воздействия не должны никогда входить в контакт. С другой — в концептуальном плане она воспроизводит уже появляющиеся программы мониторинга и оценки других биозагрязнений, вообще «нашествий» чужеродных видов растений и животных. Однако она должна ориентироваться на иной пространственно-временной масштаб процесса проникновения ГМО в естественные и антропогенно-измененные экосистемы, на протяжении которого возможно действие факторов риска и нанесение ущерба.

Это «пространство и время» экологически значимых последствий распространения ГМО должно быть существенно больше, чем у уже зафиксированных видов воздействий. Пространство воздействия ГМО на природные сообщества должно быть шире в силу всеобщности производства и потребления ГМО, исключительно высоких темпов роста рынка генетически модифицированных семян и пр.. Время воздействия (необходимое для появления первых последствий) должно быть сравнимо со временем появления первых рас насекомых устойчивых к инсектицидам или даже значительно выше (прошло как минимум 25–30 лет после массового применения ДДТ и пр.).

В этой связи и предлагаются вышеописанные меры, направленные, с одной стороны, на минимизацию потенциальных экосистемных рисков ГМО, с другой — на возможность отследить и определить соответствующий риск, если он существует. С третьей — они позволяют гражданскому обществу воспринимать ГМО без преувеличенных восторгов или излишних ужасов, просто как еще один способ интенсификации сельского хозяйства, риски от которого вряд ли будут существенно иными, чем уже проявившиеся опасности.

«Проблема ГМО» и особенно проблема общественного восприятия потенциальной рискованности ГМО требует нахождения одновременного решения всех трех задач. Это возможно, если воспринимать ГМО просто как еще одну технологию, которая создает новые возможности, в том числе в решении экологических проблем, но и новые риски — в этой же области.

Перевод проблемы в конструктивную плоскость требует именно от экологов, обычно являющихся лишь бескомпромиссными критиками ГМО:

1. Указать ту область практики, где использование ГМО способно улучшать экологическую ситуацию. Это, в первую очередь, очистка городской среды от загрязнений. Практика показала, что решение проблемы загрязнения в городах техническими средствами невозможно из-за нарастающего отставания скорости очистки от темпов загрязнения, а химическими средствами — превращает города в «реакционные котлы» с непредсказуемыми последствиями для человека и биоты. В то же время использование ГМО для достижения чисто коммерческих целей (например, охраны авторских прав) должно быть максимально ограничено законодательно.

2. Указать более и менее рискованные виды потребления ГМО. Потребление ГМО парентерально как наиболее физиологическое, видимо, предпочтительнее, чем введение их в организм другими способами. Использование вакцин, полученных методами генной инженерии и не содержащих живых организмов, целых вирусных частиц или наиболее аллергических компонентов возбудителя, видимо, безопаснее применения «традиционных вакцин».

Другой аспект связан с безопасностью ГМО для естественных экосистем — домашние растения и животные без поддержки и защиты человека, как правило, нежизнеспособны в дикой природе и вселяются туда лишь после истребления экологических аналогов (одичавшие собаки вместо волка, лошади — вместо тарпана). Однако сейчас такое истребление происходит повсеместно. Поэтому от создателей ГМО необходимо

требовать нежизнеспособности таких организмов вне территории их применения, то есть геохимических аномалий в городах, если речь идет об очистке от загрязнений, и полях со специфической агрокультурой, если речь идет о сельскохозяйственных растениях. Примером могут быть расы растений, обитающие исключительно в местах, загрязненных тяжелыми металлами, и устойчивые к ним. На незагрязненных землях они просто не растут, так как не выдерживают конкуренции с «диким типом».

3. Указать возможности контроля и сравнения при оценке воздействия ГМО на людей и биоту. Это требует сохранения законодательными мерами нынешней чересполосицы стран, производящих и не производящих ГМО и продукцию из них. Для оценки экологических последствий распространения ГМО в экосистемах акт генетической модификации каких-либо культур должен производиться лишь одновременно с внедрением внешнего маркера, делающего факт модификации видимым и поэтому учитываемым, например, в полевых экологических исследованиях.

В силу многосторонности потенциальных рисков исследования должны быть массовыми и производиться на разном уровне организации биосистем (особь, популяция, биоценоз) и в силу этого основываться на бесприборной оценке. Существующие лабораторные методы оценки присутствия внедренных генов слишком длительны и недостаточно мобильны для задач полевых исследований.

Другой аспект: «утечка» генов от ГМО к немодифицированным организмам опасна, прежде всего, не объективно, а резким увеличением затрат на разделение модифицированного и немодифицированного продукта. В силу низкой агротехнической дисциплины в нашей стране и объективно плохой контролируемости процесса максимальная изоляция участков с ГМО должна быть обеспечена заранее и централизованно. Не исключено, что придется также предусмотреть определенные формы административной ответственности в законодательстве.

Исходя из того, что распространение ГМО в экологическом плане не создает ни одной новой проблемы, но придает уже существующим опасностям и риском качественно иной пространственный и скоростной масштаб, для задач мониторинга и оценки наиболее существенными будут процессы, происходящие в следующих регионах:

а) Региональные экосистемы, частично фрагментированные и/или трансформированные воздействием урбанизированного «ядра», и области интенсивного сельского хозяйства по периферии такого ядра (так называемые кольца фон Тюнена). Именно здесь создается

континуум условий существования от техногенных к природным, в условиях которых перенос генов от ГМО к их диким родственникам может оказаться селективно выгодным. Процесс ускоряется в условиях разрушения ценотической структуры природных сообществ по схеме, описанной в работе Е.А. Шварца (2004) [8].

б) Области теплового загрязнения и евтрофикации водных объектов, городские сливы и другие экстремальные условия для водных сообществ.

в) Природные сообщества, испытывающие последствия «дальнего переноса» биозагрязнений: краевые зоны дорог общероссийского значения, железнодорожных путей, лесные или луговые массивы близ крупных аэропортов и иных объектов, через которые постоянно происходит завоз потенциальных биозагрязнителей. Все крупные транспортные сооружения и коммуникации существенно трансформируют природные сообщества, что дополнительно провоцирует инвазию чужеродных видов растений и животных в краевые зоны. Необходим контроль изменений не столько на межах полей с ГМО-культурами, сколько вдоль дорог, по которым транспортируют урожай, и близ складов с готовой продукцией.

Все эти три случая представляют собой экотонные местообитания, где экотонизация создана направленным воздействием человека, превратившим природные зоны опушки с повышенным биоразнообразием в краевые зоны со сниженным биоразнообразием и частично разрушенными сообществами. Именно здесь (а не только в районе выращивания) наиболее вероятно внедрение ГМО и горизонтальный перенос генов к их диким родичам.

Соответственно необходима специальная программа комплексного мониторинга динамики биоразнообразия экотонных сообществ, в первую очередь, городских экосистем, для предотвращения рисков деструкции коренных сообществ при внедрении в них ГМО, более эффективных в соответствующей экологической нише, чем их дикие родичи. Из общих соображений, основанных на анализе нашествий «обычных» видов растений и животных [9], несвойственных коренным сообществам в местах заселения, соответствующий риск будет особенно велик, если ГМО на шкале г-К-стратегий воспроизводства популяции оказываются ближе к г-стратегии, чем их дикие аналоги.

Соответствующую программу мониторинга экологических рисков в краевых зонах и экотонных (прежде всего, урбанизированных) местообитаниях естественно финансировать из тех же средств, что и сами биотехнологические разработки, как часть корпоративной программы по снижению риска. Тем более что вовлечение про-

фессионалов-экологов и экологической общественности к осуществлению соответствующих программ позволит придать биотехнологическим разработкам тот «зеленый имидж», которого они сейчас лишены благодаря целенаправленной кампании диффамации со стороны экологических НПО, хотя биотехнология намного «экологичнее» угольной энергетики или дорожного строительства.

Заключение. Из сказанного следует, что ГМО парадоксальным образом могут не только создавать экологические проблемы, но и могут оказаться почти единственным эффективным орудием их разрешения. В первую очередь, это — проблема урбанизации, точнее, тесно связанная с ней проблема загрязнения городских ареалов. Последние 50 лет истории систематической борьбы с загрязнением показывают, что эффективного очищения городских ареалов техническими или химическими средствами достичь не удастся. Просто потому, что в силу очевидных экономических причин рост загрязнений происходит по экспоненте, так же, как и выпуск новых загрязнителей в окружающую среду, а мощь технических и химических систем очистки от загрязнения — только линейно.

Следовательно, в борьбе с загрязнением необходимы биологические агенты, способные размножаться так же экспоненциально, как растет загрязнение. Очевидно, это могут быть ГМО, эффективность которых повышена до необходимого уровня за счет достижений ДНК-технологий. Накапливая металлы и другие загрязнители в себе, подобные организмы оказываются эффективными агентами вторичного использования соответствующего сырья и возврата его в производственный цикл.

Человек, если он создает себе «вторую природу» и в ближайшие 50–100 лет не способен от нее отказаться, должен быть вполне последователен и помимо искусственных ландшафтов (города, каналы), искусственных экосистем (поля, пастбища, городские парки,

рекреационные леса) должен создавать искусственные редуценты, для того чтобы искусственные экосистемы справлялись с проблемой деструкции отходов. Анализ А.С. Керженцева (2000) [5] показывает, что неспособность городских экосистем и других искусственных ландшафтов решить проблему самоочищения связана со значительным перевесом продуцентов над редуцентами (как по массе, так и по эффективности), в отличие от природных сообществ.

Литература

1. *Алтухов Ю.П.* Генетические процессы в популяциях. — М.: ИКЦ «Академкнига», 2003. — 431 с.
2. *Барсков И.С., Жерихин В.В., Раутиан А.С.* Проблемы эволюции биологического разнообразия // Журн. общ. биол. — 1996. — Т. 57. — № 2. — С. 14–39.
3. *Вельков В.В.* Проблема оценки генетических рисков, связанных с трансгенными источниками / Труды Второго съезда Общества биотехнологов России. — М.: Изд-во «Дельта», 2005. — С. 19–36.
4. *Жерихин В.В.* Избранные труды по палеоэкологии и филогенетике. — М.: Товарищество научных изданий КМК, 2003. — 542 с.
5. *Керженцев А.С.* Экологическая альтернатива человека в биосфере и ноосфере / Экополис 2000: Экология и устойчивое развитие города. Межд. конф. — М.: Изд-во РАН, 2000. — С. 17–20.
6. *Панов Е.Н.* Гибридизация и этологическая изоляция у птиц. — М.: Наука, 1989. — 312 с.
7. *Розенберг Г.С., Мозговой Д.П., Гелашвили Д.Б.* Экология. Элементы теоретических конструкций современной экологии. — Самара, 1999. — 395 с.
8. *Шварц Е.А.* Сохранение биоразнообразия: сообщества и экосистемы. — М.: Товарищество научных изданий КМК, 2004. — 112 с.
9. *Элтон Ч.* Экология нашествий животных и растений. — М.: ИЛ, 1960. — 354 с.

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОТОПЛИВА В РОССИИ. СООБЩЕНИЕ 1: БИОДИЗЕЛЬ

Р.Г. ВАСИЛОВ*

Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, Москва

Введение

Биодизель, или биодизельное топливо — это экологически чистый вид топлива, альтернативный по отношению к минеральным («нефтяным») видам, получаемый из растительных масел и используемый для замены обычного дизельного топлива. Сырьем для производства биодизеля могут быть различные растительные масла: рапсовое, соевое, арахисовое, пальмовое, отработанные подсолнечное и оливковые, а также животные жиры.

Наибольший выход масла дает копра (62%); меньше — кунжут и клещевина; в средней группе находятся арахис, рапс, подсолнечник и др.; соя и хлопчатник имеют самые низкие показатели (13–14%).

С химической точки зрения биодизель представляет собой метиловый эфир. При его производстве в процессе этерификации масла и жиры вступают в реакцию с метиловым спиртом и гидроксидом натрия, служащим катализатором, в результате чего образуются метиловые эфиры жирных кислот, а также основной побочный продукт — глицерин. Французская компания Aхens разработала принципиально новую технологию производства биодизеля, основанную на использовании гетерогенного катализа.

Биодизель может использоваться в обычных двигателях внутреннего сгорания как самостоятельно, так и в смеси с обычным дизтопливом, без внесения изменений в конструкцию двигателя.

Проблема использования альтернативных источников энергии из возобновляемого сырья становится все более актуальной для современного общества как в связи с энергетическим кризисом, так и состоянием экологии.

Поэтому во многих странах реализуются государственные программы по созданию и внедрению различных видов альтернативного топлива (биогаз, биоэтанол, биодизель и др.). В Европе на первый план вышло направление по биодизелю, получаемого главным образом на основе рапсового масла (около 80% от общего объема производимого биодизеля). В странах ЕС по производству биодизеля лидируют Германия, Франция, Италия (данные 2004–2006 гг.); такие же уровни производства планируются в указанных странах и в дальнейшем. В последние годы высокая активность государственных и бизнес-структур в данном направлении отмечается и в странах СНГ (Украина, Беларусь).

Несмотря на то, что в России в настоящее время не существует проблем с обеспечением моторным топливом на основе углеводов, государственные и частные структуры должны учитывать мировые тенденции в отношении использования топлива из возобновляемого сырья. Отдельные инициативы проявляются, однако целенаправленной долгосрочной государственной политики пока не выработано. Хотя в последние годы отмечаются некоторые позитивные сдвиги, связанные, главным образом, с деятельностью Минсельхоза России.

Состояние проблемы в мире

Общие сведения. Богатство России природными и ископаемыми ресурсами создают в общественном сознании самоуспокоенность и некоторую недооценку необходимости более широкого внедрения источников энергии из возобновляемого сырья. За рубежом это уже в полной мере осознано и приняты соответствующие меры, в том числе на государственном уровне. Так, например, в США вышел закон «О биомассе», согласно которому ставится задача к 2025 г. довести объем продукции из возобновляемого сырья до 25%. Широко известны инициативы США последнего времени (2007 г.) по ускоренному развитию индустрии биоэтанола, в

* Автор для переписки:

© 2007 г. Василев Раиф Гаянович

Профессор, президент Общества биотехнологов России

им. Ю.А. Овчинникова

E-mail: obr@biorosinfo.ru

том числе в рамках международного сотрудничества с Бразилией.

В отношении моторного топлива в США большой акцент был сделан на биоэтанол, в странах ЕС — на биодизель. В качестве сельскохозяйственной культуры, наиболее отвечающей требованиям (агротехническим, биотехнологическим и т.д.) производства биодизеля, избран рапс.

История. Переэтерификация растительного масла была осуществлена Е. Duffy и J. Patick в 1853 году, задолго до создания первого дизеля Рудольфом Дизелем в 1893 г. Сам создатель дизеля не раз говорил о ценности растительного масла в качестве горючего для своего двигателя. Однако предпочтение было отдано углеводородам.

Начиная с 90-х годов XX века экологические и сырьевые проблемы заставили искать альтернативные источники моторного топлива из возобновляемого сырья (растения, водоросли и др.). За относительно короткий срок накоплен большой опыт во всем мире по вопросам производства и применения биодизеля. Особенно следует отметить такие государства, как Франция, Германия, Швеция, Австрия, где начиная с 1992 г. появились заводы по производству биодизеля.

Накопленный зарубежный опыт

Евросоюз

К настоящему времени уже накоплен определенный опыт производства биодизеля, который может быть использован с некоторой адаптацией к отечественным условиям. В странах ЕС суммарные мощности по производству биодизеля составляли: в 2003 г. — 1,45, в 2004 г. — 1,93, в 2005 г. — 3,18, в 2006 г. — 6,07 млн. тонн (табл. 1). Расчеты на 2010 год дают около 11,0 млн. тонн, хотя декларируемые Еврокомиссией объемы потребления указывают на уровень 19,0 млн. тонн.

В Евросоюзе было построено 40 заводов по производству биодизеля (по данным 2004 г.).

Следует подчеркнуть, что в 2004 г. треть урожая рапса в европейских странах была использована для производства биотоплива. Острота проблемы альтернативного топлива в Евросоюзе обуславливается и тем, что в нем транспортное топливо составляет 32% от общего потребления энергоресурсов. Директива ЕС 2003 г. по использованию биологических источников энергии предусматривает, что доля биодизеля в структуре моторного топлива (биодизель + биоэтанол) должна достичь в 2010 году 5,75% (на 2005 г. планировались 2%).

