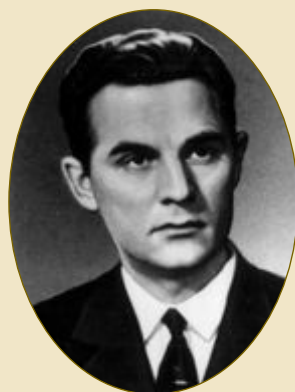


· БЕЛОЗЕРСКИЙ · ТОДД · СЕНГЕР · ОЧОА ·

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

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



**Т. 3, № 2**  
**2007**

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

· СМИТ · ГИЛБЕРТ · БЕРГ · ЭНГЕЛЬГАРТ ·

2007, Т. 3, № 2

# 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 (Пуццино),  
М.П. Кирпичников (Москва), О.И. Киселев (Санкт-Петербург), А.И. Мирошников (Москва),  
Т.В. Овчинникова (Москва), О.Н. Озолинь (Пуццино), 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*

ISSN 1996-4741

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

**СОДЕРЖАНИЕ**

**Колонка главного редактора**

К читателям. *Р.Г. Василев* ..... 4

**Оригинальные статьи**

Ассимиляция триглицеридов и продуктов их гидролиза у дрожжей *Yarrowia lipolytica*.

*С.В. Камзолова, И.Г. Моргунов, Т.Н. Козырева, Т.В. Финогенова* ..... 5

Новая 5-метилцитозин-зависимая сайт-специфическая эндонуклеаза GluI узнает последовательность ДНК 5'-G(5mC)↓NG(5mC)-3'/3'-(5mC)GN↓(5mC)G-5'. *В.А. Чернухин, Е.В. Чмуж, Ю.Э. Томилова, Т.Н. Наякшина, Д.А. Гончар, В.С. Дедков, С.Х. Дегтярев* ..... 13

Стимуляция и ингибирование роста клеток при культивировании в питательной среде, модифицированной электрическим полем. *А.И. Мирошников* ..... 18

Продуцирование пуллулана дрожжеподобным грибом *Aureobasidium pullulans* ВКПМ F-571. *А.А. Шубаков, Е.А. Елькина, В.Е. Ларина* ..... 26

**Краткие сообщения**

О возможности получения препарата хондроитинсульфата из рыб балтийской акватории. *Е.С. Землякова, О.Я. Мезенова* ..... 31

Цитофизиологические особенности регенерации растений пшеницы в каллусной культуре *in vitro*. *А.А. Катасонова* ..... 33

Универсальный аналитический комплекс модульного типа для контроля биотехнологических процессов. *Л.П. Кислякова, Ю.Я. Кисляков* ..... 35

Моделирование каталитических свойств рекомбинантной L-аспарагиназы *Erwinia carotovora* с целью создания эффективного противолейкозного препарата. *Ю.В. Красоткина, А.Н. Кучумова, Н.Н. Соколов* ..... 37

Регуляторы роста и развития растений в технологии возделывания сельскохозяйственных культур. *Е.С. Роньжина* ..... 38

**Обзоры**

Биодеградация ЭДТА. *Э.Г. Дедюхина, Т.И. Чистякова, И.Г. Минкевич* ..... 40

Перспективы развития производства биотоплива в России. Сообщение 2: Биоэтанол. *Р.Г. Василев* ..... 50

**Страницы истории**

К 100-летию со дня рождения Александра Тодда, выдающегося химика XX столетия, одного из создателей фундамента современной молекулярной биологии.

*В.С. Воробьев, О.В. Воробьева* ..... 61

Юбилейные и знаменательные даты 2007 года ..... 71

**Хроника**

События первого полугодия 2007 года ..... 74

**Информация**

Предстоящие мероприятия 2007 года ..... 77

**Правила для авторов** ..... 78

**Исправления** ..... 79

CONTENTS

**Column of the editor-in-chief**

To readers. *R.G. Vasilov* .....4

**Original articles**

Assimilation of triglycerides and their hydrolysis products in yeasts *Yarrowia lipolytica*.

*S.V. Kamzolova, I.G. Morgunov, T.N. Kozyreva, T.V. Finogenova* .....5

A novel site-specific endonuclease *GluI* recognizes methylated DNA sequence 5'-G(5mC)↓NG(5mC)-3'/3'-(5mC)GN↓(5mC)G. *V.A. Chernukhin, E.V. Chmuzh, Yu.E. Tomilova, T.N. Nayakshina,*

*D.A. Gonchar, V.S. Dedkov, S.Kh. Degtyarev* .....13

Stimulation and inhibition of cell growth in culture media modified with electric field.

*A.I. Miroshnikov* .....18

Pullulan producing by yeast-like fungus *Aureobasidium pullulans* VKPM F-571.

*A.A. Shubakov, E.A. El'kina, V.E. Larina* .....26

**Short communications**

The opportunity to acquire a drug chondroitin sulphate from the Baltic sea aquatorium fishes.

*E.S. Zemlyakova, O.Ya. Mezenova* .....31

Cytophysiological features of regeneration of wheat plants in callus culture in vitro.

*A.A. Katasonova* .....33

Universal analytical complex of modular type for the control of biotechnological processes.

*L.P. Kislyakova, Yu.Ya. Kislyakov* .....35

Modelling of catalytic properties of *Erwinia carotovora* recombinant L-asparaginase for development of effective antileukemic drug. *Yu.V. Krasotkina, A.N. Kuchumova, N.N. Sokolov*.....37

Regulators of growth and development of plants in technology of cultivation of agricultural crops.

*E.S. Ron'jina* .....38

**Reviews**

EDTA biodegradation. *E.G. Dedyukhina, T.I. Chistyakova, I.G. Minkevitch*.....40

Perspectives of development of biofuel production in Russia. The report 2: a bioethanol. *R.G. Vasilov* .....50

**Pages of history**

On the centenary of the birth of Alexander Todd, an outstanding chemist of 20<sup>th</sup> century, one of founders of the base of the modern molecular biology.

*V.S. Vorobyev, O.V. Vorobyeva* .....61

Anniversary and significant dates 2007 .....71

**The chronicle**

Events of the first half-year 2007 .....74

**The information**

Forthcoming actions 2007 .....77

**Rules for authors** .....78

**Errata** .....79

## К читателям

Во втором номере 2007 года мы продолжаем серию публикаций фундаментальных исследований, проводимых в Пуцзино и Новосибирске.

Наряду с этим очень важная прикладная тема биодegradации поднимается в обзоре сотрудников Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН (Дедюхина Э.Г. и др.). Данный высокопрофессиональный анализ хорошо введет читателя в суть столь значимого для настоящего времени направления.

Актуальной проблеме посвящена работа д.б.н. А.И. Мирошникова (Институт биофизики клетки РАН) — в ней рассматривается вопрос о модификации питательных сред электрическим полем с целью влияния на рост клеток *in vitro*.

Результаты тщательного исследования представили биотехнологи из Сыктывкара: они создали оптимальные условия для биосинтеза глюкана — пуллулана дрожжеподобным грибом *A. pullulans*.

Продолжен цикл публикаций по биотопливу. В этом номере рассматривается вопрос о месте и значении биоэтанола в мире и о перспективах его применения в России.

Обстоятельная статья подготовлена к 100-летию выдающегося химика XX века, лауреата Нобелевской премии, Лорда Александра Тодда, прославившегося своими открытиями в области химии нуклеотидов и деятельностью по укреплению международной кооперации ученых. Значительный вклад внесен им и в развитие научных отношений Великобритании и России — известны его творческие контакты с А.Н. Несмеяновым, М.М. Шемякиным, Ю.А. Овчинниковым. Исторический материал помещен также к 80-летию открытия Г. Меллером радиационного мутагенеза.

У журнала появились первые подписчики. Надеемся и на активность со стороны авторов, особенно молодежи, работающих в сфере биотехнологии и физико-химической биологии.

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

## АССИМИЛЯЦИЯ ТРИГЛИЦЕРИДОВ И ПРОДУКТОВ ИХ ГИДРОЛИЗА У ДРОЖЖЕЙ *YARROWIA LIPOLYTICA*

С.В. КАМЗОЛОВА, И.Г. МОРГУНОВ\*, Т.Н. КОЗЫРЕВА, Т.В. ФИНОГЕНОВА

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН,  
Пушино, Московская область*

При ассимиляции подсолнечного масла природным штаммом дрожжей *Yarrowia lipolytica* ВКМ У-2373 содержание глицерина и свободных жирных кислот, образованных в результате гидролиза триглицеридов, поддерживается постоянным. Глицеролкиназа — ключевой фермент метаболизма глицерина — и ферменты глиоксилатного цикла (изоцитратлиаза и малатсинтаза), вовлеченные в метаболизм жирных кислот, индуцируются в первые часы роста. Их активность существенно не изменяется в ходе культивирования, что позволяет заключить одновременное потребление из среды глицерина и жирных кислот.

*Ключевые слова:* подсолнечное масло, глицерин, олеиновая кислота, липаза, глиоксилатный цикл, *Yarrowia lipolytica*.

В последние десятилетия в связи с удорожанием нефтепродуктов и ухудшением экологической обстановки резко возрос интерес к использованию возобновляемых источников углерода, получаемых из растительного сырья. Особое внимание уделяется использованию растительных масел (подсолнечного, рапсового, пальмового, соевого и др.) в различных отраслях промышленности. Наряду с увеличением площадей под посев масличных культур создаются новые технологии производства биодизеля и машинных масел из растительного сырья. Широкие перспективы открываются и для применения жиров растительного и животного происхождения в биотехнологии. Различные штаммы дрожжей *Yarrowia lipolytica* культивируют на жиросодержащих средах с целью получения микробных липидов [1], липаз [2, 3], лимонной кислоты [4, 5].

Использование тех или иных источников углерода для целей микробиологического синтеза ставит задачи изучения механизмов ассимиляции этих соединений, путей их превращения в конечный продукт и возможностей регуляции процессов биосинтеза. В связи с этим необходимо отметить, что пути метаболизма растительных масел и продуктов их гидролиза находятся на начальной стадии изучения.

Целью настоящего исследования явилось изучение путей ассимиляции триглицеридов и продуктов их гидролиза — глицерина и олеиновой кислоты — природным штаммом *Y. lipolytica* ВКМ У-2373.

### Материалы и методы исследования

В работе использовали природный штамм дрожжей *Y. lipolytica* ВКМ У-2373. В коллекции лаборатории *Y. lipolytica* поддерживали при температуре +4 °С на агаризованной среде Ридер с парафином (1%), пересевы проводили раз в 3 месяца.

Культивирование дрожжей проводили в колбах объемом 750 мл с 100 мл среды Ридер и в ферментере АНКУМ-2М объемом 10 л (исходный объем среды 5,0 л). Автоматически поддерживали температуру (29,0±0,1 °С) и рО<sub>2</sub> (55–60% от насыщения), рН среды на уровне 5,0 (введением 10%-ного раствора NaOH). Среда имела следующий состав (в г/л): подсолнечное масло, глицерин, олеиновая кислота (концентрация субстратов указана в тексте); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (концентрация субстратов указана в тексте); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2; MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 1,4; Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0,4; NaCl, 0,5; удвоенные микроэлементы по Буркгольдеру [6]; дрожжевой экстракт «Difco», 0,5; тиамин, 0,0005. Время культивирования указано в тексте.

Методы определения биомассы, содержания масла, количества азота и глицерина, расчета удельной скорости роста дрожжей (μ) подробно описаны ранее [4, 7].

\* Автор для переписки:

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



Для определения активностей ферментов клетки отбирали через 6, 12 и 24 ч культивирования. Активности всех ферментов, за исключением липазы, определяли в бесклеточном экстракте. Активность липазы определяли в клеточной суспензии без дезинтеграции клеток ранее разработанным титриметрическим методом [4]. Для количественного определения липазы в процессе культивирования дрожжей использовали титриметрический метод. Количество фермента, катализирующего образование 1 микромоля жирных кислот в 1 мл культуральной жидкости за 1 минуту при 30 °С, было принято за единицу активности липазы (Ед./мл). Липазу выражали в Ед./мг биомассы.