Таблица 1

Производство биодизеля в странах ЕС (тыс. тонн)

Страна	2004 г.	2005 г.	2006 г.
Австрия	57	85	134
Бельгия	—	1	85
Кипр	—	1	2
Чехия	60	133	203
Дания	70	71	81
Эстония	—	7	20
Франция	348	492	775
Германия	1035	1669	2681
Греция	—	3	75
Венгрия	—	—	12
Италия	320	396	857
Великобритания	9	51	445
Латвия	—	5	8
Литва	5	7	10
Мальта	—	2	3
Польша	—	100	150
Португалия	—	1	146
Словакия	15	78	89
Словения	—	8	17
Испания	13	73	224
Швеция	1,4	1	52
Всего по странам Евросоюза	1933,4	3184	6069

Важно, что в ЕС разработана согласованная общеевропейская политика в области производства биотоплива (это заставляют делать экология и энергетический кризис). Принята Белая книга ЕС по стратегии в области энергетики (1997), в которой указывается на необходимость повышения доли биотоплива на транспорте. В Зеленой книге (2000) подчеркивается важность биомассы для обеспечения безопасности энергоснабжения, а в заключительном отчете по Зеленой книге (2002) ставится задача к 2020 г. заменить 20% дизельного топлива и бензина на биотопливо.

В ЕС достаточно четко отлажена система регулирования в области биотоплива. Так, например, определены квоты для производства биотоплива: для Франции — 317,5 тыс. тонн в год, для Италии — 300,0 тыс. тонн в год. Для Германии и Австрии ограничения не предусмотрены.

Вообще в каждой стране ЕС выработаны собственные национальные правовые механизмы стимулирования производства биотоплива.

Германия. Германия занимает 1-е место среди европейских стран по производству биодизеля. В ней недопустимы смеси биотоплива. Поэтому чистое биотопливо не облагается налогом, поскольку биодизель не признается топливом. Германия не имеет ограничений по производству биотоплива и входит в число 6 стран ЕС, производящих биотопливо на коммерческой основе. В Германии ставится задача достичь 5% биодизеля в автомобильном топливе к 1 января 2007 г.

В Германии функционируют более 20 биодизельных заводов, производящих биотопливо на основе рапсового масла. Строятся новые заводы с большой и малой мощностью (от более 100 тыс. тонн биодизеля в год каждый до 8–10 тыс. тонн/год). Биодизель из рапса в Германии, как правило, используется в чистом виде (марка B100).

Франция. Франция — один из лидеров ЕС по производству биодизеля (равно как и биотэтанола). С 1992 г. в ней было установлено 100% освобождение от налогов на производство биодизеля как пилотного проекта. Однако Еврокомиссия впоследствии эти льготы запретила и установила квоты. В перспективе во Франции запланирован выход к 2010 г. на уровень 7% биотоплива (биодизель + биотэтанола).

Во Франции работают 5 заводов по производству биодизеля (один из них расположен на территории Германии). Планируется к концу 2007 года построить еще 4 завода мощностью 200 тыс. тонн в год каждый. До 2002 г. ЕС разрешал Франции производить только 317,5 тыс. тонн, а с 2003 г. квота была поднята до 387,5 тыс. тонн.

Италия. Производство биотоплива в Италии началось в 1991 г. В 1999 г. вышла Белая книга Италии по возобновляемым источникам энергии, в которой регламентируется использование биодизеля для целей теплоснабжения и для общественного транспорта. Италия входит в число 4 стран, которым определены уровни производства биодизеля (квоты).

Италия находится на 3-м месте в Европе по производству биодизеля. 70% сырья составляют семена рапса, поставляемые из Германии и Франции. Из местного сырья (главным образом, подсолнечник) производят 60 тыс. тонн биодизеля в год.

Испания. В Испании биотопливо производится на коммерческой основе. Тем не менее существуют преференции в рамках существующих общегосударственных

законов и Королевских декретов, которые позволяют стимулировать производство биодизеля. Объемы производства биодизеля сравнительно высоки и имеют тенденцию к росту.

Австрия. В Австрии установлены налоговые льготы на биодизельное топливо в следующем размере:

- при использовании биодизеля в чистом виде — 100%;
- при содержании ископаемого топлива до 5% налоговая льгота применяется ко всей биотопливной составляющей;
- при содержании минерального топлива более 5% налоговых вычетов нет.

Швеция. В Швеции биотопливо освобождено от налогов на энергию, экологических налогов и сборов. Кроме прямых налоговых льгот, производство биотоплива поддерживается через косвенные механизмы — так называемых «зеленых налогов».

В других странах ЕС (Великобритания, Дания, Голландия, Бельгия, Финляндия, Греция, Ирландия, Чехия) действуют сходные механизмы поддержки и стимулирования производства биотоплива.

США

США в большей мере ориентированы на производство биоэтанола. Однако имеются достаточные промышленные мощности для производства биодизеля (в основном из сои). В 2006 году было произведено 2200 млн. литров биодизеля (для сравнения: в 2004 г. — 94,5 млн. л.; в 2005 г. — 283,5 млн. л.). В конце 2006 г. в США работали 88 заводов по производству биотоплива. В США функционирует система реутилизации отработанных растительных и животных масел с налоговыми льготами. Эффективно действуют федеральные законы последних лет (Закон о сельском хозяйстве, 2002, и др.). В отдельных штатах есть собственные программы по биодизелю. Так, например, в Миннесоте ставится задача достижения 2% содержания биодизеля в дизельном топливе.

Канада

На территории Канады наилучшим компонентом для добавок в дизельное топливо является масло канолы — генномодифицированного рапса с низким содержанием кислот. В 2005/2006 гг. канадские фермеры и аграрные компании вырастили 9,7 млн. тонн канолы. Это — огромная цифра. Подсчитано, что для производства 2%-ной добавки биодизеля в дизельное минеральное топливо потребуется 1,25 млн. тонн канолы. Канада поставила перед собой задачу к 2010 году добиться производства 500 млн. литров биодизеля. В более от-

даленной перспективе — к 2015 году — намечается на территории Канады увеличить долю биодизеля до 5% от общего объема использованного дизельного топлива.

Бразилия

Несмотря на то, что еще с 70-х годов XIX века, во время Первого ближневосточного нефтяного кризиса, Бразилия ориентировалась на биоэтанол как альтернативу ископаемому моторному топливу и стала крупнейшим его производителем в мире (в 2005 году производила около 16,5 млрд. литров в год и экспортировала около 2 млрд. литров в год), тем не менее она имеет собственную программу производства биодизеля. Такая специальная программа «Prodiesel program» была принята в 2002 году. В качестве сырья планируется соя. Будут реализовываться направления как по чистому биодизелю, так и по смеси нефтяного топлива и биодизеля. Приняты законы, предписывающие к концу 2007 года использовать биодизель в пропорции 2% (из расчета производства около 800 млн. литров в год), а в 2020 году выйти на соотношение 20% (годовой объем производства 12 млрд. литров).

Аргентина

В Аргентине законодательно определено, что к 2010 г. обязательна 5%-ная добавка биотоплива к бензину и минеральному дизельному топливу. В развитие этого в конце 2007 г. вступит в строй завод, который будет производить около 120 тыс. тонн биодизеля в год. Здесь же планируется осуществлять смешивание нефтяного топлива и биодизеля в пропорции 5% (марка B5). В будущем намечается переход на марку B10 с 10%-ным содержанием биодизеля.

Индия

Ближайшие планы Индии — выйти на 5% этанола в ряде штатов, позднее — во всей стране. В долгосрочной перспективе в 2030 году запланировано производить ежегодно 60 млн. тонн.

Китай

В Китае в 2000 г. принята национальная программа производства и применения биоэтанола. Строятся заводы с объемом производства 800 тыс. тонн биоэтанола в год.

В остальных странах Юго-Восточной Азии стандарты и сроки внедрения биотоплива следующие: Япония — с марта 2007 года в ней разрешено 5% содержание биодизеля в дизельном автомобильном топливе; Южная Корея — 0,5% биодизеля от общего потребления биотоплива с 2006 года, 5% — с 2008 г года; Индонезия — 10% биотоплива (этанол + биодизель) к 2010 году; Малайзия — 20% биодизеля от общего потребления дизельного топлива; Филиппины

— 1% биодизеля в автомобильном топливе с 2007 года, 2% — с 2008 года.

Австралия

Австралия планирует выпуск 350 млн. тонн биотоплива (этанол + биодизель) к 2010 году.

Интересно рассмотреть потенциал и деятельность стран СНГ в отношении биотоплива.

Украина

Украина и Беларусь по понятным причинам (кризисы в энергоснабжении) раньше Российской Федерации осознали актуальность производства и использования биотоплива. В Украине пока нет государственного субсидирования и не выработана законодательная поддержка данного направления, как это делается в других странах. Производство биоэтанола в Украине было организовано в 1998 году на предприятиях госконцерна «Укрспирт». В 1998—2006 гг. было произведено более 50 тыс. тонн биоэтанола. Есть оценки, согласно которым мини-заводы или исследовательские установки по производству биодизеля в Украине в 2006 году работали в 12 областях и произвели 20 тыс. тонн продукции. Известно также, что в рамках частного бизнеса уже проведена довольно значительная работа. Так, в 2007 году в Одесской области компанией «Биодизель Бессарабии» был открыт мини-завод по производству биодизеля мощностью 7 тыс. тонн в год. В феврале 2007 года в Херсонской области был введен в эксплуатацию завод, производящий в год до 10 тыс. тонн биодизеля. Компания «Ориана-Галел» в г. Калуш построила крупнейший на Украине завод по производству биодизеля мощностью 180 тыс. тонн в год (выход на рабочий режим в 2007 году).

Беларусь

В Республике Беларусь в целом правильно оценивается жизненная необходимость развития производства альтернативного биотоплива. Однако до сих пор нет широкого развертывания работ в этом направлении, особенно в плане государственных законодательных и административных гарантий. Свою роль здесь играет и конкуренция со стороны нефтяных компаний. Хотя отдельные мини-производства биодизеля вступают в строй. Так, например, в Новоельне Гродненской области начала функционировать установка на основе масла из семян рапса мощностью 10 тыс. тонн биодизеля в год.

Анализ ситуации в России

Следует констатировать, что в России пока проблема альтернативного топлива не получила должной оценки. Здесь имеются объективные и субъективные причины.

Высокие цены на нефть не стимулируют естественные монополии вкладывать средства на опережение. Представители малого и среднего бизнеса также не проявляют должного интереса к топливу из возобновляемого сырья. Тем не менее проблема существует и ее нужно решать.

Надо отметить, что в отношении вопросов, связанных с биоэтанолом и биогазом, имеется определенная активность среди российских госструктур и бизнеса. Однако проблема биодизеля все еще остается вне поля зрения.

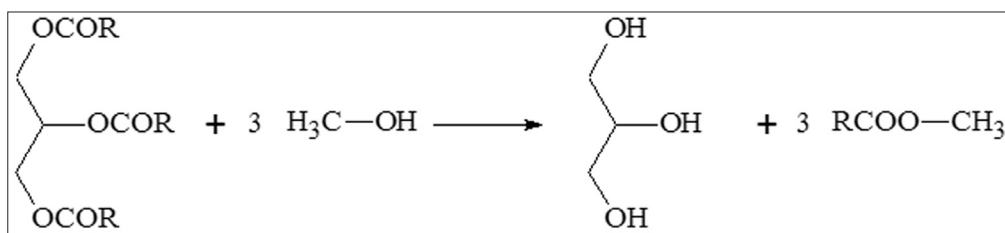
Безусловно, Россия так же, как и страны с небольшими запасами энергоресурсов, в ближайшие 10–15 лет столкнется с проблемой расширения мощностей по производству экологически чистого топлива с целью экономии минерального топлива и снижения выброса в атмосферу вредных газов.

В Российской Федерации пока не существует единой государственной программы развития биотоплива, в том числе биодизеля. Правда, в некоторых регионах проявляется инициатива: создаются региональные программы (Алтайский край), формируется общественные

объединения на федеральном и территориальном уровнях. Важную координирующую роль в последние годы стала играть Российская биотопливная ассоциация, проводящая конгрессы, выставки, информационную работу. В ряде областей планируется строительство заводов по производству биодизеля: Липецкая, Ростовская, Волгоградская, Воронежская, Орловская, Калужская, Омская, Кемеровская области, Республика Татарстан, Краснодарский край и др.

Сущность технологии производства биодизеля. Основные характеристики

Технология производства биодизеля сводится к следующему. Растительное масло (рапсовое, подсолнечное, соевое и др.) переэтерифицируется метанолом, реже — или этанолом, или изопропиловым спиртом при температуре 60 °С и нормальном давлении. На 1 т масла требуется 100 кг метанола с добавлением гидоксида калия или натрия. Реакция выглядит так:



Типовая схема производства биодизеля представлена на рисунке 1.

Здесь главные блоки: приготовление масла, очистка масла, приготовление катализатора, переэтерификация, очистка и стабилизация, отгонка метанола, складирование готового продукта.

Следует отметить, что биодизель как продукт не рекомендуется хранить более 3 месяцев — он разлагается.

Обладая примерно одинаковым с минеральным дизельным топливом энергетическим потенциалом, биодизель имеет ряд существенных преимуществ:

- он нетоксичен, практически не содержит серы и канцерогенного бензола;
- разлагается в естественных условиях и при этом биологически безвреден;
- обеспечивает значительное снижение вредных выбросов в атмосферу при сжигании, как в двигателях внутреннего сгорания, так и в технологических агрегатах;

- увеличивает цетановое число топлива и его смазывающую способность, что существенно увеличивает ресурс двигателя;
- имеет высокую температуру воспламенения (более 100 °С), что делает его использование относительно безопасным;
- для его производства используется возобновляемое сырье;
- производство биодизеля легко организовать, в том числе в условиях небольшого фермерского хозяйства, при этом используется недорогое оборудование;
- специалисты по моторной технике считают биодизель лучшим топливом для моторов с самовоспламенением.

Показатели эмиссии отработавших газов биодизеля:

- сокращение выброса CO₂ почти на 100%;
- сокращение выброса CO на 10–50%;

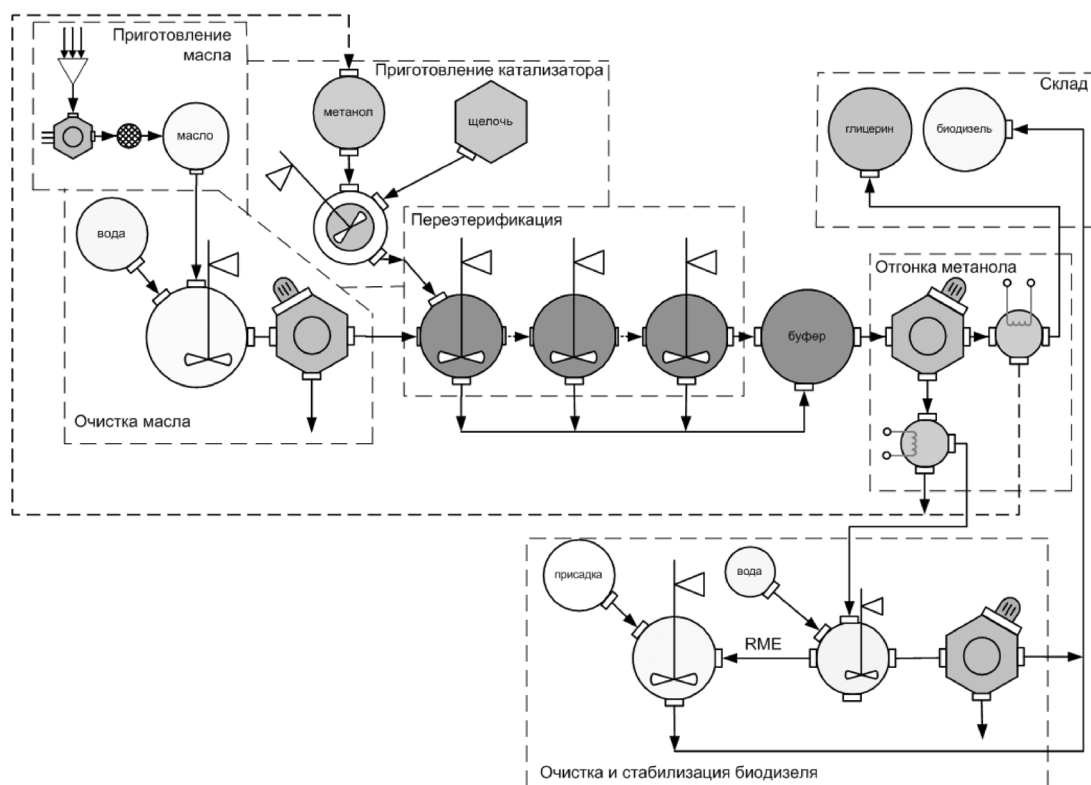


Рис. 1. Схема производства биодизеля

- сокращение выброса SO_2 почти на 100%;
- сокращение выброса оксидов азота на 5–10% (в зависимости от возраста транспортного средства и настройки мотора);
- сокращение выброса сажи на 40–60%;
- сокращение выброса несгоревших углеводородов на 10–50%;
- сокращение выброса всех полициклических ароматических углеводородов;
- замена запаха выхлопного газа, типичного для нефтяного дизельного топлива, на приятный вкусовой запах.

Стоимость биодизеля в настоящее время не превышает стоимости «нефтяного» дизельного топлива и имеет тенденцию к снижению по отношению к последнему.

Качество биодизеля регламентируется нормативными документами. В Европе это EN14214 (разработан для биодизеля на основе рапсового масла), в США – ASTM D-6751 (разработан для биодизеля на основе соевого масла).

В Российской Федерации собственные стандарты для биодизеля отсутствуют. Утвержден ГОСТ на использование 5% биодобавки в моторное топливо.

Концепция развития производства биодизеля в России

Россия, обладающая огромными сырьевыми, кадровыми, научно-техническими и иными ресурсами, имеет реальные шансы для успешного развертывания широкомасштабного производства биодизеля, отвечающего современным экономическим возможностям государства.

В разработанной Обществом биотехнологов России Национальной программе «Развитие биотехнологии в Российской Федерации на 2006–2015 гг.» имеется специальный проект по биотопливу. В нем ставится типовая задача осуществления комплексных работ по созданию на отдельной территории полной технологической цепи от производства сырья (рапс) до получения конечной товарной продукции (биодизель) с утилизацией побочных продуктов (корма, строительные материалы и др.).

К настоящему времени типовой проект «Организация производства альтернативного моторного топлива на основе растительных масел» (проект «Биодизель») находится в технико-экономической проработке в ряде регионов РФ (Калужская, Тюменская области).

Пока за основу берутся семена рапса (для него наиболее оптимальны условия выращивания в южных и

средних широтах РФ), однако очень перспективно для Российской Федерации использование водорослей в нативном состоянии и аквакультурах. Сейчас этот вопрос изучается в рамках направления «Морская биотехнология» Национальной программы.

Развертывание производства биодизеля в нашей стране, несмотря на отсутствие гарантированного собственного рынка этого продукта, все равно актуально и работает на перспективу. По крайней мере, в настоящее время можно ограничиться только циклом производства и поставки рапсового масла на такие стабильные рынки, как Германия, где биодизель стал базовым моторным топливом. В дальнейшем станет возможным реализация полного цикла, вплоть до создания смесей моторного топлива. К этому времени созреют и все необходимые правовые документы, регулирующие применение биотоплива в России.

Интересные цифры существуют в отношении экономической эффективности замены минерального дизельного топлива на экологически чистое биодизельное топливо. Только в АПК России используется свыше 5 млн. тонн дизельного топлива, на приобретение которого ежегодно тратится 74,4 млрд. рублей. При сокращении использования нефтяного дизельного топлива за счет биодизеля на 30% ежегодный экономический эффект составит около 12,4 млрд. рублей (при себестоимости получения рапсового масла 6 руб. за 1 литр). С учетом продажи биодизеля не только для тракторной техники, но и для автомобилей эта сумма существенно увеличится. Расчеты коммерческой эффективности применения обычного смешанного топлива (75% биодизеля и 25% дизельного топлива) в фермерском хозяйстве с парком тракторов 50 единиц показывают, что срок окупаемости капиталовложений на адаптацию тракторов к работе на биотопливе составляет 3 месяца, а чистый дисконтированный доход за 8 лет составит 2,23 млн. рублей. Себестоимость рапсового масла в различных регионах России находится в пределах от 3 до 7 рублей за 1 кг.

Перспективным представляется и направление, связанное с использованием возобновляемых видов топлива в дизелях на железной дороге или на водном транспорте. Международные нормы и стандарты требуют улучшения экологических показателей тепловозов, и здесь биодизель сможет решить проблему. Есть предложения по применению биодизеля из рапсового масла в дизельных двигателях блочных теплоэлектростанций.

В целом нужно подчеркнуть, что в России в настоящее время отмечается всплеск внимания и активности бизнесструктур в отношении развития биотоплива. Со временем процесс будет нарастать и вместе с государственными решениями обязательно даст положительный эффект.

Литература

1. Директива Европейского парламента и Совета 2003/30/ЕС от 8 июня 2003 г.
2. Производство и применение биодизеля: справочное пособие / А.Р. Аблаев и др. — М.: АПК и ППРО, 2006. — 80 с.
3. Рапс — культура XXI века: аспекты использования на продовольственные, кормовые и энергетические цели / Сборник научных докладов на Международной научно-практической конференции 15–16 июля 2005 г. — Липецк, 2005.
4. Семенов В.Г. Определение теплоты сгорания биотоплив растительного происхождения / Физические и компьютерные технологии в народном хозяйстве. Труды 4-й Международной научно-технической конференции, 23–24 октября 2001 г. — Харьков: ХНПК «ФЭД», 2001.
5. Смирнова Т.Н., Подгаецкий В.М. Биодизель — альтернативное топливо для дизелей. Получение. Характеристики. Применение. Стоимость // Двигатель. — 2007. — № 2 (50).
6. 21st Century Biodiesel Fuel. Business Management for Producers and Handling and Use Guidelines — Series on Renewable Energy, Biofuels, Bioenergy, and Biobased Products (Ringbound) (Ring-bound). — Progressive Management, 2005. — 202 p.
7. Ali Y., and Hanna M.A. Alternative diesel fuels from vegetable oils // Bioresource Technology. — 1994. — Vol. 50.
8. Biodiesel: making and selling the fuel of the future-business management for producers and producers and biofuel basics (book and CD-ROM set) (Ring-bound). — Progressive Management, 2006. — 202 p.
9. Canakci M., and Van Gerpen J. Biodiesel production from oils and fats with high free fatty acids // Transactions of the ASAE. — 2001. — Vol. 44. — p. 1429–1436.
10. Carter D. M., Halle J. How to Make Biodiesel. — Low-Impact Living Initiative, 2005. — 124 p.
11. Clements L.D. Blending rules for formulating biodiesel fuel / Liquid Fuels and Industrial Products from renewable resources. Proc. of the Third Liquid Fuels Conference. Nashville, Tenn., Sept., 1996.
12. Danini M. Producing biodiesel a simple affair? A practical guide to read before building your plant. — Damalist n.v., Ghent, Belgium, 2003.
13. Grabovski M.S., and Van Gerpen J. Combustion of fat and vegetable oil derived fuels in diesel engines // Progress in Energy Combustion Sciences. — 1998. — Vol. 24. — p. 125–164.
14. Kemp W.H. A Comprehensive Guide to Production and Use for the Home and Farm. — Aztext Press, 2006. — 588 p.
15. Knothe G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters // Fuel Processing Technology. — 2005. — Vol. 86. — p. 1059–1070.

16. *Knothe G., Van Gerpen J.* The biodiesel handbook. – AOCS Publishing, 2005. – 302 p.
17. *Lee I., Johnson L.A., and Hammond E.G.* Reducing the crystallization temperature of biodiesel by winterizing methyl soyate // J. of the American Oil Chemists Society. – 1996. – Vol. 73. – N 5.
18. *Ma F., and Hanna M.A.* Biodiesel production: a review // Bioresource Technology. – 1999. – Vol. 70. – P. 1–15.
19. *Marchenko A.P., Semenov V.G.* Alternative biofuel from rape oil derivative // Chemistry and Technology of Fuels and Oils. – 2001. – Vol. 37. – N 3.
20. *Pahl G.* Biodiesel. Growing a New Energy Economy. – Chelsea Green Publishing. – 2004. – 224 p.
21. *Tickel J.* From the fryer to the fuel tank. – New Orleans, USA, 2003.
22. *Tyson K.S., McCornick R.L.* 2006 Biodiesel handling and use guide. 3rd ed. – U.S. Dept. of Energy, 2006. – 69 p.
23. *Van Gerpen J.H., Pruszko R., Clements D. et al.* Building a successful biodiesel business: Technology, considerations, developing the business, analytical methodologies. 2nd ed. – Biodiesel Basics, 2006. – 277 p.

Интернет-источники:

- <http://www.biodiesel.org>
- <http://www.tvwiki.tv/wiki/Biodiesel>
- <http://ru.wikipedia.org/wiki>
- <http://www.biotoplivo.ru>
- <http://www.biodiesel.co.uk/levington.htm>
- <http://www.bioethanol.ru/biodiesel/news>
- <http://www.biodiesel.com.ua>
- <http://www.bdpedia.com> – Biodiesel www Enciklopedia
- <http://www.ebb-eu.org/>
- <http://www.nbb.org>

ДОКАЗАТЕЛЬСТВО БЕСКЛЕТОЧНОГО БРОЖЕНИЯ – ТРИУМФ ЕСТЕСТВОЗНАНИЯ XIX ВЕКА: К 100-ЛЕТИЮ ПРИСУЖДЕНИЯ НОБЕЛЕВСКОЙ ПРЕМИИ ЭДУАРДУ БУХНЕРУ И 110-ЛЕТИЮ ЕГО ОТКРЫТИЯ

В.С. ВОРОБЬЕВ*, О.В. ВОРОБЬЕВА

Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, Москва



В 2007 году исполняется 100 лет со дня присуждения в 1907 г. Нобелевской премии по химии немецкому исследователю Эдуарду Бухнеру, сделавшему за 10 лет до этого потрясшее весь научный мир открытие — доказательство возможности бесклеточного брожения. Своей работой он подвел итог почти столетней дискуссии о жизненной силе, в которой принимали участие наиболее выдающиеся умы XIX столетия (Берцелиус, Либих, Велер, Бертелло, Пастер, Клод Бернар и др.). Самое парадоксальное в этом открытии — оно не планировалось и стало неожиданным. Но от этого его значение нисколько не приуменьшается.

* **Автор для переписки:**

© 2007 г. Воробьев Вадим Сергеевич,
к.м.н., член Центрального Правления ОБР
119296 Москва, Университетский пр-т, 9
E-mail: obr@biorosinfo.ru

Историческая оценка открытия Э. Бухнера осуществлена и общеизвестна, однако юбилейная дата обязывает научное сообщество обратиться вновь к событиям тех лет и еще раз вспомнить о делах и личности знаменитого ученого.

Curriculum vitae

Эдуард Бухнер родился в 1860 г., а умер в 1917 г. — так что в 2007 году отмечается еще одна его круглая дата — 90-летие со дня смерти.

Известные факты его жизни сравнительно немногочисленны и отражены в кратких биографических сводках и в нобелевских документах, преимущественно на английском языке [7, 8, 23]. Невелик и объем сведений о нем на русском языке [1, 2, 4, 5]. Правда, имеются отдельные работы с достаточно полной информацией [14, 15, 16, 17, 19]. До сих пор нет подробной биографии ученого, причем даже в Германии. Однако недавно появилось очень серьезное, обстоятельное диссертационное исследование на немецком языке, в котором этот пробел был устранен [24], и поэтому у исследователей творчества Э. Бухнера открылась возможность знакомиться с более многочисленными фактами его жизни, подтвержденными первичными архивными материалами.

Он — сын профессора судебной медицины и гинекологии Мюнхенского университета Эрнста Бухнера (1812–1872). Дед, кстати, также был врачом. Профессор Эрнст Бухнер, помимо работы на кафедре, являлся организатором и редактором журнала «Мюнхенский медицинский еженедельник». Эдуард родился от третьего брака Эрнста Бухнера с Фридерикой Бухнер, урожденной Мартин, дочерью кассира Королевского казначейства. 10 годами раньше родился брат Ганс (1850–1902), сыгравший впоследствии огромную роль в судьбе Эдуарда (брат стал известным бактериологом, занявшим в 90-е годы XIX века кафедру Петтенкоффера).

Казалось бы, профессорская семья гарантировала молодого Бухнера от превратностей судьбы и готовила к спокойной карьере ученого. На деле все оказалось не так, и он прошел сложный путь от службы в армии солдатом и работы на консервной фабрике до профессорства и всемирной славы.

Ранняя смерть отца в 1872 г. создала материальные трудности в семье. Опекать старшего брата Ганса, конечно, выручала на всех этапах жизни Эдуарда, но до определенных пределов. По окончании Мюнхенской реальной гимназии в 1877 г. Э. Бухнер прослужил год вольноопределяющимся в полку полевой артиллерии «Принц Леопольд». После этого он поступил в химическую лабораторию Высшей политехнической школы (ныне — Технический университет) Мюнхена, где начал осваивать основы химии под руководством Э. Эрленмейера. Однако по материальным причинам он был вынужден покинуть лабораторию и устроиться рабочим на консервную фабрику в Мюнхене, которая позже была переведена в Момбах (близ Майнца). Здесь он прошел поучительный курс практической химии, в том числе непосредственно ознакомился с бродильным производством, что пригодилось ему в будущем при научных исследованиях брожения. Кроме того, Бухнер с зимнего семестра 1877/1878 гг. по зимний семестр 1882/1883 гг. числился в списках студентов Людвиг-Максимилиан Университета Мюнхена [24].

Перипетии его личной жизни и служебных занятий тесно связаны с научной карьерой. Обычно немецкие профессора трудились в одном-двух университетах практически всю жизнь — таких примеров много. В случае Бухнера мы имеем исключение — он работал во многих городах.

В 1884 г. Э. Бухнер вернулся к научной работе, поступив в Мюнхенский университет, в лабораторию Адольфа фон Байера — одного из знаменитейших имен в химии, будущего лауреата Нобелевской премии. Одновременно он трудился в Институте физиологии растений под руководством известного ботаника Карла Негели. Следует обязательно упомянуть, что в этом же институте работал ассистентом его брат Ганс, который с 1880 г. состоял приват-доцентом на медицинском факультете. Именно здесь под руководством брата Эдуард Бухнер выполнил и напечатал 1885 г. свою первую научную работу «О влиянии кислорода на брожение» [9]. Есть в этом какой-то знак, предопределяющий его грядущий феноменальный успех в 1897 году. Не будет излишним кратко проанализировать содержание этой статьи.

Э. Бухнер работал с делящимися грибами *Schizomyces* и показал, что брожение может происходить и в анаэробных (в согласии с теорией Пастера), и в аэробных условиях (что противоречило воззрениям французского ученого). Безусловно, нельзя отрицать при этом влияния К. Негели, выпустившего в 1879 г. книгу «Теория брожения» [22], в которой он придерживается химической теории брожения Либиха и соответственно возражает против вывода Пастера о том, что дрожжи бродят менее активно в присутствии кислорода, чем без него. Хотя Негели позднее занял более компромиссную позицию и ставил задачу поиска субстрата, разлагающего сахар в живой плазме дрожжевой клетки, чем стимулировал дальнейшие разработки в данном направлении. Э. Бухнер также критиковал экспериментальные подходы Пастера, однако на основании собственных опытов пришел к заключению, что брожение проходит более активно в отсутствие кислорода, что согласуется с точкой зрения Пастера. Так что эту статью Бухнера нельзя однозначно истолковывать как развенчивание неправоты французского ученого, как иногда делают биографы.

К этому же времени относится и другая основополагающая публикация Э. Бухнера, касающаяся проблем органической химии. Дело в том, что в эти годы Бухнер сблизился с Теодором Курциусом (1857—1928), пригласившим его на один семестр в Эрлангер. Там они выполнили и напечатали в 1885 г. работу с описанием оригинальной реакции, которой позже присвоят наименование «реакции Бухнера — Курциуса» [13]. Т. Курциус в целом оказал благотворное влияние на Бухнера как исследователя, особенно в плане тщательности экспериментирования. (О цикле работ Э. Бухнера по органической химии будет сказано ниже).

Таков был дебют в науке молодого ученого в 25 лет, из которых четыре с половиной года он проработал на консервной фабрике!