Электрофорез проводили в 10%-ном полиакриламидном геле с 10% додецилсульфатом натрия на приборе для вертикального электрофореза Mini-Protean 3 («Bio-Rad», США). Использовали наборы стандартных гелей и реактивов той же фирмы. Окрашивание препаратов белка проводилось Coomassie Brilliant Blue R-250. Молекулярную массу денатурированного белка определяли с помощью молекулярных маркеров:  $\beta$ -галактозидаза *E. coli* (116000 Да), БСА (66200 Да), овальбумин (45000 Да), лактатдегидрогеназа (35000 Да), эндонуклеаза рестрикции *Bsp* 981 (25000 Да),  $\beta$ -лактоглобулин (18400 кДа), лизозим (14400 Да) из набора для определения молекулярной массы Fermentas (Литва).

Для приготовления бесклеточного экстракта клетки отделяли от среды центрифугированием (5000 г, 10 мин.) и дважды промывали 2% раствором NaCl. Клетки ресуспендировали в 50 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,5, содержащем 1 мМ ЭДТА, 5 мМ ДТТ и 0,3 мМ фенилметилсульфанилфторид, и разрушали с применением стеклянных бус «балотины» (100–150 мкм) на планетарной мельнице при 1000 об./мин. в течение 3 мин. Суспензию, полученную после разрушения, центрифугировали при 10000 г в течение 30 мин. для удаления неразрушенных клеточных фрагментов. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд [8]. В качестве стандарта использовали БСА.

Были определены активности глицеролкиназы (КФ 2.7.1.30), цитратсинтазы (КФ 4.1.3.7) (ЦС), аконитазы (КФ 4.2.1.3) (АК), НАД-(КФ 1.1.1.41) и НАДФ-(КФ 1.1.1.42)-зависимых изоцитратдегидрогеназ (ИДГ) и двух ключевых ферментов глиоксилатного цикла (ГЛЦ) — изоцитратлиазы (КФ 4.1.3.1) (ИЛ) и малатсинтазы (КФ 4.1.3.2) (МС) ранее описанными методами [9, 10]. Во всех случаях проводилось не менее 3–5 экспериментов, в каждом из которых делалось 3

параллельных определения соответствующей активности. Активность ферментов выражали в микромолях продукта, образующегося за 1 мин. на 1 мг белка гомогената.

## Результаты и обсуждение

**1. Рост *Y. lipolytica* на полноценной среде с подсолнечным маслом и ассимиляция продуктов гидролиза — глицерина и жирных кислот.** Дрожжи *Y. lipolytica* (*C. lipolytica*) способны ассимилировать широкий спектр жиров животного и растительного происхождения [1–5]. Это свойство является таксономической характеристикой данных дрожжей [11].

По своему химическому строению жиры представляют собой смесь сложных эфиров трехатомного спирта глицерина и высокомолекулярных жирных кислот.

Начальным этапом ассимиляции триглицеридов является их гидролиз липазами с образованием глицерина и жирных кислот (рис. 1). Ассимиляция жирных кислот до ацетил-КоА происходит через  $\beta$ -окисление. Индукция ГЛЦ, включающего два фермента: ИЛ и МС, необходима для утилизации жирных кислот. Глицерин проникает в клетки посредством простой диффузии, и его дальнейшая ассимиляция до ацетил-КоА происходит по фосфорилирующему пути. Ранее в бесклеточных экстрактах *Y. lipolytica* обнаружены только активности ферментов фосфорилирующего пути ассимиляции глицерина — глицеролкиназа (КФ 2.7.1.30) (ГК) и две глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (НАД- и ФАД-зависимые) (Г-3-ФДГ), а ферменты, катализирующие реакции окислительного пути, — НАД-зависимая глицеролдегидрогеназа, превращающая глицерин в диоксиацетон, и диоксиацетонкиназа отсутствовали [10]. При росте на глицерине в клетках активно функционирует цикл трикарбоновых кислот (ЦТК), а ГЛЦ не оперирует и анаплеротическую роль выполняет пируваткарбоксилаза, осуществляющая конденсацию пирувата и бикарбоната и образование оксалоацетата [10].

Еще в 1972 г. И.С. Звягинцевой с соавт. [12] было выдвинуто предположение, что основная часть липазной активности у дрожжей *C. lipolytica*, осуществляющей гидролиз жиров, структурно связана с клеточной стенкой. Позднее другими исследователями отмечалось формирование супрамолекулярной структуры: клеточная стенка — эмульгированные жиры — липаза [13]. Обращает внимание на то, что при полном исчерпании из среды одного из компонентов ассоциации — жира наблюдается реализация липазы в культуральную жидкость. В последние годы охарактеризованы, по крайней мере, 6 генов,





кодирующих липазы. Ген LIP2 кодирует внеклеточную липазу Lip2p [3], которая гидролизует длинноцепочечные триглицериды, в особенности олеиновые остатки. Совсем недавно было показано, что два гена LIP7 (AJ549519) и LIP8 (AJ549520) кодируют две липазы, связанные с клеточной стенкой дрожжей [14].

В данной работе активность липазы измеряли в культуральной жидкости, содержащей клетки дрожжей и среду культивирования, что позволило учесть при измерении внеклеточную липазу, липазы, связанные с клеточной стенкой и каплями жира.

Продуктами гидролиза триглицеридов масел являются ди-, моноглицериды, глицерин и свободные жирные кислоты. С целью изучения путей их ассимиляции *Y. lipolytica* выращивали на полноценной среде (подсолнечное масло — 10,0 г/л,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  — 5,0 г/л) в ферментере объемом 10,0 л с исходным объемом 5,0 л, автоматически поддерживали рН среды  $5,0 \pm 0,1$  и  $\rho\text{O}_2$  — 55–60% (от насыщения). Типичная кривая роста *Y. lipolytica* представлена на рисунке 2. Логарифмическая фаза роста длится до 12 ч, следующая фаза — фаза замедления роста до 24 часов, и затем наступает стационарная фаза, вызванная исчерпанием масла из среды, так как уровень остаточного азота в среде высокий и составлял 630 мг/л. К 27 ч культивирования происходило накопление 10 г/л биомассы.

На основании данных, полученных на прямолинейном отрезке логарифмической кривой роста, была рассчитана максимальная удельная скорость роста ( $\mu_{\text{max}}$ ), равная 0,230 час<sup>-1</sup>. Это значение ниже величины  $\mu_{\text{max}}$  у *Y. lipolytica* при росте на рапсовом масле [7] и сравнимо со значениями для *Y. lipolytica*, растущих на жирных кислотах [1, 15]. При переходе в фазу замедления роста величина  $\mu$  постепенно снижается до 0,053 ч<sup>-1</sup> и далее до 0,028 ч<sup>-1</sup> в конце фазы замедления.

Для характеристики эффективности образования биомассы использовали показатель выхода биомассы по массе ( $Y_x/s$ ), который составлял 1,11 и был выше величины, полученной у *Y. lipolytica* при росте на рапсовом масле [7].

В первые 6 ч роста отмечалось резкое увеличение активности липазы (до 10,62 Ед./мг биомассы). После 9 ч культивирования активность липазы снижалась до 6,29 Ед./мг биомассы, при этом рост культуры продолжался, причем величина  $\mu$  в этот период составляла 0,209 ч<sup>-1</sup> и близка к  $\mu_{\text{max}}$ , которое культура имела в среде с избытком всех компонентов. Падение активности липазы, вероятно, связано с недостаточным содержанием остаточного масла в среде. Ранее при культивировании *Y. lipolytica*

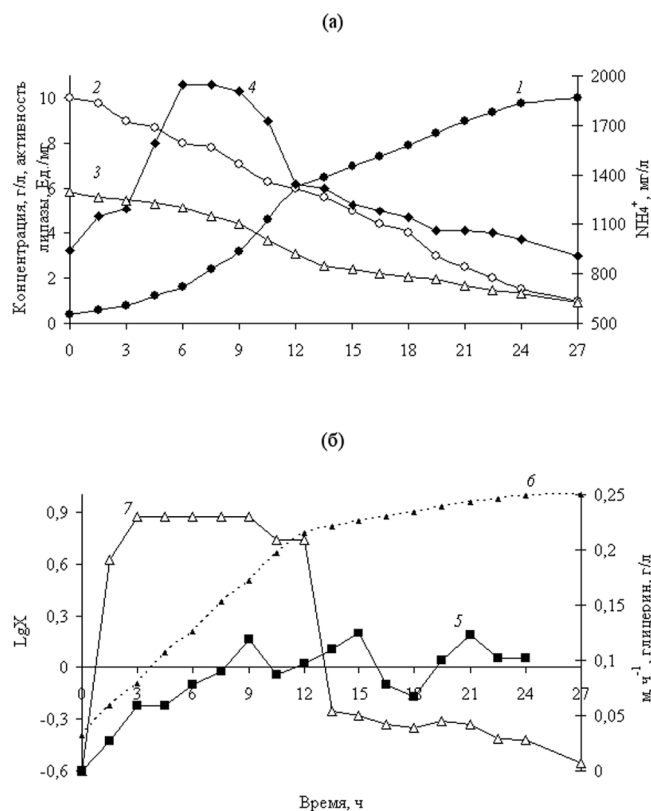


Рис. 2. Кинетика роста природного штамма *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373, потребления масла, азота, активность липазы (а), содержание глицерина и рассчитанные параметры LgX и величина  $\mu$  (б) при рН среды 5,0 на полноценной среде.

1 — биомасса, 2 — масло, 3 — азот, 4 — липаза, 5 — глицерин, 6 — LgX, 7 —  $\mu$

на полноценной среде показано, что для максимальной активности липазы концентрация рапсового масла в среде должна быть не менее 5,0 г/л [4]. При переходе клеток в фазу замедленного роста активность липазы снижена в 1,8 раз по сравнению с клетками, отобранными в логарифмической фазе.

В ходе культивирования измеряли уровень глицерина и свободных жирных кислот. Содержание глицерина практически не изменялось и поддерживалось на уровне 0,059–0,125 г/л. Качественный анализ внеклеточных липидов (содержание три-, ди-, моноглицеридов и свободных жирных кислот в среде) не обнаружил существенных изменений в уровне свободных жирных кислот в ходе культивирования (данные не представлены). Подобные закономерности были нами отмечены и при культивировании *Y. lipolytica* на рапсовом масле [7].

Так как в ходе культивирования не накапливается ни один из продуктов гидролиза масла, можно было пред-

положить, что потребление глицерина и жирных кислот дрожжами *Y. lipolytica* происходит одновременно.

Необходимо отметить, что одновременное потребление из среды двух субстратов не является типичным для микроорганизмов. Традиционно считается, что микроорганизмы при росте на двух и более субстратах используют преимущественно углеводы — в сравнении с другими источниками углерода. Глюкоза и другие, быстро утилизируемые углеродные субстраты репрессируют гены, кодирующие ферменты, ответственные за метаболизм других источников углерода. Этот феномен, известный как катаболитная репрессия, позволяет микроорганизмам более эффективно использовать углеродные субстраты, присутствующие в среде.

Модели, описывающие молекулярные механизмы катаболитной репрессии, были разработаны для бактерий *E. coli*. Типичные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* также являются объектами катаболитной репрессии [16, 17], хотя механизмы данного феномена у дрожжей менее изучены по сравнению с бактериями. Степень катаболитной репрессии тех или иных ферментов может сильно различаться. Например, активность инвертазы у дрожжей *S. cerevisiae* в присутствии глюкозы снижается в 800 раз, в то время как активности АК, цитохром С оксидазы и ИДГ — менее чем в 10 раз [17]. Дрожжевая ИЛ рассматривается как конститутивный фермент, подвергающийся катаболитной репрессии. Известно, что фосфоенолпируват является тонким ингибитором ИЛ у ряда бактерий, грибов и водорослей,  $K_i$  для этого соединения очень низкое — 0,13–0,20 мМ [16]. Еще одним сильным ингибитором ИЛ является пируват,  $K_i$  для этого соединения у *S. guilliermondii* равно 0,8 мМ, а у *S. tropicalis* — 0,5 мМ [17].

С целью изучения особенностей функционирования начальных этапов ассимиляции субстрата ЦТК и ГЛЦ дрожжи *Y. lipolytica* выращивали на подсолнечном масле (10 г/л), олеиновой кислоте (10 г/л) или глицерине (20 г/л).