Дальше события развивались следующим образом. В 1888 году Э. Бухнер стал доктором наук, а в 1891 г. занял должность приват-доцента Мюнхенского университета.

В 1893 г. по приглашению Т. Курциуса он переехал в Кильский университет, в его лабораторию. В Киле Э. Бухнера удостоивают звания профессора в 1895 году.

В 1896 г. еще один друг и покровитель Э. Бухнера — Ганс фон Пехманн (1850—1902) пригласил его в свою химическую лабораторию занять вакантную должность экстраординарного профессора аналитической и фарма-

цветической химии в Университете Тюбингена. Здесь он пробыл до 1898 года.

В Тюбингенский период произошло знаменательное событие в научной жизни Бухнера — он выполнил и напечатал свою выдающуюся работу «Об алкогольном брожении без дрожжевых клеток» (она вышла в свет на немецком языке, сейчас в Интернете имеется перевод этой статьи на английский язык). Во время осенних каникул 1896 года он вновь занялся проблемой брожения. Возможности для работы ему предоставил брат на этот раз в Гигиеническом институте Мюнхена (он входил в состав Совета директоров, что сняло вопросы, связанные с материальным обеспечением исследования). В результате к январю 1897 года была подготовлена вышеуказанная работа с доказательством бесклеточного брожения и отослана для публикации в авторитетный журнал «*Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*» [11]. Это была вершина его деятельности, великое открытие, за которое он был удостоен Нобелевской премии спустя 10 лет. Подробнее о сути этого открытия будет изложено ниже.

В 1898 г. Э. Бухнера пригласили на кафедру общей химии в Берлинскую сельскохозяйственную школу, где он провел 11 лет, занимаясь чтением лекций по сельскохозяйственной химии и продолжая цикл исследований по бесклеточному брожению. С 1900 года он работал также в Берлинском университете.

В 1900 году в 40-летнем возрасте он женился на Лотте Шталь, дочери математика из Тюбингена. От этого брака родились два сына — Ганс, Рудольф и дочь — Фридель.

С 1909 по 1911 гг. Бухнер занимал кафедру в Бреслау (ныне — Вроцлав, Польша).

Последнюю в своей жизни кафедру он получил в 1911 году в Химическом институте Вюрцбурга. Отсюда в августе 1914 г., после начала Первой мировой войны 54-летний Бухнер добровольно ушел на фронт в чине капитана. В декабре этого же года он был награжден железным крестом 2-й степени, а в январе 1916 г. был возведен в ранг майора.

В 1916–1917 гг. он вернулся из действующей армии и продолжил научную и педагогическую деятельность в Вюрцбурге. В июне 1917 года он вновь прибыл на фронт, а 3 августа был смертельно ранен шрапнелью под Фокшанами (Румыния) и умер 13 августа.

Э. Бухнер был многогранной личностью. Хорошо знал изобразительное искусство, был страстным охотником и альпинистом (покорил около 100 вершин). Политический идеал Германии видел во взглядах Бис-

марка. В возрасте 40 лет перешел из католичества в протестантство.

Но биография его — это малая часть всей историко-научной проблемы. Главное — это предметная область, в которую вступил Э. Бухнер и достиг столь впечатляющих результатов. Это заслуживает особого рассмотрения в связи с юбилеем ученого.

Открытия Э. Бухнера

Научная деятельность Бухнера развивалась по двум направлениям: бесклеточное брожение и органическая химия (по обоим направлениям опубликовано примерно равное число работ).

Вначале надо рассмотреть тему брожения, которая прославила и обессмертила имя ученого. Выяснение сущности брожения является одним из драматических эпизодов в истории химии и биологии. Безусловно, центральным моментом здесь является противостояние выдающихся умов XIX столетия — французского гения Луи Пастера и немецкого — Юстуса Либиха.

Отправной точкой в разработке теории брожения следует считать открытие в 30-х годах XIX века строения дрожжевых клеток Б.Ц. Каньяр-Латургом, Т. Шванном и Ф. Кютцингом. Это послужило началом формирования виталистических взглядов на брожение. Далее идут исследования великих химиков Берцелиуса, Либиха и Велера, которые не приняли концепцию жизненной силы, а Либих и Велер в 1839 г. даже сочинили сатиру с иллюстрациями, в которой высмеяли роль микроорганизмов в процессе брожения. Наиболее последовательным ортодоксальным адептом химической теории брожения стал Либих, который рассматривал сбраживание сахара как химическую реакцию без участия живых организмов. К экспериментам в данном направлении подключились Э. Митчерлих, Г. Гельмгольц, Г. Шредер, которые были близки к виталистической позиции, но вопрос в целом не прояснялся.

В 50–60-е годы к разработке проблемы брожения приступил Луи Пастер, который в серии опытов показал, что брожение является физиологическим актом, непосредственно связанным с жизнедеятельностью дрожжей. Им же был провозглашен тезис, что брожение — это «жизнь без кислорода». Начались острые дискуссии между сторонниками Либиха и Пастера. К Либиху примкнул такой экстраординарный исследователь, как французский химик Марсель Бертло, открывший, кстати, что настой дрожжей содержит фермент инвертазу, превращающий сахар в глюкозу и фруктозу. Были в этом ряду и другие известные химики, например. Ф. Гоппе-Зейлер. Пастер сражался

практически в одиночку, но постепенно его авторитет в науке настолько вырос, что погасил пыл оппонентов. Одиночная публикация М.М. Манассеиной (1872) [20] на немецком языке о возможности брожения *in vitro* (которая привлекла внимание Либиха за год до его смерти, и он даже приглашал ее в свою лабораторию в Гессен) не делала погоды. Поэтому в 70–80-е годы число работ в защиту химической теории брожения уменьшилось. В этой связи небезынтересно упомянуть о беспрецедентной дискуссии о механизмах брожения живого Пастера с мертвым Клодом Бернаром.

Как известно, Клод Бернар умер в 1878 г. Он был добрым, мягким человеком, старше Пастера на 9 лет и поэтому опекал и покровительствовал ему. На заседаниях Академии в Париже они сидели рядом. Ничто не предвещало конфликта между ними. Правда, за несколько месяцев до смерти Клод Бернар говорил своим ученикам: «Пастеру придется туго... Пастер видел только одну сторону вопроса... Я получил спирт без клетки». Оказалось, что он тайно проводил опыты на винограде, но не напечатал результаты при жизни, по-видимому, не считая эксперименты завершенными. Часто любил в последние годы упоминать, что Бертоло открыл в дрожжевом настое фермент (инвертазу), разлагающий сахар на глюкозу (левулозу и декстрозу). Он видел здесь аналогию между настоем и пищеварительным каналом животных, где осуществляются ферментативные реакции, и чувствовал, что надо идти по пути изучения ферментов. Примеров в физиологии к этому времени было достаточно: диастаза — превращение крахмала в сахар, пепсин (пептаза) — переваривание белков.

Ученики Клода Бернара Д'Арсонваль и Поль Бер обнаружил рукопись статьи по данному вопросу и отдали редактору журнала «Научное обозрение» М. Бертоло. Тот, видя какой удар наносится его антиподу Пастеру, наверное, не без удовольствия напечатал статью. Она вышла в свет в 1878 г. [6].

Пастер в ответ устроил дискуссию в Академии наук. Было принято решение о проверочных опытах по брожению. Пастер выполнил контрольные эксперименты на винограде с брожением в условиях микробного заражения и без него и продемонстрировал результаты этих опытов на заседании Академии наук с доказательством своей правоты. На этом основании он опубликовал в 1879 г. книгу «Критический разбор посмертной статьи Клода Бернара о ферментации», где он на гроздьях винограда показал, что брожение возможно только в присутствии микробов (выращивал виноград под крышей и обертывал стерильной ватой на открытом воздухе и т.д.). Книга

перепечатана на русском языке в академическом двухтомнике избранных трудов Пастера (1960) [3].

Так кто же оказался прав? Ни тот, ни другой не победил. Правы оба. Истина, как всегда, посередине. И первым их заочным арбитром стал через 20 лет Бухнер, который доказал бесклеточное брожение и предположил, что за это ответственен фермент «зимаза». А дальше ретроспективно судила спор французских гениев вся мощь химии XX века в лице энзимологии и ее завораживающих успехов в проникновении в тайны жизни. Здесь с высоты нашего времени сияют имена Отто Мейергофа, Артура Гардена, Ганса Эйлер-Хелпина, Джона Нортропа, Джеймса Самнера, Карла и Гerti Кори, Северо Очоа, Артура Корнберга, Пола Берга и др. Так что прав Клод Бернар, потому что возможно брожение под действием чистых ферментов, прав и Пастер, потому что эти ферменты являются продуктами жизнедеятельности микроорганизмов. Ныне доказано, что фермент глюкокиназа начинает разлагать глюкозу до спирта и далее действуют еще 9 ферментов (а не микроорганизмы как таковые — Пастер это впервые показал в 1857 г.).

Когда Э. Бухнер приступил к работе по брожению, споры поутихли. Главным образом, по причине ухода со сцены лидеров: Либих умер в 1873 г., Пастер в 70–80-е годы переключился на сибирскую язву и бешенство, перенес два инсульта, а в 1895 году умер. Да и Э. Бухнер не собирался делать каких-то революций в науке. Он просто помогал своему любимому брату найти надежный способ консервации белковых веществ, экстрагируемых из бактерий. Ганс Бухнер в 1890 г. сумел получить такие экстракты, которые, будучи введенными под кожу животным, вызывали воспалительный процесс, тем не менее служили защитой против инфекций (по аналогии с туберкулином Коха). Встала задача поиска способов сохранения микробных клеточных экстрактов. В качестве удобного средства был предложен сок пивных дрожжей. За это взялся Эдуард Бухнер в период работы в Мюнхенском гигиеническом институте, и вскоре был тщательно разработан метод получения стерильного бесклеточного дрожжевого сока. Теперь нужно было найти надежный способ сохранения сока от загнивания. Опять же по предложению Ганса Бухнера было решено попробовать обычную сахарную консервацию. Э. Бухнер в первых же экспериментах обнаружил признаки брожения в бесклеточной смеси. Авторы поняли глубокую сущность своей находки, и результаты сразу же были опубликованы [11].

Опыт Бухнера крайне прост. 1000 г сухих пивных дрожжей тщательно перемешиваются с равным количес-

твом кварцевого песка и 250 г кизельгура (диатомовой земли). Затем смесь измельчается пестиком в ступке до получения консистенции влажной пасты. После этого к смеси добавляют 100 г воды, обортывают ее фильтром и помещают под гидравлический пресс 400–500 атмосфер — прессование проводят градульно (рис. 1).

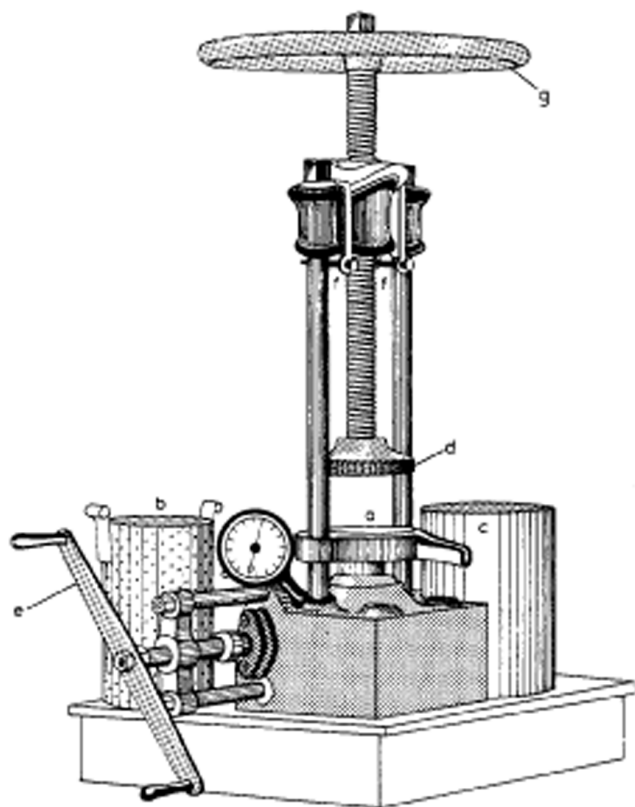


Рис. 1. Гидравлический пресс, которым пользовался Э. Бухнер

Выход прессованного сока — 350 г. Оставшийся жмых снова измельчают и подвергают повторной процедуре прессования. Вторая порция прессованного сока — 150 г. Таким образом, из 1 кг дрожжей получается 500 мл выжатого сока. При последующем микроскопическом контроле в нем не содержится интактных дрожжевых клеток, а лишь их разрушенные остатки. Вот первое главное достижение Бухнера в отличие от предшественников. Им не удавалось разрушить клетки натуральным способом, не прибегая к химическим и иным вредящим методам. Для исторической достоверности следует указать на то, что использовать гидравлический пресс и диатомит предложил профессор Мартин Ган, ассистент Ганса Бухнера.

Второе знаковое событие в этом открытии века — это обнаружение способности выжатого сока сбраживать углеводы. При добавлении к соку небольшого

объема концентрированного раствора тростникового сахара начиналось постоянное выделение углекислого газа через 15–60 минут, которое продолжалось в течение нескольких дней. Такая же картина наблюдалась при добавлении к соку глюкозы, фруктозы или мальтозы. Однако брожение не отмечалось при добавлении к соку насыщенных растворов лактозы или маннитола (известно, что эти вещества не подвергаются брожению и живыми пивными дрожжевыми клетками). А ведь исходная цель, которая ставилась перед Бухнером, — это было оценить консервирующий эффект сахара на свежесжатый сок пивных дрожжей. Это пример того, как утилитарная задача нередко ведет к раскрытию сложных фундаментальных основ окружающего мира.

И, наконец, важно и то, что уже в первой статье о бесклеточном брожении Бухнер ставит вопрос о причинном факторе — ферментативной активности выжатого сока дрожжей. Он предполагает, что этот фермент может быть растворимым веществом белковой природы. Было дано ему и соответствующее название — «зимаза».

На протяжении последующих 10–15 лет он продолжил эксперименты по воспроизводству брожения различных сахаров в отсутствие живого организма с помощью зимазы на примере дрожжей. Дальше была установлена возможность молочнокислого и уксуснокислого брожения с помощью выделенных из бактериальных клеток «молочнокислой бактериальной зимазы» и «спиртоксиляющего энзима». Из соавторов публикаций Бухнера тех лет наиболее часты Р. Рапп и особенно Я. Мейзенхеймер. Среди журнальных статей выделяется обобщающая книга о механизмах брожения 1903 года трех авторов — братьев Бухнеров и Мартина Гана [12]. Книга была и данью памяти рано умершему в 52-летнем возрасте его брату Гансу (он скончался в 1902 г.).

Конечно, первая публикация Э. Бухнера 1897 г. о бесклеточном брожении вызвала огромный интерес у современников. Вначале были возражения и непонимание. Чаще всего придирались к методическим подходам. Была и «идеологическая» критика, особенно со стороны неовиталистов, — ведь Бухнер не оставлял им места в общебиологических теориях. Однако стойкость и уверенность Бухнера в добротности своих фактов сделали свое дело, равно как и растущее понимание в профессиональной среде. Всем стал понятен рубеж, который был преодолен человечеством раскрытием столь долго укрывавшейся тайны химических реакций одного из важнейших жизненных процессов — брожения.

Нельзя в мемориальной статье обойти вопрос о приоритете открытия бесклеточного брожения. О

нем все-таки заявила наша соотечественница Мария Михайловна Манассейна (урожденная Коркунова) (1843–1903), дочь русского археолога, члена Санкт-Петербургской академии наук М.А. Коркунова и жена профессора Военно-медицинской академии В.А. Манассейна. Она стажировалась в 1871–1872 гг. в Политехническом институте в Вене у профессора Ю. Вайснера и провела там серию опытов, в которых показала образование спирта в суспензии убитых дрожжевых клеток, то есть тем самым отстаивала химическую теорию брожения Либиха. Результаты ее исследований были напечатаны в одной работе на русском языке в 1871 г., в другой — на немецком языке в 1872 г. [20]. Впоследствии она занялась проблемой сна у И.Р. Тарханова и опубликовала в 1889 г. классическую книгу в данной области «Сон как треть жизни человека». М.М. Манассейна, ознакомившись с публикациями Э. Бухнера о внеклеточном брожении, послала в ряд европейских журналов письма на немецком языке с указанием на свой приоритет (в том числе и в журнал «Доклады Германского химического общества», где была напечатана статья Бухнера [21]). Эффекта это не имело. За 4 года до получения Нобелевской премии Бухнером она умерла, поэтому претензий к Нобелевскому комитету быть не может. Однако исторические факты таковы, и они должны быть известны специалистам.

Надо отдать должное Нобелевскому комитету — он по достоинству оценил открытие Бухнера, выделив его среди множества не менее значимых научных достижений. В связи с Нобелевской эпопеей следует отметить, что Э. Бухнер попал в первую десятку награжденных по химии, причем, седьмым, вслед за Я.Х. Вант-Гоффом, Э. Фишером, С. А. Аррениусом, У. Рамзаем, А. фон Байером, А. Муассаном, но опередив такие величины, как Э. Резерфорд и В. Оствальд.

Но даже это не столько поражает, сколько результаты голосования Нобелевского комитета в 1906 году. Вот эти цифры. Непрошедшие кандидаты получили следующие голоса: по 4 голоса — В. Нернст и В. Оствальд, по 3 — С. Канниццаро и Т. Курциус, по 2 — А. Ле Шателье, Э. Резерфорд, О. Валлах, А. Вернер, Д.И. Менделеев, П. Сабатье, М. Бергло, Дж. Чиамичян, по 1 — остальные претенденты [24]. Такой расклад должен убедить историков науки, что современники уже тогда поняли революционное значение открытия Бухнера.

Конечно, здесь, возможно, сыграл роль и тот факт, что великий шведский химик Берцелиус также стоял у истоков формирования взглядов на сущность брожения, предложив свою контактную (каталитическую) теорию.

Тем более, что опыты Бухнера в значительной мере усиливали позиции сторонников химической теории брожения.

Презентационная речь президента Шведской Королевской академии наук графа К.А.Х. Мернера не была произнесена 10 декабря 1907 г. в связи с трауром по причине смерти накануне (за 2 дня до этого) шведского короля Оскара II. Однако эта речь была представлена в письменном виде и хранится как обязательный нобелевский документ [8]. В ней, в частности, говорится: «Легко понять, что произошла большая сенсация, когда Э. Бухнер после многих лет работы сумел показать, что алкогольное брожение может вызываться соком, полученным из дрожжевых клеток, свободным от живых клеточных элементов. Он однозначно продемонстрировал, что это брожение обусловлено ферментом, продуцируемым дрожжевыми клетками, из которых он выделен. Брожение не является прямым выражением жизни дрожжевых клеток: клетки убиты и разрушены, а фермент остается».

Нобелевская речь Эдуарда Бухнера является образцом истинного почтения первооткрывателя к своим предшественникам. Это в принципе характеризует многих Нобелевских лауреатов, но ведь Бухнеру пришлось перечислять весь цвет химии, биологии и вообще естествознания XIX века. При этом он в историческом плане упоминает преемственный вклад всех участников процесса накопления фактов, давая соответствующие оценки.

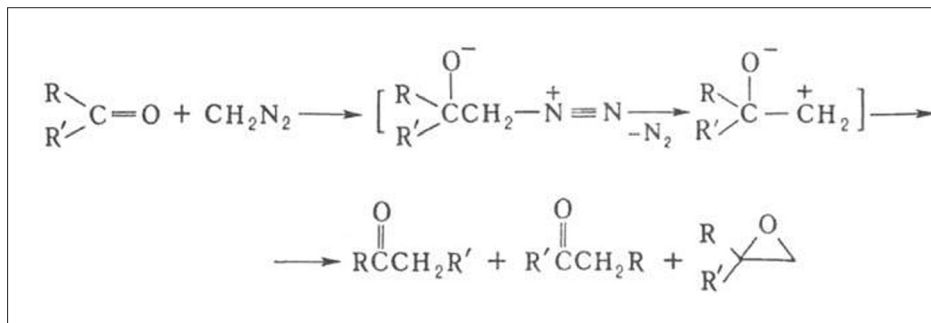
Следует обратить внимание на высказывание Э. Бухнера в Нобелевской речи: «Мы все более убеждаемся, что клетки растений и животных подобны химическим фабрикам, где в разных цехах производятся разные продукты. Энзимы в них выполняют роль контролеров. Наши знания об этих важных частях живых веществ постоянно увеличиваются, И хотя, возможно, нам еще далеко до цели, мы шаг за шагом приближаемся к ней» [7].

Надо сказать, что на родине еще до присуждения ему Нобелевской премии он был удостоен самой высшей награды, которая выдается химику, — медалью Либиха. Он был приглашен на работу в Берлин, где ему были предоставлены широкие возможности для научной деятельности. В 1904 г. он был избран председателем Немецкого химического общества. Позже его избрали членом-корреспондентом Академии наук Болоньи.

Очарование нобелевским успехом Бухнера практически вычеркнуло из истории его крупный вклад в органическую химию. Ведь половина его работ из 120 посвящена органической химии, он длительное время

трудился вместе с Адольфом фон Байером и другими выдающимися химиками-органиками. Ему принадлежат приоритетные работы по диазосоединениям, он первым в мире синтезировал пиразол в 1889 г. и т.д. [10]. Им же в 1885 г. в соавторстве открыта реакция Курциуса

— Бухнера — получение карбонильного соединения и замещенного оксирана взаимодействием альдегида или кетона с диазосоединением [13]. Иногда ее называют реакцией Бухнера — Курциуса — Шлоттербека (последний подробно изучил эту реакцию).



Но так уж устроена человеческая память: она запоминает самое яркое в той или иной личности или историческом событии. Тем не менее все исследователи жизни и творчества Эдуарда Бухнера должны помнить о его большом вкладе в органическую химию и заботиться о том, чтобы свет Нобелевской премии не затмевал огромное и не менее значимое, чем брожение, поле его деятельности.

И еще важный момент в заключение статьи — использование эпонимов в честь выдающихся ученых и первооткрывателей. В химии это чаще всего — устройства, увековечивающие память знаменитого отца химии Бунзена (штатив, горелка и т.д.). Попал в это мемориальное пространство и Эдуард Бухнер: многие говорят о «колбе Бухнера» и «воронке Бухнера». Между тем здесь речь идет о другом химике — Эрнсте Бюхнере, тоже представителе Германии, который предложил свою знаменитую фарфоровую воронку в 1888 г. Причины, скорее всего, в языковых особенностях. На слух русскому человеку лучше воспринимается твердое «у», а в письменной форме ошибку дает пресловутый немецкий «умляют» — двоеточие над гласными: Eduard Buchner, но Ernst Büchner. Поэтому надлежит лучше запомнить реакцию Бухнера — Курциуса, но забыть колбу и воронку Бухнера.

Литература

1. Волков В.А., Вонский Е.В., Кузнецова Г.И. Выдающиеся химики мира. — М.: ВШ, 1991.
2. Лауреаты Нобелевской премии: Энциклопедия в 2-х томах. Т. 1: А — Л / Пер. с англ. — М.: Прогресс, 1992. — С. 211–214.
3. Пастер Л. Критический разбор посмертной статьи Клода Бернара о ферментации / В кн.: Пастер Л. Избранные труды. Т. 1–2. — М.: АН СССР, 1960.
4. Чолаков В. Ученые и открытия / Пер. с болг. — М.: Мир, 1986. — 368 с.
5. Шамин А.Н. История биологической химии: Формирование биохимии. Серия «Из наследия А.Н. Шамина». Изд. 2-е. — М.: URSS, 2006. — 264 с.
6. Bernard Claude. La fermentation alcoolique. Dernieres experiences de Claude Bernard. M. Berthelot, Ed. // Revue scientifique de la France et de l'etranger, Paris. — 1878. — Т. 16. — Р. 49–56.
7. Buchner E. Cell-free fermentation. Nobel lecture, December 11, 1907.
8. Buchner E. Presentation Speech. In: Nobel Lectures. Chemistry 1901–1921. — Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1966.
9. Buchner E. Ueber den Einfluss des Sauerstoffs auf Gaehrungen // Hoppe-Seylers Zeitschrift fuer Physiologische Chemie. — 1885. — Bd. 9. — S. 380–415.
10. Buchner E. Synthese von Pyrazol-, Pyrazolin- und Trimethylenderivaten mittels Diazoessigaether — Ein Beitrag zur Kenntnis der ringfoermigen Atombindung. — Habilitationsschrift, Muenchen, 1891.
11. Buchner E. Alkoholische Gaehrung ohne Hefezellen // Ber. Dt. Chem. Ges. — 1897. — Bd. 30. — S. 117–124 (есть англ. перевод: <http://bip.cnrs-mrs.fr/bip10/buchner0.htm>).
12. Buchner E., Buchner H. u. Hahn M. Die Zymasegaerung. Untersuchungen ueber den Inhalt der Hefezellen und die biologische Seite des Gaerungsproblems. — Muenchen und Berlin, 1903.
13. Buchner E., Curtius Th. Synthese von Ketonsaeureaethern aus Aldehyden und Diazoessigaether // Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft. — 1885. — Bd. 18. — S. 2371–2377.
14. Buchner Rudolf. Die politische und geistige Verstellungswelt Eduard Buchner // Ztschr. fuer bayerische Landgeschichte. — 1963. — Bd. 26. — S. 631–645.

15. *Dtsch. biogr. Jahrb. 1917–1920.* — Berlin — Leipzig, 1928.
16. *Friedmann H.C.* From Friedrich Woehler's urine to Eduard Buchner's alcohol. In: *New Beer in an Old Bottle: Eduard Buchner and the Growth of Biochemical Knowledge.* Ed. by A. Cornish-Bowden. Univ. de Valencia, Spain, 1997. — P. 67–122.
17. *Harries C* // *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft.* — 1917. — Bd. 50. — S. 1843–1876.
18. *Kohler R.E.* The reception of Eduard Buchner's discovery of cell-free fermentation // *J. of the History of Biology.* — 1971. — Vol. 4. — P. 35–61.
19. *Kornberg A.* Centenary of the birth of modern biochemistry. In: *New Beer in an Old Bottle: Eduard Buchner and the Growth of Biochemical Knowledge.* Ed. by A. Cornish-Bowden. Univ. de Valencia, Spain, 1997. — P. 61–66.
20. *Manasseina M.* Beitrage zur Kenntnis der Hefe und zur Lehre von alkoholischen Gaerung / In: Julius Wiesner (Hrsg.): *Mikroskopische Untersuchungen,* Stuttgart, 1872. — S. 116–128.
21. *Manasseina M.* // *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft.* — 1897. — Bd. 30. — S. 3061–3062.
22. *Naegeli C. von.* *Theorie der Gaerung.* — Muenchen, 1879.
23. *Reichel L.* Eduard Buchner, sein Leben und Werk // *Wissenschaftliche Ztschr. der Humboldt-Universitaet zu Berlin.* — 1953/1954. — Bd. 4. — S. 329–332.
24. *Ukrow Rolf.* Nobelpreistraeger Eduard Buchner (1860–1917). Ein leben fuer die Chemie der Gaerungen und — fast vergessen — fuer die organische Chemie. Dissertation an der Fakultaet I — Geisteswissenschaften — der Technischen Universitaet Berlin. 2004. — 362 S. http://edocs.tu-berlin.de/diss/2004/ukrow_rolf.pdf

Интернет-источники:

- <http://nobel.se/chemistry/laureates/1907/buchner-bio.html>
http://nobelprize.org./nobel_prizes/chemistry/laureates/1907/buchner-lecture.pdf
<http://nobel.se/chemistry/laureates/1907/press.html>
http://en.wikipedia.org./wiki/Eduard_Buchner

Резюме. В связи со 100-летием вручения Нобелевской премии Эдуарду Бухнеру и 110-летием его открытия бесклеточного брожения осуществлен анализ жизни и научного творчества ученого. Приведены его наиболее важные публикации и библиография трудов о нем.

Ключевые слова: история науки, химия, биология, брожение, биографии, Эдуард Бухнер.

DEMONSTRATION OF CELL-FREE FERMENTATION AS A TRIUMPH OF NATURAL SCIENCE OF XIX CENTURY: TO CENTENARY FROM EDUARD BUCHNER NOBEL PRIZE AWARDING AND 110 YEAR JUBILEE OF HIS DISCOVERY

V.S. VOROBYEV, O.V. VOROBYEVA

Ovchinnikov Society of Biotechnologists of Russia, Moscow

The analysis of Eduard Buchner's life and work on occasion of centenary from his Nobel Prize awarding and 110 year jubilee of his discovery was carried out. Some bibliographic issues were presented too.

Keywords: science history, chemistry, biology, fermentation, biographies, Eduard Buchner.

ЮБИЛЕЙНЫЕ И ЗНАМЕНАТЕЛЬНЫЕ ДАТЫ 2007 ГОДА*

СОБЫТИЯ, ФАКТЫ

1882 — открытие хроматина Вальтером Флеммингом (напечатано в книге «Zellsubstanz, Kern und Zellteilung, Lpz.»).

1882 — Р. Кох открыл бактерию — возбудителя туберкулеза.

1882 — И.И. Мечников впервые наблюдал фагоцитоз у личинок морской звезды (в 1883 г. описал).

1892 — открытие Д.И. Ивановским вируса табачной мозаики.

1897 — открытие Э. Бухнером бесклеточного брожения (вышла в свет статья: Buchner E. Alkoholische Gaeahrung ohne Hefezellen // Ver. Dt. Chem. Ges. — 1897. — Bd. 30. — S. 117–124).

1902 — А.Э. Гарро (A.E. Garrod) связал наследственные признаки с функцией белка на примере алкаптонурии (в этом году вышла книга по данному вопросу).

1902 — Т. Бовери (Германия) и У. Саттон (США) независимо друг от друга сделали предположение, что гены расположены в хромосомах и что каждая яйцеклетка или сперматозоид содержит только по одной хромосоме каждого типа.

1902 — присуждение Нобелевской премии по химии Эмилю Фишеру за исследования синтеза веществ с сахаридными и пуриновыми группами.

1907 — начало изучения дрозофилы Т.Х. Морганом.

1907 — получение Нобелевской премии по химии Эдуардом Бухнером за биохимические исследования и открытие бесклеточного брожения.

1917 — впервые введен термин «биотехнология» (предложен венгерским инженером Карлом Эреки — Karl Ereky, 1865–1933)

1917 — открытие бактериофагов французским ученым Ф.Д' Эреллем (Felix Huber D'Herelle, 1873–1949).

1917 — основание Н.К. Кольцовым Института экспериментальной биологии (Москва).

1922 — американский генетик Г. Меллер (H.J. Mueller) предложил фаг как простую модель для изучения природы гена.

1922 — Т.Х. Морган создал карту хромосом дрозофилы.

1927 — обнаружение Г. Меллером открытия радиационного мутагенеза: публикация статьи «Искусственная трансмутация генов».

1927 — выступление Н.К. Кольцова на III Всероссийском съезде зоологов, анатомов и гистологов с идеей репликации наследственных молекул.

1937 — обнаружение нуклеопротеидной (РНК) природы вируса табачной мозаики английским вирусологом Ф. Боуденом (Frederick Charles Bawden, 1908–1972).

1937 — присуждение Нобелевской премии по физиологии и медицине А. Сент-Дьердьи за открытия в области процессов биологического окисления, связанные в особенности с изучением витамина С и катализа фумаровой кислоты.

1947 — Барбара Мак-Клинток сообщила об открытии подвижных генетических элементов у бактерий («транспозонов»). Открытие не было оценено тогда.

1947 — вручение половинной Нобелевской премии по физиологии и медицине супругам Карлу Ф. и Герти Т. Кори за открытие каталитического обмена гликогена; второй половины — Бернардо Альберто Усаю за открытие действия гормона передней доли гипофиза на обмен сахара.

1952 — А. Херши и М. Чейз показали генетическую роль ДНК в бактериофагах.

* Материал подготовлен О.В. Воробьевой

1952 — присуждение Нобелевской премии по физиологии и медицине Селмэну Ваксману за открытие стрептомицина.

1952 — Дж. Ледерберг обнаружил перенос ДНК от одной бактерии к другой, опосредованный вирусом («трансдукция»). Ввел термин «плазмида».

1957 — присуждение Нобелевской премии по химии Александеру Тодду за работы по нуклеотидам и нуклеотидным коферментам.

1957 — Ф. Крик и Дж. Гамов предложили концепцию центральной догмы молекулярной биологии — переноса генетической информации в цепи: ДНК — мРНК — белок.