**2. Активности ферментов у *Y. lipolytica* при росте на масле, глицерине и олеиновой кислоте.** Были определены активности следующих ферментов: липазы, катализирующей первый этап гидролиза триглицеридов, ГК, четырех ферментов ЦТК — ЦС, АК, НАД-ИДГ и НАДФ-ИДГ и двух ферментов ГЛЦ — ИЛ и МС. Результаты определения активностей ферментов в ходе ассимиляции субстратов представлены в таблице 1.

Активность липазы была высокой в клетках, растущих на масле, и низкой в клетках, растущих на глицерине или олеиновой кислоте. Ингибирующее действие

0,2% олеиновой кислоты на активность общей липазы у дрожжей *S. lipolytica* показано И.С. Звягинцевой [18]. Также в литературе имеются данные и о стимулирующем влиянии олеиновой кислоты на активность внеклеточной липазы LIP2 [2, 3], что, вероятно, можно объяснить тем, что продукция липазы может регулироваться на уровне секреции.

Индукция липазы в клетках при росте на подсолнечном масле и ее отсутствие при росте на глицерине или олеиновой кислоте была подтверждена методом SDS-электрофореза в ПААГ. Для приготовления проб в суспензию клеток добавляли 0,2%-ный раствор Triton X-100. Клетки отделяли центрифугированием. При этом липаза, адсорбированная на поверхности клеточных стенок, переходила в раствор. Пробы использовали для SDS-электрофореза в 10% ПААГ. Как видно на рисунке 3, наибольшая индукция липазы (LIP2; Mr 38000–39000 Да) наблюдалась при выращивании клеток на подсолнечном масле. В пробах, приготовленных из клеток, выращенных на глицерине или олеиновой кислоте, полос белка с данной молекулярной массой не обнаружено.

При ассимиляции масла с первых часов культивирования (6 ч) наблюдается индукция ГК, активность которой на 30% снижена в сравнении с активностью фермента глицерин-растущих клеток, но существенно выше активности фермента у клеток, растущих на олеиновой кислоте. В последующие часы культивирования (12 и 24 ч) активность ГК у дрожжей при росте на масле поддерживалась на постоянно высоком уровне, что, вероятно, связано с активным потреблением глицерина, непрерывно образуемого в ходе всего процесса ассимиляции масла.

У дрожжей при росте на масле с первых часов культивирования 96 ч индуцировались и ферменты ГЛЦ — ИЛ и МС. Индукция ГЛЦ при росте дрожжей на масле в первые часы роста связана, по-видимому, с ассимиляцией в этот период жирных кислот, образующихся при гидролизе масла. В клетках, растущих на олеиновой кислоте, активность ИЛ в 14,7 и МС в 10 раз выше по сравнению с глицерин-растущими клетками. В последующие часы роста на масле активности ИЛ и МС сохранялись на высоком уровне, что, вероятно, обусловлено активным потреблением образуемых жирных кислот в ходе всего процесса. Накопление глицерина в этих условиях незначительно (до 0,119 г/л) (см. рис. 2), и продукты его окисления — фосфоенолпируват и пируват, образующиеся в низких концентрациях, не являются ингибирующими активности ферментов ГЛЦ.

Таблица 1

Активности ферментов ЦТК и ГЛЦ (мкмоль/мин на мг белка) при росте *Y. lipolytica* на средах, содержащих подсолнечное масло, олеиновую кислоту и глицерин в качестве источника углерода

Источник углерода	Время (ч)	Липаза (Ед./мг биомассы)	ГК	ЦТК				ГЛЦ	
				ЦС	АК	НАД-ИДГ	НАДФ-ИДГ	ИЛ	МС
Подсолнечное масло	6	3,04	0,254±0,03	2,04±0,1	0,92±0,1	0,06±0,01	0,058±0,01	0,089±0,02	0,054±0,01
	12	9,56	0,254±0,03	2,44±0,1	1,02±0,1	0,06±0,01	0,068±0,01	0,109±0,02	0,064±0,01
	24	9,16	0,254±0,03	1,96±0,1	0,873±0,1	0,058±0,01	0,068±0,01	0,093±0,01	0,035±0,005
Глицерин	6	1,7	0,363±0,03	0,82±0,05	0,330±0,06	0,105±0,02	0,120±0,02	0,009±0,003	0,012±0,004
	12	1,7	0,360±0,03	0,9±0,05	0,430±0,06	0,115±0,02	0,132±0,02	0,009±0,003	0,014±0,004
	24	1,7	0,300±0,03	0,835±0,05	0,420±0,05	0,117±0,02	0,152±0,02	0,01±0,003	0,010±0,004
Олеиновая кислота	6	0,527	0,112±0,03	1,7±0,1	0,53±0,06	0,1±0,02	0,07±0,02	0,133±0,05	0,1±0,04
	12	0,527	0,112±0,03	1,9±0,1	0,53±0,06	0,1±0,02	0,06±0,02	0,134±0,05	0,13±0,04
	24	0,527	0,112±0,03	1,9±0,1	0,52±0,05	0,1±0,02	0,07±0,02	0,144±0,05	0,12±0,04

Значения представлены как среднее арифметическое из трех измерений ± стандартное отклонение.

Примечание: ГК – глицеролкиназа, ЦС – цитратсинтаза, АК – аконитаза, НАД-ИДГ – НАД-изоцитратдегидрогеназа, НАДФ-ИДГ – НАДФ-изоцитратдегидрогеназа, ИЛ – изоцитратлиаза, МС – малатсинтаза

Об активном функционировании ГЛЦ при ассимиляции масла, так же, как и при ассимиляции олеиновой кислоты, свидетельствуют и повышенные активности ЦС (в 2 раза) и АК (в 2 раза), ферментов, вовлеченных как в ЦТК, так в ГЛЦ у дрожжей. Активности НАД-ИДГ и НАДФ-ИДГ – ферментов, не участвующих в ГЛЦ, были более высокими в глицерин-растущих клетках.

Основная физиологическая роль ГЛЦ у дрожжей заключается, по-видимому, в ресинтезе оксалоацетата для непрерывного функционирования ЦТК. При ассимиляции глицерина ресинтез оксалоацетата может осуществляться за счет карбоксилирования пирувата и фосфоенолпирувата и необходимость в функционировании ГЛЦ как поставщика оксалоацетата в ЦТК отсутствует (активности ИЛ и МС у глицерин-растущих

клеток очень низкие – 0,009 и 0,012 мкмоль/мин мг белка, соответственно). В литературе имеются сведения о низкой активности ИЛ при росте *Y. lipolytica* на среде с глюкозой [19] и глицерином [10].

### Заключение

Начальным этапом ассимиляции триглицеридов является их гидролиз липазами, в результате которого в среде появляются два типа продуктов – глицерин и ненасыщенные жирные кислоты. В настоящем исследовании на основании динамики накопления и потребления глицерина и жирных кислот, а также активности ферментов, участвующих в метаболизме продуктов гидролиза, определена последовательность потребления клеткой каждого

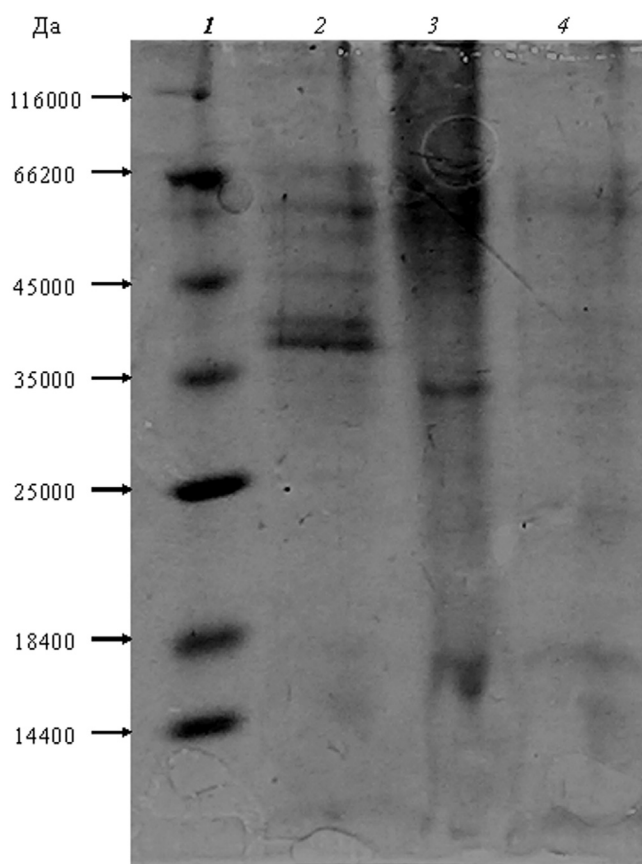


Рис. 3. Электрофорез внеклеточной липазы дрожжей *Y. lipolytica*.

1 — набор маркерных белков, 2 — препарат липазы при росте на масле, 3 — препарат липазы при росте на глицерине, 4 — препарат липазы при росте на олеиновой кислоте

из продуктов гидролиза и показано, что потребление глицерина и жирных кислот происходит одновременно в ходе роста дрожжей *Y. lipolytica* на масле.

Авторы выражают благодарность Григоренко Л.П. за техническую помощь в проведении экспериментов.

### Литература

1. Papanikolaou S., Muniglia L., Chevalot I., Aggelis G., Marc I. Accumulation of a cocoa-butter-like lipid by *Yarrowia lipolytica* cultivated on agro-industrial residues // *Curr. Microbiol.* — 2003. — Vol. 46. — P. 124–130.
2. Ota Y., Oikawa S., Morimoto Y., Minoda Y. Purification and some properties of cell-bound lipase from *Saccharomycopsis lipolytica* // *Agric. Biol. Chem.* — 1982. — Vol. 46. — P. 2885–2893.
3. Pignede G., Wang H., Fidalej F., Gaillardin G., Seman G., Mnicaud J.M. Characterization of an extracellular lipase

encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica* // *J. Bacteriol.* — 2000. — Vol. 182. — P. 2802–2810.

4. Kamzolova S.V., Morgunov I.G., Aurich A., Perevoznikova O.A., Shishkanova N.V., Stottmeister U., Finogenova T.V. Lipase secretion and citric acid production in *Yarrowia lipolytica* yeast grown on animal and vegetable fat // *Food Technol. Biotechnol.* — 2005. — Vol. 42. — P. 113–122.
5. Good D.W., Droniuk R., Lawford R.G., Fein J.E. Isolation and characterization of a *Saccharomycopsis lipolytica* mutant showing increased production of citric acid from canola oil // *Can. J. Microbiol.* — 1985. — Vol. 31. — P. 436–440.
6. Burkholder P.R., McVeigh J., Moyer D. Studies on some growth factors of yeasts // *J. Bacteriol.* — 1944. — Vol. 48. — P. 385–391.
7. Камзолова С.В., Финогенова Т.В., Лунина Ю.Н., Перевозникова О.А., Миначова Л.Н., Моргунов И.Г. Особенности роста на рапсовом масле и синтеза лимонной и изолимонной кислот у дрожжей *Yarrowia lipolytica* // *Микробиология.* — 2007. — Т. 76. — С. 26–32.
8. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* — 1976. — Vol. 72. — P. 248–254.
9. Лозинов А.Б., Глазунова Л.М., Ермакова И.Т. Активность ферментов цитратного, глиоксилатного и пентозофосфатного циклов при росте дрожжей на гексадекане и на глюкозе // *Микробиология.* — 1976. — Т. 45. — С. 33–40.
10. Моргунов И.Г., Ильченко А.П., Шарышев А.А. Ферменты метаболизма глицерина у дрожжей *Yarrowia (Candida) lipolytica* // *Микробиология.* — 1991. — Т. 56. — С. 258–266.
11. Lodder J. The yeasts. A taxonomic study. — Amsterdam: North Holland Published Company, 1970.
12. Звягинцева И.С., Ушаков В.М. Некоторые данные о локализации липазы *Candida lipolytica* // *Микробиология.* — 1972. — Т. 41. — С. 713–716.
13. Pereira-Meirelles F.V., Rocha-Leao M.H.M., Sant Anna G. A stable lipase from *Candida lipolytica* // *Appl. Biochem. Biotechnol.* — 1997. — Vol. 63–65. — P. 73–85.
14. Fickers P., Benetti P.H., Wache Y., Marty A., Mauersberger S., Smit M.S., Nicaud J.M. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications // *FEMS Yeast Res.* — 2005. — Vol. 5. — P. 527–543.
15. Papanikolaou S., Chevalot I., Komaitis M., Marc I., Aggelis G. Single Cell Oil (SCO) production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2002. — Vol. 58. — P. 308–312.
16. Entian K.D. and Shuller H.J. Glucose repression (catabolite repression) in yeast / In: *Yeast Sugar Metabolism. Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Applications*

- (Zimmerman F.K. and Entian K.D., Eds.). – Technomic Publishing, Basel, Switzerland, 1997. – P. 409–434.
17. *Gancedo J.M.* Carbon catabolite repression in yeast // *Eur. J. Biochem.* – 1992. – Vol. 206. – P. 297–313.
18. *Звягинцева И.С.* Липазная активность некоторых дрожжей // *Микробиология.* – 1972. – Т. 41. – С. 24–28.
19. *Ermakova I.T., Shishkanova N.V., Melnikova O.F., Finogenova T.V.* Properties of *Candida lipolytica* mutants with the modified glyoxylate cycle and their ability to produce citric and isocitric acid. I. Physiological, biochemical and cytological characteristics of mutants grown on glucose or hexadecane // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1986. – Vol. 23. – P. 372–377.