1957 — публикация А.С. Спирина, А.Н. Белозерского, Н.В. Шугаевой, Н.В. Ванюшина «Изучение видовой специфичности нуклеиновых кислот у бактерий» в журнале «Биохимия» (Т. 22, С. 744–754) с предсказанием существования иРНК.

1962 — присуждение Нобелевской премии по химии Дж.К. Кендрю вместе с М. Перуцем за исследование структуры глобулярных белков.

1967 — выделение А. Корнбергом биологически активной ДНК (публикация: Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1967, Vol. 58, P. 2321–2328).

1967 — Мери Вейс (Mary Weiss) и Ховард Грин (Howard Green) в статье «Lines Containing Partial Complements of Human Chromosomes and Functioning Human Genes» (PNAS, Vol. 58, P. 1104–1111) предложили технологию использования клеток человека и мыши, выращенных вместе в одной культуре. Данный метод был назван гибридизацией соматических клеток.

1967 — основание Института биологии развития АН СССР (ныне РАН). В 1976 г. ему было присвоено имя Н.К. Кольцова.

1972 — П. Берг сконструировал и получил биологически активную гибридную плазмиду путем обработки рестриктазой двух плазмид с последующей их сшивкой ДНК-лигазой. Таким образом была создана 1-я рекомбинантная молекула ДНК.

1972 — Х.Г. Корана и др. синтезировали полно-размерный ген тРНК.

1972 — присуждение Нобелевской премии по химии К. Анфинсену (одна половина) и У.Х. Стайну и С. Муру (другая половина) за исследования рибонуклеазы.

1972 — присуждение Нобелевской премии по физиологии и медицине Дж. Эдельману и Родни Р. Портеру за установление химического строения антител.

1977 — присуждение Нобелевской премии по химии Илье Пригожину за вклад в термодинамику необратимых процессов, особенно в теорию диссипативных систем.

1977 — присуждение половинной Нобелевской премии по физиологии и медицине Р.С. Ялоу за усовершенствование радиоиммунологических методов определения пептидных гормонов.

1977 — У. Гилберт и Ф. Сенгер независимо предложили быстрый метод определения последовательностей нуклеотидов в молекуле ДНК (в результате открылась возможность одному исследователю определять до 1000 нуклеотидов в неделю).

1982 — присуждение Нобелевской премии по физиологии и медицине С. Бергстрему, Б. Самуэльсону и Дж. Вейну за работу по выделению и изучению простагландинов и родственных биологически активных веществ.

1982 — разрешена к применению в Европе первая вакцина для животных, полученная по технологии рекомбинантных ДНК.

1982 — создание биотехнологическим путем первого культурного растения — стойкого к антибиотику табака. Начало эры трансгенных растений.

1987 — присуждение Нобелевской премии по физиологии и медицине Судзуми Тонегаве за открытие генетических принципов генерации антител.

1987 — первые полевые испытания генетически модифицированных сельскохозяйственных растений (помидор, устойчивый к вирусным заболеваниям).

1987 — американский генетик М. Олсон из Вашингтонского университета сконструировал новый тип экспрессирующего вектора — «искусственные дрожжевые хромосомы» («yeast artificial chromosomes»), предназначенные для клонирования больших фрагментов ДНК.

1987 — компания «Калген» (Calgene Inc.) патентует модифицированный ген томата, подавляющий экспрессию антисмысловой полигалактуронозной РНК, что позволяет отдалить срок созревания плодов.

1997 — первый опыт клонирования млекопитающего из дифференцированной соматической клетки («овечка «Долли») — Институт Рослина, Шотландия.

1997 — присуждение Нобелевской премии по физиологии и медицине С. Прузинеру за открытие прионов.

2002 — расшифровка генома мыши.

2002 — присуждение Нобелевской премии по физиологии и медицине С. Бреннеру, Дж.Э. Салстону и Х.Р. Хорвицу за открытие механизма апоптоза.

ПЕРСОНАЛИИ

300 лет со дня рождения Карла Линнея, основателя научной систематики в биологии.

150 лет со дня рождения Арчибалда Э. Гарро (Archibald Edward Garrod, 1857–1936), английского медика, пионера изучения наследственной патологии метаболизма.

150 лет со дня рождения А.Н. Баха, отечественного биохимика.

135 лет со дня рождения Н.К. Кольцова, российского биолога.

130 лет со дня рождения Освальда Теодора Эйвери (1877–1955), показавшего в 1944 г. совместно с К. Мак-Леодом и М. Мак-Карти роль ДНК в передаче генетической информации.

120 лет со дня рождения Н.И. Вавилова (25 ноября), отечественного генетика и селекционера.

120 лет со дня рождения Эрвина Шредингера, австрийского физика, лауреата Нобелевской премии (1933, совместно с П. Дираком).

110 лет со дня рождения Тадеуша Рейхштейна, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1950, совместно с Ф.Ш. Хенчем и Э.К. Кендаллом) за открытия, связанные с гормонами коры надпочечников.

110 лет со дня рождения Джона Ф. Эндерса, американского бактериолога, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1954, совместно с Ф.Ч. Роббинсом и Т.Х. Уэллером) за открытие способности вируса полиомиелита размножаться в культурах различных тканей.

105 лет со дня рождения и 15 лет со дня смерти Барбары Мак-Клинток, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1983) за открытие подвижных элементов генома (через более трех десятилетий после этого открытия).

105 лет со дня рождения Андре Львова, французского микробиолога, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1965, совместно с Ф. Жакобом и Ж. Моно).

100 лет со дня рождения и 10 лет со дня смерти Александра Тодда, лауреата Нобелевской премии по химии (1957).

100 лет со дня рождения Н.П. Дубинина (4 января), отечественного генетика.

100 лет со дня рождения Н.М. Сисакяна, отечественного биолога.

100 лет со дня рождения и 15 лет со дня смерти Даниеле Бове, швейцарско-итальянского фармаколога, лауреата Нобелевской премии по физиологии (1957) за открытия синтетических веществ, блокирующих действие некоторых образующихся в организме соединений.

95 лет со дня рождения Сальвадора Лурии, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1969, совместно с М. Дельбрюком и А. Херши) за открытие цикла репродукции вирусов и развитие генетики бактерий и вирусов.

95 лет со дня рождения и 5 лет со дня смерти Конрада Блоха, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1964, совместно с Ф. Линеном) за открытия, касающиеся механизмов регуляции обмена холестерина и жирных кислот.

95 лет со дня рождения Джорджа Паладе, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1974, совместно с А. Клодом и К. де Дювом) за исследования структурной и функциональной организации клетки.

95 лет со дня рождения Кристиана де Дюва, бельгийского биохимика, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1974, совместно с А. Клодом и Дж. Паладе) за исследования структурной и функциональной организации клетки.

95 лет со дня рождения Джона К. Кендрю, английского биохимика, лауреата Нобелевской премии по химии (1962, совместно с М. Перуцом) за исследования структуры глобулярных белков.

90 лет со дня рождения Родни Роберта Портера (1917–1985), английского биохимика, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1972, совместно с Дж. М. Эдельманом) за открытие химической структуры антител.

85 лет со дня рождения Хаара Гобинда Кораны, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1968, совместно с Р.У. Холли и М.У. Ниренбергом) за расшифровку генетического кода и его роли в синтезе белков.

85 лет со дня рождения Роберта У. Холли, американского биохимика, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1968, совместно с Х.Г. Кораной и М.У. Ниренбергом) за расшифровку генетического кода и его роли в синтезе белков.

85 лет со дня рождения Стенли Коэна, американского биохимика, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1986, совместно с Р. Леви-Монтальчини) за открытия, имеющие значение для раскрытия механизмов регуляции роста клеток и органов.

80 лет со дня рождения Маршалла У. Ниренберга, американского биохимика, лауреата Нобелевской

премии по физиологии и медицине (1968, совместно с Х.Г. Кораной и Р.У. Холли) за расшифровку генетического кода и его роли в синтезе белков.

80 лет со дня рождения Сидни Бреннера, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (2002, совместно с Р. Хорвицом и Дж. Салстоном) за открытия в области генетической регуляции развития органов и программированной гибели клеток (апоптоза).

80 лет со дня рождения и 5 лет со дня смерти Цезарю Мильштейну, аргентинскому биохимику, лауреату Нобелевской премии по физиологии и биохимии — 1984 г., половинная премия вместе с Г. Келером за разработку техники получения гибридом; вторая половина была присуждена Нильсу К. Эрне за разработку теории идиотипической сети.

80 лет со дня рождения Джона Р. Вейна, английского фармаколога, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1982, совместно с С. Бергстромом и Б. Самуэльсоном) за открытия, касающиеся простагландинов и родственных биологически активных веществ.

75 лет со дня рождения Уолтера Гилберта, американского молекулярного биолога, лауреата Нобелевской премии — 1980 г., половинная премия вместе с Ф. Сенгером за вклад в определение последовательности оснований в нуклеиновых кислотах; вторая половина была присуждена Полу Бергу за фундаментальные исследования в области биохимии нуклеиновых кислот, в особенности, рекомбинантных ДНК.

65 лет со дня рождения Стенли Б. Прузинера, американского невролога и биохимика, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1997) за открытие прионов как нового биологического принципа инфекции.

65 лет со дня рождения Джона Салстона, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (2002, совместно с Р. Хорвицом и С. Бреннером) за открытия в области генетической регуляции развития органов и программированной гибели клеток (апоптоза).

60 лет со дня рождения Роберта Хорвица, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (2002, совместно с С. Бреннером и Дж. Салстоном) за

открытия в области генетической регуляции развития органов и программированной гибели клеток (апоптоза).

90 лет со дня смерти Эдуарда Бухнера (1860–1917).

50 лет со дня смерти Гертты Т. Кори, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине — 1947, половинная премия вместе с супругом Карлом Ф. Кори за открытие каталитического обмена гликогена; вторая половина присуждена Бернардо Альберто Усаю за открытие действия гормона передней доли гипофиза на обмен сахара.

40 лет со дня смерти Г. Меллера, выдающегося генетика, лауреата Нобелевской премии (1946).

35 лет со дня смерти А.Н. Белозерского.

35 лет со дня смерти Эдуарда К. Кендалла (1886–1972), английского биохимика, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1950, совместно с Ф.Ш. Хенчем и Т. Рейхштейном) за открытия, касающиеся гормонов коры надпочечников, их структуры и биологических эффектов.

30 лет со дня смерти английского физиолога Арчибалда В. Хилла (1886–1977), лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине — 1922, поло-

винная премия за открытие теплообразования в мышцах; вторая половина была вручена вручена Отто Мейергофу за открытие законов регуляции поглощения кислорода мышцей и образования в ней молочной кислоты.

25 лет со дня смерти шведского биохимика Хуго Теорелля (1903–1982), лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине 1955 года за открытия, касающиеся природы и механизма действия окислительных ферментов.

20 лет со дня смерти американского биохимика Джона Х. Нортропа (1891–1987), лауреата Нобелевской премии по химии — 1946, вместе с У.М. Стенли за получение в чистом виде ферментов и белковых вирусов; вторая половина была присуждена Дж.Б. Самнеру за открытие свойства кристаллизации ферментов.

20 лет со дня смерти английского биолога Питера Брайана Медавара (1915–1987), лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1960, совместно с М. Бернетом) за исследования приобретенной иммунологической толерантности.

10 лет со дня смерти Алфреда Херши (1908–1997), лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1969, совместно с М. Дельбрюком и С. Лурией) за открытие цикла репродукции вирусов и развитие генетики бактерий и вирусов.

СОБЫТИЯ ПЕРВОГО ПОЛУГОДИЯ 2007 ГОДА*

**К 70-летию юбилею
Красноярской средней школы № 10
имени академика Ю.А. Овчинникова**



Общий вид школы № 10 (Красноярск)

В конце января 2007 года в г. Красноярске состоялись юбилейные торжества, посвященные 70-летию Красноярской средней школы № 10 имени академика Ю.А. Овчинникова. Состоялись встречи с выпускниками разных лет и другие юбилейные мероприятия. Педагогов, бывших и нынешних учеников с юбилеем поздравил председатель Законодательного собрания Красноярского края Александр Усс.

Школа была открыта в феврале 1937 года в большом 4-этажном здании, расположенном на углу улицы Ленина (бывшей Благовещенской) и улицы Робеспьера (бывшего Пляц-Парадного переулкa) — ныне адрес: ул. Ленина, 114. До революции здесь то же была школа, построенная в начале XX века по проекту инженера В.А. Соколовского (новое здание было освящено 13 сентября 1909 г.). Многие особенности интерьера дореволюционной школы (массивные старинные парты, учительские столы в виде возвышающихся кафедр, кабинетная система и т.д.) сохранились до 50-х годов, несмотря на последующую перестройку и реконструкцию под госпиталь. Во время Великой Отечественной войны в ней располагался эвакогоспиталь № 1515, где трудился известный хирург и богослов В.Ф. Войно-Ясенецкий (епископ Лука) — в честь этого события на здании школы в 1998 г. была установлена мемориальная доска. С 1941/1942 гг. школа стала мужской гимназией, а с 1955 года перешла на совместное обучение мальчиков и девочек.

* Материал подготовлен О.В. Воробьевой.

Редколлегия благодарит А.П. Попова, учившегося в Красноярской средней школе № 10 в 50-е годы XX века, за ценные консультации и материалы

Школа всегда славилась опытными педагогами (И.Ф. Беляк, К.К. Михайлова, Е.К. Шалаева, А.М. Ермолаева и др.). За 63 года она выпустила из своих стен 5211 человек, из них около 400 золотых и серебряных медалистов. В 1966 г. был выпущен первый математический класс. Были введены новые предметы: психология, логика, философия, экология. В школе функционируют студия эстрадного пения, театр-студия «Буратино», кружки «Флористика», «Танцы», «Шахматы», спортивные секции. Ныне в школе обучаются 1085 учащихся, работают 62 учителя. В ней постоянно осуществляются нововведения: наряду с традиционными математическими классами, в ней созданы классы по модели «Экология и диалектика», гуманитарные с углубленным изучением иностранных языков. Школа — постоянный лауреат местных и всероссийских конкурсов: она была удостоена почетных титулов «Лучшая школа России-2005» и «Школа России-2006». Школу окончили много ставших впоследствии знаменитостей: заслуженный артист России Константин Вошиков, певица и педагог, профессор Екатерина Иофель, чемпион СССР по шахматам Лев Псахис и многие другие известные ученые, писатели, политики.



Памятная доска в честь академика Ю.А. Овчинникова на здании школы

Однако для читателей журнала существенно то, что в ней учился и в 1952 году окончил с золотой медалью Юрий Анатольевич Овчинников. Этот факт отмечен мемориальной доской на фасаде здания, а также присвоением школе его имени в 1997 году. С исторической и дидактической точек зрения важно указать на то, что химию Ю.А. Овчинникову преподавал известный на весь город учитель — Александр Николаевич Богуславский, человек строгий, инвалид войны, хорошо преподнесивший свой предмет, но и требовавший от всех прочных знаний. Такие люди всегда оставляют глубокий

след в сердцах учеников, а отечественная химия должна благодарить его за воспитание такого выдающегося ученого, как Ю.А. Овчинников. Вечная память всем ушедшим из жизни педагогам-подвижникам, сеявшим умное и доброе в далекой сибирской земле. Здоровья и процветания нынешнему поколению учителей школы-юбиляра.

9–10 февраля 2007 года в Москве состоялся семинар «Биотехнология и медицина» в рамках Первого Российского форума «Новые технологии — инновационному бизнесу». Руководитель семинара — президент Общества биотехнологов России имени Ю.А. Овчинникова, профессор Р.Г. Васильев. Организаторы: НП «Агентство научных и деловых коммуникаций», Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере, Общероссийская общественная организация «Деловая Россия», Инновационное агентство РАН, Союз работодателей машиностроения России, Общество биотехнологов России. Семинар включал в себя: пленарное заседание, на котором были обсуждены общие проблемы развития инновационной деятельности в России; три сессии — «Медицинская и фармацевтическая биотехнология» (№ 1), «Сельскохозяйственная и пищевая биотехнология» (№ 2), «Биоэнергетика и биоиндустрия» (№ 3); круглый стол «Экономические и организационные основы инновационного процесса в биотехнологии».