## ASSIMILATION OF TRIGLYCERIDES AND THEIR HYDROLYSIS PRODUCTS IN YEASTS *YARROWIA LIPOLYTICA*

S.V. KAMZOLOVA, I.G. MORGUNOV, T.N. KOZYREVA, T.V. FINOGENOVA

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

Under assimilation of sunflower oil by native strain of yeast *Yarrowia lipolytica* VKM Y-2373 the content of glycerol and free fatty acids resulting after triglycerides hydrolysis was constant. Glycerol kinase, a key enzyme of glycerol exchange, and glyoxylate cycle enzymes (isocitrate lyase and malate synthase), involved in fatty acids metabolism, were induced at the first hours of yeasts growth. Their activities were not changed essentially during culturing, that gave an evidence for the simultaneous consumption of glycerol and fatty acids from surroundings.

*Keywords:* sunflower oil, glycerol, oleinic acid, lipase, glyoxylate cycle, *Yarrowia lipolytica*.



## НОВАЯ 5-МЕТИЛЦИТОЗИН-ЗАВИСИМАЯ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА GluI УЗНАЕТ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ДНК 5'-G(5mC)↓NG(5mC)-3'/3'-(5mC)GN↓(5mC)G-5'

В.А. ЧЕРНУХИН\*, Е.В. ЧМУЖ, Ю.Э. ТОМИЛОВА, Т.Н. НАЯКШИНА,  
Д.А. ГОНЧАР, В.С. ДЕДКОВ, С.Х. ДЕГТЯРЕВ

НПО «СибЭнзим», Новосибирск

Из бактериального штамма *Glacial ice bacterium* GL24 была выделена и охарактеризована новая сайт-специфическая эндонуклеаза GluI. Этот фермент узнает метилированную последовательность ДНК 5'-G(5mC)↓NG(5mC)-3'/3'-(5mC)GN↓(5mC)G-5' и расщепляет ее, как указано стрелкой. Благодаря своей способности расщеплять только высокометилованную ДНК фермент GluI может найти практическое применение в генно-инженерных работах, а также для определения статуса метилирования ДНК эукариот.

**Ключевые слова:** системы рестрикции-модификации, сайт-специфические эндонуклеазы, метилированная ДНК.

В настоящее время известно только четыре сайт-специфические эндонуклеазы, которые узнают и расщепляют исключительно метилированную ДНК, не требуют кофакторов помимо ионов  $Mg^{2+}$  и, вследствие этого, могут рассматриваться как ПМ сайт-специфические эндонуклеазы [1]. Это — эндонуклеаза рестрикции DpnI, которая узнает и расщепляет последовательность нуклеотидов 5'-G(6mA)↓TC-3' [2], и описанные в наших работах сайт-специфические эндонуклеазы BisI, GluI и BliI, узнающие и расщепляющие нуклеотидные последовательности ДНК 5'-G(5mC)↓NGC-3' [3], 5'-G(5mC)↓G(5mC)-3'/3'-(5mC)G↓(5mC)G-5' [4, 5] и 5'-G(5mC)N↓GC-3' [6], соответственно.

В данной работе описан новый представитель этой группы, фермент GluI, являющийся изоизомером сайт-специфической эндонуклеазы BisI [3], однако требующий для проявления активности более глубокого метилирования сайта узнавания. Фермент GluI узнает нуклеотидную последовательность ДНК 5'-G(5mC)↓NG(5mC)-3'/3'-(5mC)GN↓(5mC)G-5' и расщепляет ее, как указано стрелкой, с образованием однонуклеотидных 5'-выступающих концов.

### Материалы и методы

**Выращивание штамма-продуцента.** Выращивание штамма *Glacial ice bacterium* GL24 проводили в 20-литровом ферментере (ЛКВ, Швеция) при температуре 30 °С в питательной среде, содержащей 1% триптон (Organotechnie, Франция), 0,5% дрожжевой экстракт (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 на центрифуге J-2-21 (Beckman, США) при 5000 об/мин при 4 °С. В результате получали 100 г биомассы, которую хранили при -20 °С.

**Выделение фермента.** Все процедуры выделения фермента проводили при температуре 4 °С. 100 г замороженной биомассы клеток суспендировали в 250 мл буфера А (10 mM Трис-НСl, pH 7,4, 0,1 mM ЭДТА, 7 mM β-меркаптоэтанол, 0,01 % Тритон X-100), содержащего 0,05 M NaCl, 0,1 % Тритон X-100, 0,1 мг/мл лизоцима и 1 mM фенилметилсульфонилфторид (PMSF). Клетки разрушали ультразвуком на дезинтеграторе Soniprep 150 («MSE», Великобритания) 10 раз по 1 мин. с интервалами по 1 мин. для охлаждения суспензии. Лизат осветляли центрифугированием в течение 30 мин. при 12000 об/мин. на центрифуге J-2-21 (Beckman, США). Препарат фермента получали путем хроматографической очистки экстракта в четыре последовательные стадии на следующих сорбентах: 100 мл фосфоцеллюлозы P-11

\* 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

(«Whatman», Великобритания), 15 мл гидроксипатита («Bio-Rad», США), 4 мл гепарин-сефарозы («Bio-Rad», США), 10 мл гидроксипатита («Bio-Rad», США).

Первоначально супернатант наносили на колонку с фосфоцеллюлозой P-11, предварительно уравновешенную буфером А, содержащим 0,05 М NaCl. Колонку промывали 200 мл буфера А с 0,05 М NaCl, затем 1000 мл линейного градиента концентрации NaCl (0,2 М–0,95 М) в буфере А, собирая фракции по 10 мл. Фракции, содержащие эндонуклеазу, объединяли и наносили на колонку с гидроксипатитом, предварительно уравновешенную буфером В (5 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , рН 7,2, 0,1 мМ ЭДТА, 7 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол, 0,01% Тритон Х-100) с 0,02 М NaCl. Колонку промывали 30 мл буфера В, содержащего 0,02 М NaCl, затем проводили элюцию белка линейным градиентом концентрации  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,005 М–0,2 М) в буфере В объемом 400 мл, собирая фракции по 10 мл. Активные фракции объединяли, диализовали против 20 объемов буфера А с 0,02 М NaCl и наносили на колонку с гепарин-сефарозой, уравновешенную буфером А с 0,2 М NaCl. Колонку промывали 8 мл буфера А, содержащего 0,2 М NaCl. Фермент элюировали линейным градиентом концентрации NaCl (0,2 М–0,9 М) в буфере А объемом 120 мл, собирая фракции по 3 мл. Фракции, содержащие целевую активность, объединяли и наносили на колонку с гидроксипатитом, предварительно уравновешенную буфером В с 0,02 М NaCl. Колонку промывали 20 мл буфера В, содержащего 0,02 М NaCl. Элюцию сорбированного материала проводили линейным градиентом концентрации  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,005 М–0,17 М) в буфере В объемом 320 мл, собирая фракции по 6 мл. Активные фракции объединяли и диализовали против концентрирующего буфера (50% глицерин, 10 мМ Tris-HCl, рН 7,4, 0,1 мМ ЭДТА, 7 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол, 0,01 % Тритон Х-100, 0,1 М NaCl). Препарат хранили при  $-20^\circ\text{C}$ .

**Определение активности фермента.** В качестве субстрата для определения активности GluI использовали ДНК плазмиды рFsp4HI3, которая является производной плазмиды рFsp4HI2 [7]. Последняя содержит ген ДНК-метилтрансферазы Fsp4HI из *Flavobacterium* sp. 4H, которая модифицирует первое цитозиновое основание в последовательности нуклеотидов 5'-GCNGC-3' [7]. Таким образом, плазида рFsp4HI2 содержит метилированные сайты 5'-G(5mC)NGC-3'. Плазида рFsp4HI3 была получена в результате встраивания в плазмиду рFsp4HI2 по сайтам HindIII и Bsp19I следующего синтетического олигонуклеотидного дуплекса:

5' CATGGGCCGCGGCAGCTCGAATTCTAGA 3'  
3' CCGGCGCCGTCGAGCTTAAGATCTTCTGA 5'.

Полученная плазида рFsp4HI3 отличается от рFsp4HI2 четырехнуклеотидной заменой (в структуре дуплекса соответствующие нуклеотиды выделены жирным шрифтом), в результате которой образуется последовательность нуклеотидов 5'-GCCGCGGCAGC-3' (в структуре дуплекса эта последовательность подчеркнута), представляющая собой три перекрывающихся сайта 5'-GCNGC-3'. Поскольку плазида включает в себя ген ДНК-метилтрансферазы M.Fsp4HI, модифицирующей все эти три сайта, то в итоге в плазмиде появляется нуклеотидная последовательность 5'-G(5mC)GG(5mC)-3'/3'-(5mC)GC(5mC)G-5', содержащая 4 метилированных цитозиновых остатка и представляющая собой полностью метилированный сайт узнавания.

Как было предварительно установлено, наибольшую активность GluI проявляет в буфере следующего состава: 10 мМ Tris-HCl, рН 9,0, 7,5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 75 мМ NaCl, 1 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол. Поэтому все эксперименты по расщеплению ДНК ферментом GluI проводили в данном буфере.

Активность сайт-специфической эндонуклеазы GluI в хроматографических профилях определяли, инкубируя аликвоты из фракций с ДНК плазмиды рFsp4HI3, линейризованной рестриктазой BglII. Для этого к 10 мкл реакционной смеси, содержащей линейризованную ДНК плазмиды в реакционном буфере, добавляли аликвоту 2 мкл из соответствующей фракции хроматографического профиля. Реакционную смесь инкубировали 30 мин. при  $37^\circ\text{C}$ . Продукты реакции разделяли в 1%-ном агарозном геле.

За единицу активности (е.а.) принимали минимальное количество фермента, необходимое для полного расщепления 1 мкг ДНК плазмиды рFsp4HI3, гидролизованной эндонуклеазой рестрикции BglII, в течение 1 часа при температуре  $37^\circ\text{C}$  в 50 мкл реакционной смеси.

**Определение сайта узнавания и места расщепления ДНК.** Для определения специфичности GluI проводили гидролиз различных ДНК. В качестве субстратов для определения специфичности фермента использовали ДНК плазмид и фагов, а также синтетические олигонуклеотидные ДНК-дуплексы, содержащие или не содержащие метилированные основания.

Позиции гидролиза ДНК сайт-специфической эндонуклеазой GluI были установлены путем сравнения длин фрагментов, образующихся при расщеплении [ $^{32}\text{P}$ ]-меченных синтетических олигонуклеотидных дуплексов эндонуклеазами GluI и BspI. В качестве маркера длин



фрагментов использовали продукты частичного расщепления этих же дуплексов экзонуклеазой III из *E. coli* (EcoIII).

Расщепление ДНК проводили в оптимальных условиях (37 °С, реакционный буфер – 10 мМ TrisHCl, рН 9,0, 7,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 75 мМ NaCl, 1 мМ β-меркаптоэтанол) в течение 1 часа. Продукты расщепления плазмидной и фаговой ДНК разделяли гель-электрофорезом в 1,2% агарозе. Фрагменты ДНК, образующиеся в результате расщепления олигонуклеотидных дуплексов, разделяли путем электрофореза в денатурирующем 20% полиакриламидном геле (ПААГ) с 7 М мочевиной.

### Результаты и обсуждение

Новый фермент GluI был выделен из неидентифицированного штамма бактерии *Glacial ice bacterium* GL24 из коллекции микроорганизмов НПО «СибЭнзим». Этот штамм характеризуется следующими признаками.

Клетки представляют собой грамположительные аэробные нерегулярные, мелкие палочки, размером 0,5–(1–1,5) мкм, одиночные и образующие палисадные скопления, неподвижные, не образующие спор. На среде Лурия – Бертрани (ЛБ) штамм образует светло-коричневые, полупрозрачные небольшие (1–2 мм), округлые с ровными краями колонии. Температура роста – от 10 до 30 °С. Клетки продуцируют каталазу. Оксидаза не обнаружена.

Сайт-специфическую эндонуклеазу GluI, продуцируемую штаммом *Glacial ice bacterium* GL24, выделяли из клеточного экстракта путем последовательных хроматографий на сорбентах, как описано в разделе «Материалы и методы». Выход фермента составил 200 е.а./г сырой биомассы, концентрация – 1000 е.а./мл.

Эндонуклеаза GluI не гидролизует стандартные вирусные и плазмидные ДНК, используемые для нахождения и определения активности эндонуклеаз рестрикции, такие как ДНК фагов λ (dam<sup>+</sup>/dcm<sup>+</sup> и dam<sup>-</sup>/dcm<sup>-</sup>), T7, 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' [7], 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 [8]. При инкубации плазмид, несущих гены данных метилаз, с препаратом GluI гидролиз ДНК

также не наблюдается. Фермент GluI расщепляет только ДНК плазмиды рFsp4HI3, полученной, как указано в разделе «Материалы и методы». Эта плаزمид, благодаря имеющемуся в ней гену метилазы Fsp4HI, содержит метилированные последовательности 5'-G(5mC)NGC-3', а также один полностью метилированный сайт 5'-G(5mC)NG(5mC)-3'/3'-(5mC)GN(5mC)G-5'.

На рисунке 1 представлены результаты гидролиза ДНК плазмид рFsp4HI2 и рFsp4HI3, линейаризованных различными эндонуклеазами рестрикции и сайт-специфической эндонуклеазой GluI. Как видно из рисунка, плазмид рFsp4HI2 полностью расщепляется ферментом BisI, для которого последовательность 5'-G(5mC)NGC-3' является каноническим сайтом узнавания [3]. Фермент GluI не расщепляет плазмиду рFsp4HI2, однако он гидролизует ДНК плазмиды рFsp4HI3. Для определения места расщепления ДНК проводили совместный гидролиз ДНК плазмиды рFsp4HI3 сайт-специфической эндонуклеазой GluI и рестриктазами PciI, DseDI и BglII.

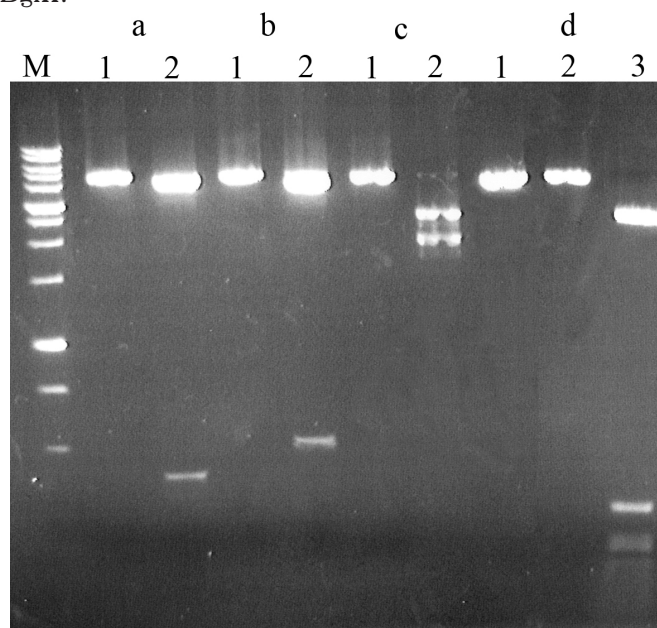


Рис. 1. Расщепление плазмидных ДНК эндонуклеазами GluI (дорожка 2) и BisI (дорожка 3).

a – плазмид рFsp4HI3, линейаризованная PciI, b – плазмид рFsp4HI3, линейаризованная DseDI, c – плазмид рFsp4HI3, линейаризованная BglII, d – плазмид рFsp4HI2, линейаризованная BglII, Дорожка 1 – соответствующая плазмид без гидролиза.

M – маркер молекулярной массы 1 Кб (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.

Сравнение длин фрагментов ДНК, получаемых при совместном гидролизе, показывает, что расщепление ДНК эндонуклеазой GluI происходит в сайте 5'-G(5mC)GG(5mC)-3'/3'-(5mC)GC(5mC)G-5'.

Для подтверждения этих данных и определения позиции гидролиза ДНК были проведены

эксперименты по расщеплению синтетических олигонуклеотидных дуплексов, содержащих последовательность 5'-GCNGC-3' с метилированными или неметилированными цитозиновыми основаниями (сайты узнавания подчеркнуты):

NN01: 5' GCTTGTACTTTAGCGGCATTGATTCTCACCCACG 3'  
 NN02: 5' CGTGGTGAGAATCAATGCCGCTAAAGTACAAGC 3'  
 NN1: 5' GCTTGTACTTTAG(5mC)GGCATTGATTCTCACCCACG 3'  
 NN2: 5' CGTGGTGAGAATCAATG(5mC)CGCTAAAGTACAAGC 3'  
 DD1: 5' GCTTGTACTTTAG(5mC)GG(5mC)ATTGATTCTCACCCACG 3'  
 DD2: 5' CGTGGTGAGAATCAATG(5mC)CG(5mC)TAAAGTACAAGC 3'  
 4mT: 5' GGGAAAAG(5mC)TG(5mC)AAAAGAGGAAAGGG 3'  
 4mA: 5' CCCTTTCCTCTTTTG(5mC)AG(5mC)TTTTCCC 3'

Как видно из рисунка 2, эндонуклеаза GluI расщепляет дуплексы DD1\*/DD2 и 4mT\*/4mA, содержащие полностью метилированную последовательность 5'-G(5mC)NG(5mC)-3', но не расщепляет дуплекс NN01\*/NN02, который содержит такую же неметилированную последовательность, а также дуплекс NN1\*/NN2, который содержит метилированную последовательность 5'-G(5mC)NGC-3'. Полученные данные доказывают, что сайт-специфическая эндонуклеаза GluI расщепляет только метилированную ДНК, причем сайтом узнавания новой сайт-специфической эндонуклеазы GluI является метилированная последовательность 5'-G(5mC)NG(5mC)-3'.

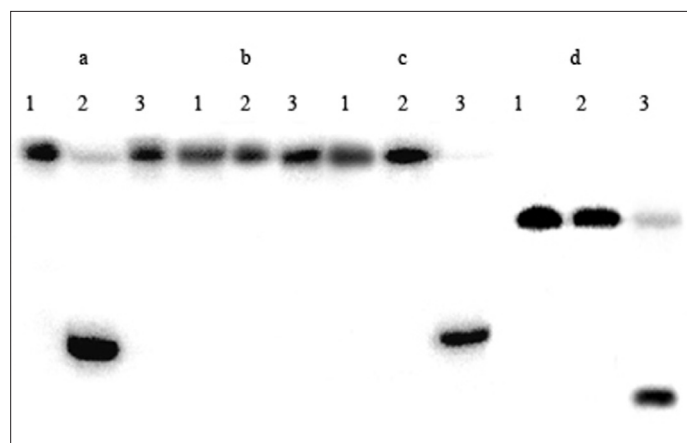


Рис. 2. Расщепление олигонуклеотидных дуплексов NN01\*/NN02 (a), NN1\*/NN2 (b), DD1\*/DD2 (c) и 4mT\*/4mA (d) эндонуклеазами Fsp4HI (сайт узнавания 5'-GCNGC-3', дорожка 2) и GluI (дорожка 3). Дорожка 1 — соответствующий дуплекс без гидролиза. Меченые олигонуклеотиды отмечены знаком «\*».

На рисунке 3 приведены результаты гидролиза олигонуклеотидного дуплекса DD1/DD2 эндонуклеазой GluI и BisI. Сравнение длин фрагментов, образуемых при расщеплении этого субстрата, указывает на то, что GluI расщепляет метилированный дуплекс с четырьмя C5-метилцитозинами так же, как BisI. Следовательно, GluI расщепляет сайт узнавания, как показано стрелками:

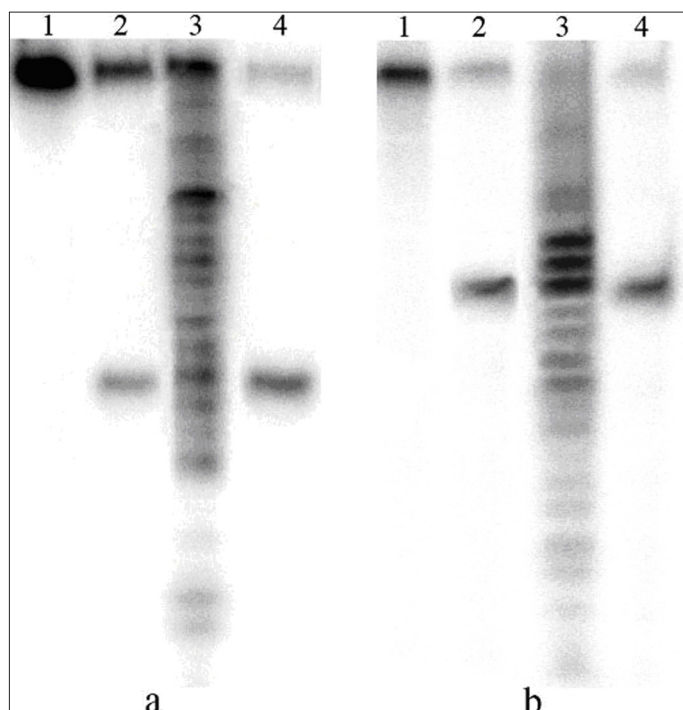


Рис. 3. Определение места расщепления ДНК эндонуклеазой GluI. a — дуплекс DD1\*/DD2, b — дуплекс DD2\*/DD1

Таким образом, в настоящей работе мы описали новую сайт-специфическую эндонуклеазу GluI, принадлежащую к редкой группе ферментов, которые узнают и расщепляют только метилированную ДНК. Нуклеотидная последовательность, узнаваемая новым ферментом, и место гидролиза ДНК совпадают с таковыми для фермента *BisI*, однако GluI, в отличие от *BisI*, не активен на субстратах с двумя метильными группами и расщепляет ДНК, содержащую полностью метилированный сайт узнавания. В дальнейшей работе мы планируем более детально исследовать влияние метилирования цитозиновых оснований внутри и вблизи узнаваемой последовательности на эффективность сайт-специфического гидролиза метилированной ДНК.

Гидролиз избыточно метилированной ДНК не является исключительным свойством нового фермента. В частности, ранее было показано, что эндонуклеаза *GlaI*, также являющаяся представителем группы ферментов подтипа ПМ, обнаруживает максимальную активность на полностью метилированной узнаваемой последовательности 5'-G(5mC)↓G(5mC)-3'/3'-(5mC)G↓(5mC)G-5' [5].

Ранее обсуждалась возможная роль ферментов, которые узнают и расщепляют только метилированную ДНК, в защите бактерий от заражения фагами, ДНК которых метилирована [4]. В частности, известно, что ряд бактериофагов содержит гены сайт-специфических ДНК-метилтрансфераз, что приводит к метилированию ДНК фагов [9]. Однако наличие такого свойства, как предпочтительное расщепление избыточно метилированной ДНК, свидетельствует в пользу существования каких-то других дополнительных функций данных ферментов в бактериальной клетке.