22 февраля 2007 года в Москве прошла Международная конференция «Сотрудничество ЕС — Россия: приоритеты направления развития науки и технологий на 2007–2013 гг.». Конференция была организована Министерством образования и науки РФ совместно с Европейской Комиссией при поддержке Германии (страны, председательствующей в Совете ЕС) и участия Государственного университета — Высшей Школы Экономики. На общем заседании были обсуждены перспективы научно-технологического сотрудничества между Россией и ЕС в приоритетных областях. На тематических секциях рассматривались отдельные направления, в том числе энергетика, биотехнология и др.

12–16 марта 2007 года в Москве состоялись Четвертый Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы» и 5-я международ-

ная специализированная выставка «Мир биотехнологии — 2007».

Памяти вице-президента РАН, академика РАН Николая Альфредовича Платэ



16 марта 2007 года на 73-м году жизни скончался вице-президент Российской академии наук, академик РАН Николай Альфредович Платэ. Родился ученый 4 ноября 1934 года. Он был выдающимся химиком, специалистом в области высокомолекулярных соединений. При этом он принадлежал к династии химиков: его отец, А.Ф. Платэ, был профессором, заведующим кафедрой на химфаке МГУ, а по матери он приходился внуком Н.Д. Зелинскому. Его учителем был академик В.А. Каргин. Н.А. Платэ длительное время (20 лет) возглавлял Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН, до вице-президентства был Главным научным секретарем Президиума РАН. Он открыл термотропные жидко-кристаллические полимеры с мезогенными группами, что привело к созданию нового поколения жидко-кристаллических полимеров и композитных материалов для различных высокотехнологичных областей (оптики, электроники и др.). Им также разработаны полимеры для медицины и биологии — селективные сорбенты для детоксикации организма человека, биосовместимые полимерные материалы для протезов, органов, тканей. Координировал в стране вопросы химической и биологической безопасности (им разработана оригинальная технология уничтожения токсичных веществ, включая запасы химоружия). Н.А. Платэ подготовил 17 докторов и 90 кандидатов наук. Награжден рядом орденов СССР и РФ, а также других государств, в том числе Орденом Почетного Легиона (Франция). Редколлегия и редакционный

совет журнала скорбят об этой утрате и выражают соболезнование ученикам, близким и родным ученого.

19 марта 2007 года в Москве, в Президиуме РАН прошло 63-е Баховское Чтение, посвященное 150-летию со дня рождения А.Н. Баха. С докладами выступили: профессор В.О. Попов (директор Института биохимии им. А.Н. Баха РАН), профессор Дж. Уокер (лауреат Нобелевской премии, Кембридж, Великобритания), академик РАН А.С. Спирин (председатель Баховского комитета РАН).

ПУБЛИКАЦИИ*

Белясова Н.А. Биохимия и молекулярная биология. — Книжный дом, 2004. — 415 с.

Аннотация. Систематизированы современные представления о структуре и функциях основных клеточных макромолекул и биологически активных веществ, охарактеризованы процессы обмена белков, углеводов, липидов, нуклеиновых кислот, механизмы различных способов запасаения энергии клетками, а также особенности процессов регуляции метаболизма и его интеграции. Подробно освещены вопросы организации наследственного аппарата, репликации ДНК, РНК, экспрессии генов, процессов, обуславливающих сохранение и изменчивость генетического материала. Содержатся сведения о приемах генетической инженерии, используемых при конструировании рекомбинантных ДНК, создании штаммов-продуцентов биологически активных веществ, получении и анализе клонок геномов для решения проблем медицины и сельского хозяйства. Издание предназначено для студентов, бакалавров, магистров и аспирантов, обучающихся по специальности «Биотехнология». Будет полезным для студентов специальностей «Биохимия» и «Микробиология», а также для студентов других химико-технологических и естественно-научных специальностей, изучающих биохимию и молекулярную биологию.

Россихин В.В., Яремчук А.А., Башура А.Г., Молева И.И., Башура Г.С. Биотехнология: настоящее и будущее. — Минск, 2004. — 249 с.

Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека: В двух томах. Т. 1. — М.: Мир, 2004. — 381 с.

Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека: В двух томах. Т. 2. — М.: Мир, 2004. — 414 с.

Yadeev N. A Handbook of Biotechnology. — Anmol Publications, 2004. — 892 p.

Алексеев В.И., Каминский В.А. Прикладная молекулярная биология. Изд. 2-е. — М., 2005.

Аннотация. В учебном пособии изложены основы молекулярной биологии, а также направления приложения закономерностей молекулярной биологии для практического использования. Рассмотрены системная организация живого вещества на биосферном и молекулярном уровнях, структурная организация макромолекул, функции биополимеров, их комплексов и основные направления практического использования молекулярной биологии. Пособие предназначено для студентов естественных вузов — будущих биологов, химиков, технологов пищевых производств, а также аспирантов, преподавателей и специалистов.

Зинченко А.И. Основы молекулярной биологии вирусов и антивирусной терапии. — Минск: Вышэйшая школа, 2005.

Аннотация. Рассмотрены современные концепции учения о вирусах, свойства вирусов, химия и архитектура вирусных частиц. Описан арсенал методов, используемых при очистке и концентрировании вирусных препаратов. На основе анализа молекулярных аспектов взаимодействия вирусов с клеткой рассмотрены механизм действия основных противовирусных химиопрепаратов, а также существующие и перспективные пути профилактики и терапии наиболее социально значимых вирусных инфекций. Книга предназначена для студентов специальностей «Медико-биологическое дело» и «Медицинская экология» (гриф МО Республики Беларусь). Может быть использована врачами-вирусологами и химиками, занимающимися проблемами синтеза противовирусных соединений.

Arya R. Modern Dictionary of Biotechnology. — Deep & Deep Publications, India, 2005. — 424 p.

* Материал подготовлен О.В. Воробьевой.

Подобраны профильные книги истекших трех лет и начала 2007 г.

Pahl G. *Biodiesel. Growing a New Energy Economy.* — Chelsea Green. — 2005. — 282 p.

Резюме. В книге 4 раздела: 1) общие сведения о биодизеле; 2) биодизель в мире; 3) биодизель в США; 4) биодизель в будущем. В каждом разделе приводится соответствующая информация, включая исторические аспекты, мировые тенденции, технологические особенности, экономические основы, прогнозы и т.д.

Carter D.M., Halle J. *How to Make Biodiesel.* — Low-Impact Living Initiative, 2005. — 124 p.

21st Century Biodiesel Fuel. Business Management for Producers and Handling and Use Guidelines - Series on Renewable Energy, Biofuels, Bioenergy, and Biobased Products (Ringbound) (Ring-bound). — Progressive Management, 2005. — 202 p.

2006 American guide to biofuels and bioenergy, biodiesel, ethanol, USDA and energy department research, alternative fuels (book plus DVD-ROM set) (Ring-bound). — Progressive Management, 2005. — 149 p.

Резюме. Книга с DVD-ROM, содержащая 92000 электронных страниц (3 ГбТ). В ней собраны документы, доклады и публикации различных министерств США по проблеме биотоплива, включая биомассу, биодизель, этанол и метанол, водород, метан, дизель Фишера — Тропша и др.

Tickel J. *Biodiesel America. How to achieve energy security, free America from Middle-East oil dependence, and make money growing fuel.* — Yorkshire Press, 2005.

Резюме. В книге обсуждаются вопросы энергетической безопасности и снижения зависимости от импорта углеводородов. Как альтернатива этому рассматривается производство биодизеля.

Сазыкин Ю.О., Орехов И.И., Чакалева И.И. *Биотехнология / Ред. А.В. Катлинский.* — М.: Академия, 2006. — 256 с.

Аннотация. Рассмотрены основные объекты биотехнологии, способы их создания и совершенствования методами клеточной и генетической инженерии, возможности интенсификации биотехнологического производства методами инженерной энзимологии.

Особое внимание уделено проблемам скрининга биотехнологических препаратов на основе данных геномики, протеомики и биоинформатики, перспективам сочетания методов биосинтеза и органического синтеза при создании новых лекарственных средств. Даны сведения о промышленном производстве аминокислот, стероидов, антибиотиков, иммунобиопрепаратов, ферментов медицинского происхождения и других биотехнологических препаратов. Приведен краткий терминологический словарь и список литературы. Издание предназначено для студентов высших фармацевтических учебных заведений.

Friedman Y. *Building Biotechnology: Starting, Managing, and Understanding Biotechnology Companies.* 2nd ed. — 2006. — 320 p.

Резюме. Руководство для лиц, занимающихся бизнесом в биотехнологии. В нем содержатся тексты 15 наиболее продвинутых биотехнологических программ, включая MBA программы в UC Irvine, Terper and Schulich, Джонс Хопкинс биотехнологическую программу MS/MBA и расширенные программы в Беркли и UC Сан Франциско.

Microbial Proteomics: Functional Biology of Whole Organism. I.H. Smith, M. Hecker (eds.). — John Wiley & Sons Inc., 2006. — 512 p.

Резюме. В книге главный акцент ставится на роли микробного протеомного анализа в создании новых лекарств, включая идентификацию новых мишеней, новых диагностических маркеров и др. Рассматриваемые темы: микробный патогенез на протеомном уровне, моделирование целой клетки, структурная протеомика и компьютерный анализ, биомолекулярные взаимодействия, физиологическая протеомика, метаболическая реконструкция с использованием данных протеомики.

Sharp Lesley Alexandra. *Bodies, Commodities, and Biotechnologies: Death, Mourning, and Scientific Desire in the Realm of Human Organ Transfer.* — Columbia Univ. Press, 2006. — 129 p.

Резюме. Автор, медицинский антрополог по специальности, рассматривает медицинские, социально-экономические и этические аспекты пересадки органов человека. Кроме того, она обсуждает такие трудные

проблемы в связи с прогрессом биотехнологии, как биоинженерия целых органов из клеточных культур, биотехнологическое замещение органов, ксенотрансплантация, органогенез.

Lodge J., Minchin S., Lund P. Gene Cloning. — Taylor & Francis, 2006. — 356 p.

Резюме. В книге приводится ряд методов клонирования генов, которые могут быть полезными как для исследовательских лабораторий, так и для практических биотехнологов, работающих в области медицины, биоиндустрии, сельского хозяйства. Она также может быть использована преподавателями по направлению молекулярной и клеточной биологии.

Wilhelm Klaus-Peter, Eisner P., Berardesca E., Maibach H.I. Bioengineering of the Skin: Skin Imaging and Analysis. 2nd ed. / Series: Dermatology: Clinical & Basic Science. Vol. 31. — CRC Press, 2006. — 497 p.

Резюме. обстоятельное руководство по биоинженерии кожи, которое вышло вторым изданием. По сравнению с предыдущим изданием в него включены новые главы, например, такие как прижизненная конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, рамановская спектроскопия, оптическая когерентная томография, ядерно-магнитный резонанс, высокоразрешающее УЗИ, топометрия кожи *in vivo*, мультифотонное изображение кожи.

Rees A. Genetically Modified Food: A Short Guide for the Confused. — Pluto Press, 2006. — 240 p.

Summary of a Workshop on the Technology, Policy and Cultural Dimensions of Biometric Systems. K. Batch, L.I. Millet, J.N. Pato (eds.). — The National Academies Press, 2006. — 62 p.

Birge E.A. Bacterial and Bacteriophage Genetics. 5th ed. — New York: Springer Verlag, 2006. — 577 p.

Wing B., Walker Sh. Biotechnology demystified. — 2006. — 276 p.

In Silico Genomics and Proteomics: Function Annotation of Genomes and Proteins. — Nova Science Publishers, Inc., N.Y., 2006. — 226 p.

Datta A., Dougherty E.R. Introduction to Genomic Signal Processing with Control. — CRC, 2006. — 288 p.

Резюме. Книга представляет собой вводное пособие по вопросам управления в геномике. В ней имеются необходимые базовые данные по молекулярной биологии для читателя, не знакомого с ней. Акцент делается на применение теории управления к решению трудных проблем, возникающих в геномных исследованиях. Обсуждаются вопросы классификации и возможности кластерного анализа при изучении генетически обусловленных заболеваний и их классификации. Также рассматриваются вопросы сетевого регулирования генетических процессов.

Microbial Biotechnology in Agriculture and Aquaculture: v. 2. R.C. Ray (ed.). — Science Publishers, 2006. — 556 p.

Резюме. Книга посвящена использованию рекомбинантных ДНК технологий в сельском хозяйстве и аквакультуре. В ней 16 глав, написанных разными авторскими коллективами. Тематика глав следующая: микробы и их вклад в биотехнологию растений; генетически модифицированные растения: их использование и проблемы; технология ризобияльной продукции; фосфор-растворяющие микроорганизмы и их роль в стимуляции роста растений; биотехнология биооплодотворителей для рисовых культур; физиологические и генетические эффекты бактериальной АСС дезаминазы на растения; улучшение ризобияльных линий: генетический анализ и модификация; влияние микроорганизмов / микробных продуктов на качество воды и осадка в аквакультурных прудах; связь экотехнологии и биотехнологии в аквакультуре; морская микробная биотехнология и аквакультура: обзор; микробная деградация пестицидов: атразин как пример; микробиологическая технология экстракции джута и связанных волокон; микробная биоконверсия сельскохозяйственных и садоводческих продуктов в алкогольные напитки; глобальный сценарий; аквакультурная биотехнология для улучшения выращивания рыбы для пищевых целей; микробная обработка сельскохозяйственных отходов для производства кормов, пищи и пищевых добавок.

The Gene Revolution: GM Crops and Unequal Development. S. Fukuda-Parr (ed.). — Earthscan Publications Ltd., 2006. — 224 p.

Резюме. В книге делается попытка навести мосты между полярными точками зрения на перспективы применения генно-модифицированных продуктов питания. Состоит из трех частей: 1) Приоритеты национального развития и роль институтов; 2) ГМ-культивирование для развития: опыт Аргентины, Бразилии, Китая, Индии и Южной Африки; 3) Сравнение и анализ опыта развивающихся стран.

Scott Ch. Th. Stem Cells Now: A Brief Introduction to the Coming Medical Revolution. — Plume, 2006. — 272 p.

Резюме. Автор — исполнительный директор программы по стволовым клеткам Стенфордского университета — обсуждает научные и этические проблемы применения стволовых клеток в медицине.

William R. Encyclopaedia of Biotechnology. — Annot Publications Pvt Ltd., 2006.

Kemp W. H. Biodiesel, basics and beyond. A comprehensive guide to production and use for the home and farm. — Aztext Press, 2006. — 588 p.

Резюме. Книга представляет собой практическое руководство для любого предпринимателя, намеревающегося заняться производством биодизеля. В ней содержатся данные о технологических процессах и необходимом оборудовании для запуска производства биодизеля по северо-американским стандартам. Даются советы по использованию избытка семян масличных растений для производства биодизеля. Описывается способ использования глицерина как побочного продукта для производства мыла. Приводятся многочисленные справочные материалы и список устройств и средств для снабжения и обеспечения технологического цикла.

Biodiesel: making and selling the fuel of the future-business management for producers and producers and biofuel basics (book and CD-ROM set) (Ring-bound). — Progressive Management, 2006. — 202 p.

Резюме. Большая подборка документов и публикаций Министерства энергетики США и других ведомств по вопросам производства и применения биодизеля. На прилагаемом CD-ROM содержится 24000 в PDF. Материал сгруппирован по 4 основным направлениям: 1. Биодизель и индустрия жидкого топлива. 2. Стартовые

материалы для развертывания бизнеса, связанного с биодизелем. 3. Правовые и регулирующие документы. 4. Производственные вопросы.

Matthews B.J. Encyclopaedia of biotechnology. — Annot Publications Pvt Ltd., 2006.

Brown T. Gene cloning and DNA analysis. 5th ed. — Blackwell Publishing, 2006. — 408 p.

Резюме. Это 5-е, пересмотренное издание известной книги, представляющей собой вводный курс в такую сложную проблему, как клонирование генов и ДНК-анализ. Книга сохраняет прежнее построение, но содержит новую информацию в этой быстро развивающейся отрасли знаний. Изложены принципы используемых методов и области их применения. Представлены 250 четких цветных иллюстраций. Кроме ряда изменений по всему тексту, последние 4 главы переделаны и расширены в связи с новейшими данными, чтобы отразить значительный прогресс, достигнутый за последние годы в клонировании генов и ДНК-анализе применительно к задачам биотехнологии.

Caldwell G., Williams Sh., Caldwell K. Integrated genomics. A discovery-based laboratory course. — Wiley & Sons, 2006. — 246 p.