Мы полагаем, что GluI может 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, которая до сих пор остается недостаточно изученной [10].

#### Литература

1. Roberts R.J., Belfort M., Bestor, T., Bhagwat A.S., Bickle T.A. et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2003. – Vol. 31. – P. 1805–1812.
2. Lacks S. and Greenberg B.J. // *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. // *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., Михненкова Н.А., Гончар Д.А., Дегтярев С.Х. // *Биотехнология.* – 2006. – № 4. – С. 23–28.
5. Томилова Ю.Э., Чернухин В.А., Дегтярев С.Х. // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова.* – 2006. – Т. 2. – № 1. – С. 30–39.
6. Чернухин В.А., Томилова Ю.Э., Чмуж Е.В., Соколова О.О., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. // *Биотехнология (в печати).*
7. 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. // *Молекулярная биология.* – 2007. – Т. 41. – № 1. – С. 1–9.
8. Чернухин В.А., Каширина Ю.Г., Суханова К.С., Абдурашитов М.А., Гончар Д.А., Дегтярев С.Х. // *Биохимия.* – 2005. – Т. 70. – № 6. – С. 829–837.
9. Lange C., Noyer-Weidner M., Trautner T.A., Weiner M., Zahler S.A. // *Gene.* – 1991. – Vol. 100. – P. 213–218.
10. Costello J.F. and Plass C. // *J. Med. Genet.* – 2001. – Vol. 38. – P. 285–303.

Список сокращений: PMSF – фенилметилсульфонилфторид, БСА – бычий сывороточный альбумин, EcoIII – экзонуклеаза III из *E. coli*, ПААГ – полиакриламидный гель, е.а. – единица активности.

## A NOVEL SITE-SPECIFIC ENDONUCLEASE GluI RECOGNIZES METHYLATED DNA SEQUENCE 5'-G(5mC)↓NG(5mC)-3'/3'-(5mC)GN↓(5mC)G

V.A. CHERNUKHIN, E.V. CHMUZH, Yu.E. TOMILOVA, T.N. NAYAKSHINA, D.A. GONCHAR, V.S. DEDKOV, S.Kh. DEGTYAREV

*SibEnzyme SPA, Novosibirsk*

A novel site-specific endonuclease GluI from the bacterial strain GL24 has been isolated and characterized. The enzyme recognizes methylated DNA sequence 5'-G(5mC)N↓G(5mC)-3' and cleaves it as it is shown by arrow. Due to its ability to cleave only modified DNA GluI may be useful for genetic engineering experiments as well as for determination of DNA methylation status in eucariotes.

*Keywords:* restriction-modification systems, site-specific endonucleases, methylated DNA



## СТИМУЛЯЦИЯ И ИНГИБИРОВАНИЕ РОСТА КЛЕТОК ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ, МОДИФИЦИРОВАННОЙ ЭЛЕКТРИЧЕСКИМ ПОЛЕМ

А.И. МИРОШНИКОВ\*

*Институт биофизики клетки РАН, Пущино Московской обл.*

Изучена эффективность стимуляции и ингибирования клеток при культивировании в питательных средах, модифицированных электрическим полем в диафрагменном электролизере. В католите питательной среды М9 наблюдался стимулирующий эффект роста клеток *E. coli*, который характеризовали увеличением оптической плотности суспензии в процентах относительно контроля через 8 ч роста клеток. Ингибирующий эффект в анолите определяли по отсутствию изменения оптической плотности суспензии в процессе культивирования клеток. Эффективность воздействия обработанных растворов на рост клеток при разной продолжительности обработки — 10, 25 и 50 мин. — зависела от времени обработки. При обработке 10 мин. стимулирующий эффект в католите отсутствовал, при обработке 50 мин — достигал 25% в случае выращивания клеток при оптимальной температуре 37 °С. При понижении температуры культивирования до 20 °С стимулирующий эффект возрастал до 65%, а при повышении температуры до 42 °С клетки в католите гибли быстрее, чем в контроле. В анолите при 10-минутной обработке наблюдалось замедление роста, а при продолжительности 50 мин. рост не наблюдался: имел место лизис части клеток. Среда М9, приготовленная на растворах различного ионного состава, приобретала активные свойства только в том случае, если в исходном растворе (который непосредственно обрабатывали в электрическом поле) находились ионы хлора. Электрохимическая обработка растворов без хлоридов и последующее добавление компонентов питательной среды в обработанные растворы не приводили ни к стимулирующим, ни к ингибирующим эффектам роста клеток. Обсуждаются возможные причины и механизмы стимуляции и торможения роста клеток.

*Ключевые слова:* питательные среды, электрохимическая обработка, режимы, католит и анолит, активность, клетки *E. coli*, рост, стимуляция и ингибирование, эффективность.

Исследования по влиянию электрических явлений на рост, метаболизм и деление клеток проводились давно [1]. В этой работе гальваническая пара электродов цинк-медь помещалась непосредственно в суспензию клеток. Через несколько часов роста под действием тока 0,3–0,5 мА в отдельных случаях наблюдалось увеличение числа клеток в 100 раз. В более поздней работе [2] было показано, что влияние электрического тока на клетки существенно зависит от того, где помещались электроды — непосредственно в зоне роста клеток (бездиафрагменный электролизер-ферментер как в [1]) или электроды отделены от зоны роста клеток мембранами (диафрагменный электролизер). В много-

численных последующих исследованиях (см. обзоры [3, 4]) были использованы самые разнообразные варианты воздействующих электрических полей и токов. Из этих публикаций следовало, что возможны два механизма действия тока на клетки — прямой и опосредованный, через изменение свойств растворов. Было отмечено [5], что физико-химические характеристики растворов, которые возникают под действием тока в диафрагменном электролизере, сохраняются и при дальнейшем раздельном использовании растворов из прикатодной и прианодной областей электролизера. В последние годы [6] электрохимически активированные растворы нашли широкое применение в медицине, сельском хозяйстве, промышленности, экологии, что связано с их высокой физико-химической и биологической активностью.

О причинах и механизмах активности обработанных растворов имеются противоречивые публикации. Возможной причиной активности считают: высокую диффузионную подвижность молекул воды, изменение адсорбционной и поляризующей способности гидроксил-

\* Автор для переписки:

© 2007 г. Мирошников Анатолий Игнатьевич  
д.б.н., ведущий научный сотрудник  
Института биофизики клетки РАН  
142290 Пущино Московской области  
Тел. 623-7467 (368); (4967) 739-388, 731-233  
E.mail : aimir@online.stack.net

ионов [7], образование в растворах перекиси водорода [8], усиление электрон-донорных и электрон-акцепторных свойств растворов на основе переноса свободных электронов между раствором и электродами [9], образование в катодите атомарного водорода, который должен быть идеальной ловушкой активных форм кислорода [10], превращение супероксидного анион-радикала в конечном итоге в воду после взаимодействия радикала с электронами и протонами, образующимися в катодите в больших количествах [11].

Электрохимическая обработка питательных сред постоянным электрическим током в диафрагменном электролизере проводилась: для восстановления субстрата, содержащего ионы железа, при культивировании бактерий, окисляющих ионы железа [12]; для активации пекарских дрожжей путем выдерживания питательной среды с дрожжевыми клетками в кислой зоне активатора [13]; для ускорения роста медленно растущих туберкулезных микобактерий в катодите питательной среды, которые в обычных условиях практически не растут, что затрудняет диагностику [14]. В медицинских целях постоянный электрический ток положительной и отрицательной полярности последовательно, модулированный переменным током, использовали для регенерации послеожоговых кожных ран и предупреждения образования грубых рубцов [15]; анолиты и католиты растворов использовались для лечения гнойных и ожоговых ран (анолит — для предварительного обеззараживания ран, католит — для быстрого заживления) [16]. Но в перечисленных работах не приводились сравнения эффективности воздействия обработанных растворов на рост клеток в зависимости от используемых режимов обработки (продолжительности обработки, величины электрического поля, ионного состава растворов при обработке) и используемых электролизеров (материалы электродов, мембран).

Цель данной работы — повышение активности электрохимически модифицированных питательных сред для стимуляции и ингибирования роста клеток при культивировании, исследование зависимости степени воздействия обработанных растворов на рост клеток от режимов обработки: продолжительности обработки, температуры культивирования, ионного состава обрабатываемых растворов.

## Материалы и методы

Электрохимическую активацию растворов проводили на описанной ранее установке [17]. Центральным блоком установки является трехкамерный диафраг-

менный электролизер. Все отделения электролизера — катодное, промежуточное, анодное — отделены друг от друга мембранами из ацетата целлюлозы марки Владипор МФА-МА № 3 с диаметром пор 0,200 мкм. Электроды пластинчатые, материал катода — титан, материал анода — платинированный титан. К электродам подключен источник регулируемого постоянного тока. Возможны два режима обработки растворов электрическим током: стационарный, без протока раствора через электролизер, и проточный — при непрерывном протоке раствора. Клетки *Escherichia coli* выращивали в среде М9 [18] с добавлением дрожжевого экстракта 1,0 г/л. Контрольные растворы не обрабатывали. В каждом варианте растворов — контрольном, катодите, анолите — использовали четыре пробирки по 5 мл раствора в каждой. Контрольные и опытные растворы готовили в каждом случае по условиям данного эксперимента. После введения инокулята в контрольные и опытные пробирки их помещали на качалку в термощкаф для выращивания клеток при температуре, заданной терморегулятором. В процессе роста клеток через регулярные интервалы времени в каждой пробирке измеряли оптическую плотность суспензии фотоэлектрическим колориметром ФЭК-56 (Россия) со светофильтром 540 нм. Величину стимулирующего эффекта определяли как увеличение оптической плотности суспензии в стационарной фазе роста клеток в катодите относительно контроля в процентах. Ингибирующий эффект определяли по отсутствию изменений оптической плотности суспензии в анолите в процессе культивирования. Исходный инокулят клеток выращивали накануне в среде М9 на качалке в термощкафу при температуре  $37 \pm 0,5$  °С в течение 8 часов и ресуспендировали в среде М9 в количестве  $10^9$  клеток в миллилитре. Инокулят в контрольные и опытные пробирки вводили в количестве  $10^7$  клеток/мл сразу после подготовки инокулята. Количество клеток определяли путем предварительной калибровки оптической плотности суспензий подсчетом числа клеток в камере Горяева.

Измерения рН и окислительно-восстановительного потенциала (Е, ов, мВ) проводили рН метром рН-121 (Россия), соответственно стеклянным и платиновым электродами относительно хлор-серебряного электрода сравнения. Электропроводность (ЭП, См/м) измеряли кондуктометром Раделкис ОК-102/1 (Венгрия). Оптические спектры получали на спектрофотометре Спекорд-40 (Германия). В качестве реактивов использовали стандарт-титры и реактивы «Реахим» марки хч и чда.

Во всех проведенных исследованиях определение зависимости эффективности воздействия обработанных

растворов на рост клеток осуществляли на клетках, растущих одновременно в одном эксперименте.

### Результаты

Изучено влияние католита и анолита полной питательной среды М9 с добавлением дрожжевого экстракта на рост клеток в зависимости от продолжительности обработки питательной среды в электролизере. В данном случае католит и анолит (по 100 мл) обрабатывали в стационарном режиме без протока раствора через электролизер при плотности тока  $31 \text{ А/м}^2$  и разном времени обработки — 10, 25 и 50 минут. Электрохимические параметры исходного раствора, а также католита и анолита после 10- и 50-минутной обработки приведены в таблице 1. Клетки выращивали отдельно в католите и анолите при температуре  $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Результаты выращивания клеток в полученных растворах приведены на рисунке 1. Из рисунка видно, что при 10-минутной обработке клетки в католите (кривая 2) растут как в контрольной среде (кривая 1) в пределах стандартного отклонения. При 50-минутной обработке в католите наблюдается стимулирующий эффект 25% (табл. 2).