Книга, являющаяся лабораторным курсом, сочетает в себе современные методы молекулярной биологии с доступной через Интернет базой данных. Она дает возможность студентам получать теоретическую и практическую подготовку в области геномной технологии по следующим направлениям:

- лекции по общей биоинформатике с экспериментальными данными;
- многочисленные упражнения по выбору в области экспериментов;
- изучение различных популярных и сравнительно недорогих моделей, включая червя *Caenorhabditis elegans* и дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*;
- современные геномно-протеомные технологии, такие как дрожжевая двухгибридная система и иРНК;
- презентации на слайдах с выходом в Интернет, с регулярным обновлением.

Van Gerpen J.H., Pruszko R., Clements D. et al. Building a successful biodiesel business: Technology,

considerations, developing the business, analytical methodologies. 2nd ed. — Biodiesel Basics, 2006. — 277 p.

В книге 5 глав. Рассматриваются общие сведения, производственные вопросы (включая весь технологический цикл), проблемы экологии и безопасности, особенности бизнеса в данной области, вопросы регулирования.

Holden B., Jack J., Miller W., Durbin T. Effect of Biodiesel on Diesel Engine Nitrogen Oxide and Other Regulated Emissions: Final Report. — University of California at Riverside, California, 2006. — 92 p.

Alleman T.L., McCormick R.L. Analysis of Coconut-Derived Biodiesel and Conventional Diesel Fuel Samples from the Philippines. — National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado, 2006. — 102 p.

Wright L., Boundy B., Perlack B., Davis S., Saulsbury B. Biomass Energy Data Book, Edition 1. — Oak Ridge, Tennessee, 2006. — 188 p.

Воробьев А.А. В круге моем. — М.: Особая книга. Практическая медицина, 2007. — 160 с.

Резюме. Третья книга воспоминаний (вышла посмертно) А.А. Воробьева, известного микробиолога, академика РАМН. В ней он анализирует события последних лет в области медицины, в том числе в области биотехнологии и микробиологии.

Castle D., Cline Ch., Daar A.S., Tsamis Ch., Singer P.A. Science, Society and the Supermarket: The Opportunities and Challenges of Nutrigenomics. — Wiley-Interscience, 2007. — 163 p.

Резюме. В книге анализируются преимущества и опасности нутригеномики. Последовательно рассматриваются следующие вопросы: возможности и трудные проблемы нутригеномики; нутригеномика как наука; этика нутригеномных испытаний; альтернативы оказания услуг за счет нутригеномики; нутригеномика и регулирование требований к пище и лекарствам в отношении здоровья; право и доступ на рынок продуктов нутригеномики в индустриальных (развитых) и развивающихся странах; вопросы интеллектуальной собственности.

Девятин С.Н., Марков В.А., Семенов В.Г. Растительные масла и топлива на их основе для дизельных двигателей. — Харьков, 2007.

Аннотация. В книге имеется восемь глав, в которых последовательно рассматриваются следующие вопросы: применимость различных альтернативных топлив в дизелях; токсичность отработавших газов дизелей, работающих на нетрадиционных топливах; виды топлив из растительных масел; производство топлив на основе растительных масел; математические модели и расчетно-экспериментальные исследования процессов распыливания топлива; работа двигателей на топливах из растительных масел. В заключение анализируется литература, главным образом иностранная.

Stephenson F.H. DNA: How the Biotech Revolution Is Changing the Way We Fight Disease. — Prometheus Books, 2007. — 312 p.

Резюме. В книге рассматриваются медицинские аспекты биотехнологии. Демонстрируется на конкретных примерах, как биотехнология помогает в борьбе с такими заболеваниями, как разные формы рака, астма, диабет, ожирение, болезнь Альцгеймера и др.

Dutton R., Scharer J. Advanced Technologies for Biopharmaceutical Processing. — Iowa State Univ. Press, 2007. — 336 p.

Резюме. В книге описываются современные биофармацевтические методы, которые позволяют получать гормоны, цитокины, терапевтические ферменты, модифицированные белки, трансгенные продукты и т.д. Речь идет о широком диапазоне методов: от масштабных клеточных биореакторов до технологий персонализированной медицины.

Frey P.A., Hegeman A.D. Enzymatic Reaction Mechanisms. — Oxford Univ. Press, 2007. — 858 p.

Резюме. Фундаментальное руководство по данной проблеме. Оно вышло на смену авторитетной (но уже отслужившей свою службу за почти 30 лет) книге с таким же названием, которую выпустил С.Т. Walsch в 1979 г.

Genomics and proteomics engineering in medicine and biology / Akay M. (ed.). — Wiley-IEEE Press, 2007. — 297 p.

Книга под редакцией М. Акау, профессора Университета Штата Аризона (США), в которой представлена информация по актуальным вопросам геномики и протеомики в медицине и биологии.

2007 Biodiesel encyclopedia – business management for producers, handling and use guidelines, specifications, complete coverage (ringbound and CD-ROM) (Ringbound). – Progressive Management, 2006. – 216 p.

Материалы из Министерства энергетики и Министерства сельского хозяйства США. Книга освещает самые разнообразные вопросы: от общих и исторических данных до коммерческих и организационных вопросов. Главный акцент делается на производство — его структура, химические технологии, оборудование, патенты, обработка до и после завершения технологического цикла, утилизация побочных продуктов, оценка качества продукции, транспортировка и т.д.

ПРЕДСТОЯЩИЕ МЕРОПРИЯТИЯ 2007 ГОДА

23–26 апреля 2007 года в Москве состоится VIII Международный форум «Высокие технологии XXI века» («ВТ XXI–2007»). Организаторы Форума: Министерство промышленности и энергетики РФ, Департамент науки и промышленной политики города Москвы, Институт экономики и комплексных проблем связи (ОАО «ЭККОС»), Российский фонд развития высоких технологий, Московская торгово-промышленная палата, Московская ассоциация предпринимателей, Министерство науки и промышленности Московской области, ООО «ЭКСПО-ЭККОС», ООО «ВК «Мир-Экспо», ЦВК ЗАО «Экспоцентр». В программе Форума – Международная конференция – «Высокие технологии – стратегия XXI века». Среди тем конференции – биотехнология и нанотехнологии. Параллельно проводится VIII Международная выставка «Высокие технологии XXI века». Информация на сайтах: www.vt21.ru и www.exproecos.com.

6–9 мая 2007 года в Бостоне (США), в Центре съездов и выставок состоится конгресс биотехнологов «BIO 2007 International Convention». Это ежегодное мероприятие, собирающее тысячи специалистов из разных стран, сочетающееся с крупной выставкой продукции биотехнологических компаний. Информация: E-mail: BIO2007@bio.org; www.BIO2007.org.

7–8 мая 2007 года в Куала Лумпуре (Малайзия) состоится конференция International Conference on Biotechnology Engineering (ICBioE'07). Информация: <http://www.ilu.edu.my/icbioe/>.

7–12 мая 2007 года в Сьего де Авилья (Куба) будет проходить конгресс VI International Congress on Plant Biotechnology and Agriculture BIOVEG2007. Информация: <http://bioveg.bioplantas.cu>.

14–15 мая 2007 года в Дареме (Новая Каролина, США) состоится 16-я ежегодная конференция Biotech2007. Информация: <http://www.cednc.org/conferences/biotech/2007/>.

24–25 мая 2007 года в Пушкино состоится Всероссийская научно-практическая конференция «Питательные среды для биологии, медицины и биоиндустрии: фундаментальные и прикладные аспекты». Ор-

ганизаторы: Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, ФГУП «НПО «Микроген», ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере, НП «Агентство научных и деловых коммуникаций». Организуется тематическая выставка. Справки: www.biorosinfo.ru.

31 мая – 10 июня 2007 года в Шанхае и других городах КНР состоится конференция The 5th Anniversary of International Drug Discovery Science and Technology Conference & Expo. Ожидается участие более 100 экспонентов. Информация: <http://www.iddst.com>.

13–15 июня 2007 года в Мюнстере (Германия) состоится Международный конгресс и выставка по нанобиотехнологии NanoBio-Europe 2007. Это третий такой конгресс. Главная тема – медицинское приложение нанобиотехнологии. Информация: <http://www.nanobio-europe.com>.

26–28 июня 2007 года в г. Кирове будет проходить Международная конференция «Биотехнология как научно-практический приоритет развития Кировской области». Организаторы конференции: Правительство Кировской области, Вятский государственный университет, Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова. При поддержке: Государственной Думы ФС РФ, Законодательного собрания Кировской области, Союза предприятий биотехнологической отрасли, Кировского регионального информационно-инновационного центра. Сопредседатели оргкомитета: В.В. Крепостнов, Е.В. Пименов, Р.Г. Василев. Планируется обсуждение новых технологий в агробiotехнологии, лесной промышленности и биоэнергетике, подготовки кадров для биотехнологии, перспектив российско-американского сотрудничества в сфере биотехнологии. Состоится презентация приоритетных проектов Кировской области по биоиндустрии и агробiotехнологии. Контакты: E-mail: obr@biorosinfo.ru; cnti@cnti.kirov.ru; innov@mail.ru.

30 августа – 2 сентября 2007 года в г. Суздале состоится IV Международный симпозиум «ЕС – Россия: сотрудничество в области биотехнологии, сельского, лесного хозяйства и продуктов питания». Организаторы симпозиума: с российской стороны – Министерство образования и науки РФ, Роснаука, РАН, РФФИ, Институт биохимии им. А.Н. Баха, Российский национальный контактный центр «Биотехнология, сельское хозяйство и пища», Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова; со стороны ЕС – Директорат «Е» Европейской Комиссии по биотехнологии, сельскому хозяйству, продуктам питания и рыболовству, ИНТАС. Цель симпозиума – подведение итогов конкурсов 6- и 7-й Рамочных Программ, обсуждение вопросов организации и перспектив научно-технического сотрудничества России и ЕС по 7-й Рамочной Программе по направлениям: промышленная биотехнология, биотехнология растений, лесное хозяйство и лесопереработка, качество и безопасность пищи. Контакты: Тел.: +7-495-954-44-74. E-mail: fp7-bio@inbi.ras.ru; fp7-suzdal@inbi.ras.ru.

9–11 октября 2007 года в Ганновере (Германия) организуется 15-я Международная выставка ярмарка по биотехнологии «Биотехника 2007». Выставка функционирует с 1985 г. и стала традиционной (проводится

1 раз в 2 года). В 2007 г. ожидается прибытие 13000 участников и более 900 экспонентов. Адрес: Deutsche Messe AG, Messagelaende, 30521 Hannover, Germany. Факс: +49-511/89-31218. E-mail: biotechnical@messe.de; www.biotechnica.de.

17–18 октября 2007 года в Москве пройдет Второй международный конгресс «Биодизель-2007». Организатор: Российская биотопливная ассоциация. При поддержке: Государственной Думы ФС РФ, Минсельхоза России, Минэнерго России, Минэкономразвития России, Российского зернового союза, Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова. Контакты: Тел.: +7-495-585-5167. E-mail: congress@biotoplivo.ru.

6–9 ноября 2007 года в Москве проводится 2-я Международная специализированная выставка «Биоэнергетика-2007». Организатор: МВЦ «Крокус Экспо». В рамках выставки будет организован 2-й Международный конгресс «Биоэнергетика-2007». Контакты: E-mail: maximov@com2com.ru; bioenergetica@mail.ru.

12–14 ноября 2007 года в Гамбурге (Германия) состоится конференция BIO-Europe 2007 International Partnering Conference. Информация: <http://www.ebdgroup.com/bioeurope/>.

1. Рукописи статей и других материалов представляются в редакцию на бумажном носителе (формат А4) или в электронном виде (на дискете или по электронной почте с обязательным уведомлением).
2. Текст набирается в Microsoft Word, шрифт — Times New Roman, размер шрифта — 12, межстрочный интервал — полуторный. Размещение на листе формата А4 со стандартными полями. Кроме текста статьи, добавляются сведения об авторе (ах): Ф.И.О., место работы, должность, научные степень и звание, адреса для переписки и электронной связи, номера факсов и телефонов). Необходимо сопроводительное письмо из учреждения.
3. Объем рукописи: оригинальные статьи — не более 12–14 стр. (в среднем 22000 знаков без пробела), не более 25 цитированных авторов; обзоры — не более 20–24 стр. (в среднем 40000 знаков без пробела), список литературы — не более 50 авторов. Требования к композиции рукописи: 1) оригинальные статьи — УДК, название, автор (ы), место работы, резюме на русском и английском языках, ключевые слова, введение, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение (выводы), литература, список сокращений; 2) краткие сообщения и обзоры строятся в виде сплошного текста, без вышеуказанных рубрикации, со списком литературы, но без резюме; 3) остальные материалы (письма в редакцию, хроникальные сообщения, рецензии и т.д.) представляются в произвольной форме.
4. Требования к оформлению содержания рукописи (таблицы, графики, формулы, фотографии, рисунки и др.). Рисунки прилагаются отдельно к тексту рукописи в бумажном и электронном виде в формате TIF или JPEG. Таблицы помещаются по ходу текста или прилагаются отдельно. Порядок оформления иллюстративного и иного дополнительного (пояснений, примечаний, благодарностей и т.д.) материала к текстам обычный.
5. Требования к цитированной литературе: Список литературы оформляется или в алфавитном порядке (вначале — литература на русском языке, затем — на иностранных), или по порядку упоминания и ссылок в тексте при использовании цифр. В последнем случае номер цитированного источника берется в тексте в квадратные скобки. Оформление отдельного источника литературы осуществляется в соответствии с общепринятыми для научных изданий библиографическими требованиями, включая международные установки (Index Medicus и др.).
6. Не допускается публикация работ, уже напечатанных или посланных в редакции других изданий.

7. При несоблюдении указанных правил статьи редакцией не принимаются.
8. Принятые к публикации рукописи проходят рецензирование, после чего принимается окончательное решение о возможности печатания. Отклоненные рукописи не возвращаются.
9. Редакция не несет ответственности за достоверность фактов, выводы и суждения, приведенные в представленном к печати и опубликованном материале авторов.
10. Редакция оставляет за собой право делать научную и литературную правку, в том числе сокращать объем статей.
11. Адрес редакции указан на титульном листе журнала.
12. Журнал является безгонорарным. Редакция резервирует для автора статьи по 1 экземпляру журнала. По вопросам приобретения отдельных номеров журнала следует обращаться в редакцию.
13. С 2007 года проводится подписка на журнал. Подписной индекс 20991 в каталоге «Пресса России», 1-й том. Газеты и журналы. Периодичность в полугодии — 2. Каталожная цена на 3 мес. — 154 руб. 10 коп.; на 6 мес. — 308 руб. 20 коп.

ОБЩЕСТВО БИОТЕХНОЛОГОВ РОССИИ ИМ. Ю.А. ОВЧИННИКОВА

Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (ОБР) создано в 2003 г., зарегистрировано Минюстом России.

Главными целями деятельности ОБР являются:

- содействие развитию биотехнологии в России как приоритетного направления научно-технического прогресса, основы повышения уровня жизни и благосостояния ее граждан;
- содействие сохранению научного и научно-технологического потенциала биотехнологии в различных отраслях народного хозяйства, достижению приоритета российской науки;
- обеспечение обмена научными идеями и научно-техническими достижениями, передовым производственным опытом;
- содействие развитию сотрудничества ученых, инженеров, специалистов с мировым научным и общественно-политическим сообществом;
- создание условий для творческой работы, роста профессионализма и компетентности, более полного использования интеллектуального потенциала членов организации в интересах развития науки и производства.

Для достижения этих целей ОБР осуществляет различные мероприятия, в том числе проводит конференции, симпозиумы, рабочие совещания. Ежегодно проводится Съезд Общества биотехнологов России.

Издается журнал «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова» совместно с Информационно-аналитическим центром медико-социальных проблем.

ОБР имеет отделения в 55 регионах России и объединяет свыше 2000 членов.

ОБР является членом Европейской федерации биотехнологии.

ОБР тесно сотрудничает с Союзом биотехнологов и другими общественными и государственными организациями, научными и образовательными учреждениями по профилю.

Основной организационной деятельностью ОБР являются региональные отделения, тесно взаимодействующие с Центральным Правлением и Секциями (экспертными группами).

Членство в ОБР является бесплатным для физических лиц.

Контакты: Адрес: 119296 Москва, Университетский пр-т, 9

Тел.: 8-495-648-09-13

E-mail: obr@biorosinfo.ru; www.biorosinfo.ru