На рисунке 2 приведены оптические спектры анолитов среды М9 после обработки в течение 25 минут и некоторых модифицированных растворов. При наличии в растворе хлористого аммония вид спектра определяется именно аммонием (кривая 2, рис. 2). Если заменить хлористый аммоний на равное количество хлористого натрия, то в спектре появляется пик на длине волны 225 нм (кривая 3), который находится в интервале, соответствующем хлорноватистой кислоте, — 225–245 нм с коэффициентом молярного поглощения  $100 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  [19]. При увеличении количества хлористого натрия в среде до  $8,5 \text{ г/л}$  в спектре анолита четко проявляются два пика — на длине волны 228 нм и на длине волны 290 нм

(кривая 4), что соответствует интервалу длин волн гипохлорит-ионов [19]. Ранее было показано, что в анолите растворов, содержащих хлориды при электролизе, образуются окислители в виде молекулярного хлора, хлорноватистой кислоты или гипохлорит-ионов [17, 20].

Количество окислителей, образующихся в анолите среды М9, пропорционально продолжительности обработки. В анолите при 10-минутной обработке в первые часы наблюдалось некоторое замедление роста клеток (рис. 1, кривая 3). Это связано с тем, что при данной плотности тока и продолжительности обработки в анолите М9, вероятно, образуются следовые количества окислителей, что и приводит к задержке роста клеток. В стационарной фазе роста (через 8 часов) оптическая плотность суспензии приближается к контрольной (кривая 1). При обработке растворов в течение 25 минут концентрацию хлорноватистой кислоты можно определить по величине пика на кривой 3 рисунка 2. В соответствии с известным законом Ламберта — Бэра концентрация хлорноватистой кислоты в растворе составляет  $0,54 \text{ мМ}$  (или  $28,6 \text{ мг/л}$ ). При 50-минутной обработке в анолите клетки не растут. Это, вероятно, связано с образованием в анолите большого количества окислителей при такой продолжительности обработки; в этом случае иногда наблюдался лизис части клеток.

Изучено влияние температуры культивирования на величину стимулирующего эффекта при выращивании клеток в полной питательной среде М9 после различной продолжительности обработки среды — 10, 25 и 50 мин. Выращивание клеток проводили при экстремальных температурах — пониженных до  $20$  и  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  относительно оптимальной температуры  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Установлено, что при пониженных температурах выращивания наблюдался существенный стимулирующий эффект до  $60$ – $65\%$  и  $30$ – $35\%$ , соответственно, относительно контроля — необработанной среды (табл. 3а, б). При повышенных

Таблица 1

Параметры катодитов и анолитов среды М9 после электрохимической обработки среды

Время обработки, мин.	10			50		
	рН	Е, ов	ЭП, См/м	рН	Е, ов	ЭП, См/м
Католит М9	7,5	-210	1,29	8,1	- 720	1,34
Анолит М9	7,5	420	1,27	7,0	530	1,19

Примечание: исходные параметры среды: рН 7,5; Е, ов 270 мВ; ЭП 1,28 См/м при плотности тока  $31 \text{ А/м}^2$  и напряженности электрического поля  $210 \text{ В/м}$  при продолжительности обработки 10 и 50 мин.

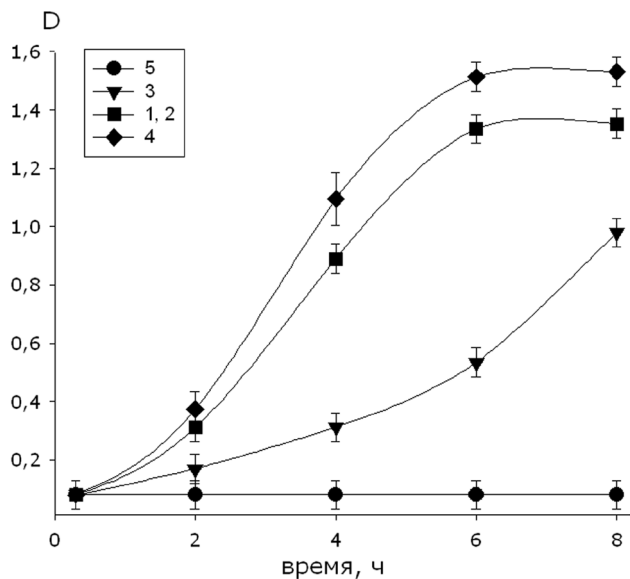


Рис. 1. Изменение оптической плотности суспензии в процессе роста клеток *E. coli* в катодите и анолите среды М9 после обработки 10 мин. (кривые 2 и 3, соответственно) и 50 мин. (кривые 4 и 5) относительно контроля — роста клеток в необработанной среде — кривая 1. Каждая точка на кривых есть среднее из 4 значений оптической плотности вместе со стандартным отклонением для клеток, растущих одновременно в одном эксперименте. Стандартные отклонения меньше, чем размер точки, на рисунке не показаны

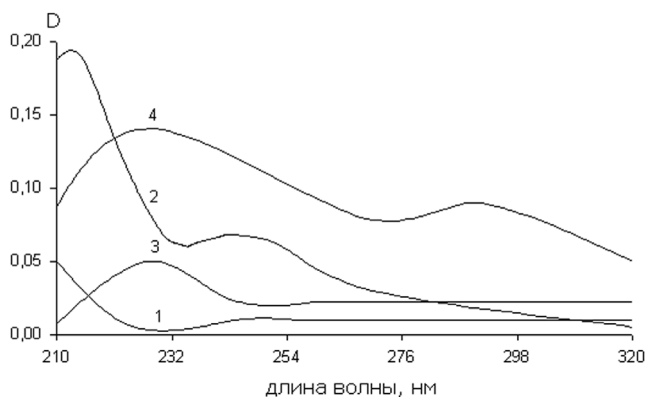


Рис. 2. Оптические абсорбционные спектры среды М9 и некоторых модифицированных растворов: 1 — спектр исходной среды; 2 — спектр анолита среды; 3 — спектр анолита среды, в которой хлористый аммоний (1 г/л) заменен на хлористый натрий (1 г/л); 4 — спектр анолита среды, в которой хлористого аммония нет, а количество хлористого натрия составляет 8,5 г/л. Обработку растворов проводили 25 мин. при плотности тока 31 А/м<sup>2</sup>

температурах выращивания до 42 °С, когда в контроле наблюдались замедление роста и гибель части клеток, в катодите отмечалось ускорение их гибели (табл. 3в).

Для выяснения роли отдельных компонентов питательной среды в биологической активности обработанных растворов было проведено несколько вариантов экспериментов [21]. В течение 25 минут обрабатывали отдельные компоненты питательной среды — дистиллированную воду, фосфатный буфер, фосфатный буфер с хлоридами питательной среды (NaCl, NH<sub>4</sub>Cl), хлориды питательной среды. В последующем полную питательную среду М9 готовили путем добавления недостающих компонентов в полученный катодит в соответствии с прописью среды (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, NaCl, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, глюкозы, дрожжевого экстракта) и выращивали клетки в полной питательной среде при температуре 37±0,5 °С.

Показано, что среда М9, приготовленная на растворах катодитов различных компонентов, приобретала стимулирующие свойства только в том случае, если в исходном растворе (который непосредственно обрабатывали в электролизере) находились соли, содержащие хлор. Электрохимическая обработка растворов без хлоридов (дистиллированная вода, фосфатный буфер) и последующее добавление компонентов питательной среды в обработанные растворы, не приводили ни к стимулирующим, ни к ингибирующим эффектам роста клеток. Выращивание клеток в питательной среде, приготовленной на катодите предварительно обработанной соляной кислоты, показало, что наличие именно ионов хлора в растворе при электролизе является причиной стимулирующего эффекта питательной среды. Образование окислителей и ингибирующий эффект анолита, описанный ранее, также возникали только при наличии ионов хлора в растворе при электролизе.

### Обсуждение

Активность катодитов, содержащих ионы хлора при электролизе, может быть связана с тем, что ионы хлора под действием электрического тока образуют ассоциаты (комплексы) из ионов хлора и молекул воды. Эти структурные образования могут изменить строение двойного электрического слоя у поверхности клетки и облегчить прохождение веществ и ионов через клеточные мембраны и повлиять на рост клеток. Это согласуется с одним из трех возможных механизмов стимуляции жизнедеятельности микроорганизмов [22] — увеличением массопереноса ионов и веществ через мембраны клеток.



Таблица 2

Среднее значение оптической плотности суспензии четырех измерений  $\pm$  стандартное отклонение (над чертой) и ее отличие от среднего значения контрольной оптической плотности в процентах (под чертой)

Время обработки, мин.	Среднее значение оптической плотности $\pm$ стандартное отклонение		
	Отличие среднего значения оптической плотности от контрольной в %		
10	1,34 $\pm$ 0,017	1,41 $\pm$ 0,011	1,46 $\pm$ 0,009
	+6	+2	+3
25	1,365 $\pm$ 0,009	1,5 $\pm$ 0,013	1,52 $\pm$ 0,016
	+7	+9	+6
50	1,651 $\pm$ 0,015	1,663 $\pm$ 0,012	1,74 $\pm$ 0,018
	+30	+19	+23
Контроль	1,27 $\pm$ 0,012	1,37 $\pm$ 0,016	1,42 $\pm$ 0,008

Примечание: значения определены через 8 ч роста клеток *E. coli* при температуре  $37\pm 0,5$  °С в среде М9, предварительно обработанной в катодной камере электролизера при плотности тока 31 А/м<sup>2</sup> и напряженности электрического поля 210 В/м, в зависимости от продолжительности обработки среды.

Таблица 3

Отличие среднего значения оптической плотности суспензии четырех измерений в процентах от среднего значения контрольной оптической плотности

Время обработки, мин.	Отличие среднего значения оптической плотности от контрольной в %		
	<b>а)</b>		
10	-4	-1	+3
25	+7	+3	+4
50	+42	+25	+22
Контроль	1,44 $\pm$ 0,017	1,62 $\pm$ 0,012	1,75 $\pm$ 0,016
	<b>б)</b>		
10	+7	+12	+18
25	+42	+21	+20
50	+57	+65	+66
Контроль	1,32 $\pm$ 0,015	1,26 $\pm$ 0,014	1,42 $\pm$ 0,014
	<b>в)</b>		
10	+7	-3	-4
25	+6	-3	-5
50	-7	-11	-6
Контроль	0,31 $\pm$ 0,06	0,58 $\pm$ 0,012	0,28 $\pm$ 0,008

Примечание: значения определены через 8 ч роста клеток *E. coli* в среде М9, предварительно обработанной в катодной камере электролизера при плотности тока 31 А/м<sup>2</sup> и напряженности электрического поля 210 В/м при разной продолжительности обработки 10, 25, 50 мин. в зависимости от температуры культивирования: а) 30, б) 20, в) 42 °С

Другие описанные механизмы стимуляции — адаптационный и экспрессия генетического аппарата — в случае электрохимической обработки представляются менее вероятными.

Механизм биологической активности католи- тов многие авторы связывают с восстановительными свойствами, которые приобретает католит в связи с образованием в растворе при электролизе молекулярного водорода. Но продувание газообразного водорода через раствор не придает ему электрохимических параметров католита [9].

В работах [9, 10, 23] полагают, что молекулярный водород не является единственным восстановителем, образующимся в католите. При этом выдвигалось несколько гипотез: образование в католите атомарного водорода [10, 23] или гидратированных электронов [9]. Сохранение атомарного водорода в растворе несколько часов представляется маловероятным из-за его высокой активности — атомы водорода рекомбинируют с образованием новых молекул за тысячные доли секунды [24].

Автор работы [8] без достаточных подтверждений сделал вывод, что причиной биологической активности электрохимически обработанных растворов является образующаяся в растворах перекись водорода. При этом перекись водорода сохраняется в растворе длительное время благодаря свободно-радикальным циклическим реакциям с участием гидратированных электронов. В работе [25] было измерено с точностью до нескольких наномолей количество перекиси водорода, образующейся в католитах и анолитах при различных ионных составах растворов, и определено время ее полужизни, которое в отдельных случаях достигает нескольких часов.

Показано, что образующаяся перекись водорода не оказывает никакого влияния на стимулирующий эффект при выращивании клеток *E. coli* в католите питательной среды М9.

### Заключение

1. Эффективность воздействия электрического поля на растворы в диафрагменном электролизере и соответственно растворов после обработки на клетки зависит от времени пребывания растворов в поле — чем дольше воздействие, тем больше эффект.

2. Физико-химические причины активности растворов заключаются в наличии ионов хлора в растворе при электролизе и для католита, и для анолита. Возмож-

ный биологический механизм стимуляции в случае като- лита — увеличение массопереноса веществ и ионов через мембраны, что и приводит к ускорению роста клеток. Основной механизм действия анолитов — это влияние образующихся в анолите окислителей — хлорновати- той кислоты, гипохлорит-ионов. Окислители нарушают барьерные свойства мембран, вызывают окислительные повреждения нуклеиновых кислот и белков, что приводит к гибели клеток.

3. Пониженные и повышенные температуры культивирования в католите представляют большой экономический интерес особенно при промышленных масштабах получения биомассы и биопродукции кле- ток. Культивирование при пониженных температурах (комнатные температуры) позволит получить увеличе- ние количества биомассы и биопродукции клеток при сокращении энергии на нагревание больших объемов суспензии. Промывка ферментеров после культивирова- ния католитом с повышенной до 42–45 °С температурой позволит эффективно проводить их стерилизацию без использования сильных ингибиторов и соответственно исключить последующее влияние этих ингибиторов на рост клеток.

4. Причины противоречивости многочисленных предыдущих работ по влиянию электрических полей и токов на рост клеток — стимуляция или ингибирование — связаны со случайным преобладающим влиянием на рост клеток растворов из прикатодной или прианодной области ферментера. Какой именно раствор окажет преобладающее влияние, будет зависеть от конструкции ферментера, ионного состава среды роста, параметров используемого электрического поля.

5. Широкое использование анолитов хлористого натрия в медицине, сельском хозяйстве, промышленности, экологии началось в 80-х годах [5, 6]. Необходимо подчеркнуть, что характеристики таких растворов в то время были исследованы очень мало, дезинфицирующие и обеззараживающие свойства определяли опытным пу- тем по выживанию микроорганизмов в таких растворах. Результаты детальных исследований физико-химических причин и механизмов биологического действия анолитов хлористого натрия и других хлоридов были проведены и опубликованы значительно позже [17, 20]. Причины активности католитов в настоящее время достаточно ясны — наличие ионов хлора в растворе при электролизе. Механизмы биологического действия таких растворов до конца не исследованы. Несмотря на это использование и анолитов, и католитов растворов хлоридов представляет большой общебиологический и практический интерес.

Считаю приятным долгом выразить благодарность доктору химических наук, профессору В.И. Брускову и кандидату биологических наук С.В. Гудкову за участие в обсуждении работы, ценные замечания и содействие в выполнении графических работ.

## Литература

1. Stone G.E. Influence of electricity on microorganisms // The Botanical Gazette (Chicago). — 1909. — Vol. 48. — N 5. — P. 359–379.
2. Rowley G.A. Electrical current effects on *E. coli* growth rates // *Experim. Biology and Medicine*. — 1972. — Vol. 139. — N 3. — P. 929–934.
3. Попов Н.Г., Андреев В.С., Дронова Н.В. Микроорганизмы и электрические поля. Обзор // *Успехи микробиологии*. Вып. 21. — М.: Наука, 1987. — С. 180–212.
4. Palaniappan S., Sastry S.K., Richter E.R. Effects of electricity on microorganisms: a review // *J. Food Process Preserv.* — 1990. — Vol. 14. — P. 393–414.
5. Бахир В.М. Электрохимическая активация. — М.: ВНИИ Медтехники, 1992. — Ч. 1, 2. — 657 с.
6. Электрохимическая активация в медицине, сельском хозяйстве, промышленности. Материалы II Международного симпозиума. — М.: ВНИИ Медтехники, 1999. — Ч. 1. — 300 с.
7. Кирпичников П.А., Бахир В.М., Гамер П.У. и др. О природе электрохимической активации сред // *ДАН СССР*. — 1986. — Т. 286. — № 3. — С. 663–666.
8. Клосс А.И. Электрон-радикальная диссоциация и механизм активации воды // *ДАН СССР*. — 1988. — Т. 303. — № 6. — С. 1403–1407.
9. Прилуцкий В.И., Бахир В.М. Электрохимически активированная вода: аномальные свойства, механизм биологического действия. — М.: ВНИИ Медтехники, 1997. — 228 с.
10. Shirahata S., Kabayama S., Nakano M et al. Electrolyzed — reduced water scavenges active oxygen species and protects DNA from oxidative damage // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1997. — Vol. 234. — N 1. — P. 269–274.
11. Морисава С. Медицинская жидкость для консервативного лечения, способ ее получения и диализное устройство. Патент РФ 2120413 С 02 F 1/469 // БИ. — 1998. — № 29.
12. Денисов Г.В., Ковров Б.Г., Седельников С.М. Способ электрохимического восстановления субстрата для культивирования бактерий и устройство для его осуществления. АС СССР № 734276, С12 К 1/10 // БИ. — 1980. — № 3.
13. Пащенко Л.П., Фараджева Е.Д., Бывальцев А.И., Трунова Т.В. Способ активации хлебопекарных дрожжей при производстве теста. АС СССР № 1564188, С12N 13/00 // БИ. — 1990. — № 18.
14. Ющенко А.А., Юшин М.Ю., Итурганова О.А. Способ культивирования медленно растущих микобактерий. Патент РФ № 2106879, А 61 К 39/04 // БИ. — 1998. — № 8.
15. Синицин Л.Н., Развозова Е.П. Способ регенерации послеожоговых ран. АС СССР № 1011128, А 61 N 1/20 // БИ. — 1983. — № 14.
16. Николаева Г.М., Кирпичников П.А., Ликумович А.Г. и др. Способ получения средства для лечения гнойных ран и ожогов. Способ лечения гнойных ран и ожогов. АС СССР № 1821212, А 61 К 33/14 // БИ. — 1993. — № 22.
17. Мирошников А.И. Исследование причин биологической активности прианодных растворов хлористого натрия после их обработки в диафрагменном электролизере // *Биофизика*. — 1997. — Т. 42. — № 4. — С. 979–984.
18. Сборник методик по генетике микроорганизмов / Под ред. Р. Клауса, У. Хейса. — М.: Медицина, 1970. — С. 203.
19. Morris J.C. The Acid ionization constant of HOCl from 5 to 35 °C // *J. Phys. Chem.* — 1966. — Vol. 70. — N 12. — P. 3798–3805.
20. Nakagawara S., Goto T., Nara M. et al. Spectroscopic characterization and the pH dependence of bactericidal activity of aqueous chlorine solution // *Analytical Sciences*. — 1998 August. — Vol. 14. — P. 691–698.
21. Мирошников А. И. Исследование причин биологического действия электрохимически активированных растворов по изменению роста клеток *E. coli* // *Биофизика*. — 2004. — Т. 49. — № 5. — С. 866–871.
22. Шигаева М.Х., Ахматуллина Н.Б., Жангалина Н.К., Мустафин К.Г. Стимуляция жизнедеятельности микроорганизмов и вирусов. — Алма-Ата: Наука, 1986. — 184 с.
23. Янагира Т., Сато Б., Сюдо Т. Способ антиокисления и вода, действующая в качестве антиоксиданта. Заявка JP 2004101402 C02F 1/70 от 2005.05.10.
24. Сильвера А.Ф., Валравен Ю. Стабилизация атомарного водорода // *Успехи физ. наук*. — 1983. — Т. 139. — № 4. — С. 701–717.
25. Мирошников А.И., Масалимов Ж. К., Брусков В.И. Содержание перекиси водорода в электрохимически активированных растворах и анализ ее присутствия на рост клеток *E. coli* // *Биофизика*. — 2004. — Т. 49. — Вып. 1. — С. 32–37.

## STIMULATION AND INHIBITION OF CELL GROWTH IN CULTURE MEDIA MODIFIED WITH ELECTRIC FIELD

A.I. MIROSHNIKOV

*Institute of Cell Biophysics, RAS, Pushchino, Moscow Region*

A technique was elaborated for electric field-aided modification of properties of culture media in diaphragm electrolyzers to stimulate or inhibit cell growth. Experiments were performed in *Escherichia coli* cell growth in M9 culture medium. The stimulating effect of electric field was observed in catholyte solutions and was determined by the value of cell suspension optical density in per cent of the control. The inhibiting effect was observed in anolytes, the inhibition of cell growth being indicated by the absence of changes in the optical density of suspension. The efficiency of action of treated solutions on cell growth was time-dependent for different treatment durations (10, 25 and 50 min). In the catholyte, the stimulating effect was absent for 10 min of treatment, whereas for 50 min of treatment it might reach 25% when the cell growth temperature was optimal (37 °C). Upon lowering the culture temperature to 20 °C, the stimulating effect increased to 65%, whereas raising the temperature to 42 °C caused the cells to die more rapidly than in the control. In the anolyte, the 10 min-long treatment resulted in a slowing down of cell growth and on the 50 min-long treatment the cell growth was absent, and a partial cell lysis was observed. The M9 medium prepared from solutions of various ionic compositions became active only when the original (electric field-treated) solution contained chlorine ions. The electrochemical treatment of chlorine-free solutions and subsequent addition of nutrition medium components to treated solutions did not result in any stimulating or inhibiting effects on cell growth. Possible causes and mechanisms of biological effect stimulating and inhibiting cell growth were discussed.

*Keywords:* culture media, electrochemical treatment, regimes, catholyte and anolyte, modification of properties, *E. coli* cell culture, growth control, efficiency.

## ПРОДУЦИРОВАНИЕ ПУЛЛУЛАНА ДРОЖЖЕПОДОБНЫМ ГРИБОМ *AUREOBASIDIUM PULLULANS* ВКПМ F-571

А.А. ШУБАКОВ<sup>1</sup>, Е.А. ЕЛЬКИНА<sup>1\*</sup>, В.Е. ЛАРИНА<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Отдел молекулярной иммунологии и биотехнологии, Институт физиологии  
Коми научного центра УрО РАН, <sup>2</sup> кафедра биологической и общей химии,  
Коми филиал ГОУ ВПО Кировская ГМА Росздрава, Сыктывкар

Для культивирования дрожжеподобного гриба *Aureobasidium pullulans* ВКПМ F-571 подобраны оптимальные условия, способствующие биосинтезу пуллулана без меланиногенеза. Установлено, что в среде, содержащей 5% сахарозы и 0,2% сульфата аммония, образуется пуллулан (1,5 г/л), не загрязненный меланином. В этих условиях культура *A. pullulans* синтезирует пуллулан с молекулярной массой 12 кДа.

**Ключевые слова:** полисахарид, пуллулан, биосинтез, молекулярная масса, мицелиальные грибы, *Aureobasidium pullulans*.

*Aureobasidium pullulans*, относящийся к черным дрожжеподобным грибам гифомицетного аффинитета, широко известен как продуцент внеклеточных полисахаридов различной химической структуры, в частности, пуллулана [1–3]. Пуллулан — водорастворимый линейный глюкан, состоящий из повторяющихся мальтотриозных звеньев, связанных между собой  $\alpha$ -1,6-связями [4, 5].

Полисахарид микробного происхождения пуллулан используют в легкой, пищевой, фармацевтической и других отраслях промышленности. Показана возможность применения в качестве заменителей плазмы крови гидролизатов пуллулана с молекулярной массой 30000–90000 [6–8]. Представляется интересным использование пуллулана в качестве полимера-носителя физиологически активных соединений, например, на основе гемина.

К настоящему времени изучены цитологические, морфо-физиологические особенности и влияние условий культивирования на биосинтез пуллулана у ряда штаммов *A. pullulans*, а также выявлена определенная взаимосвязь между условиями культивирования и свойствами синтезированного пуллулана [5, 9].

Цель данной работы заключается в исследовании особенностей продуцирования пуллулана культурой *A. pullulans* F-571 в зависимости от состава питательной среды и изучении некоторых физико-химических свойств синтезированного полисахарида.

### Материалы и методы

**Продуцент и условия культивирования.** В качестве продуцента полисахарида использовали штамм F-571 *Aureobasidium pullulans*, полученный из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ).

Культуру выращивали в колбах Эрленмейера при перемешивании (220 об/мин.) с объемом питательной среды 100 мл при исходном значении pH 5,0 и температуре +24 °С. Посевным материалом служила культура, выращенная на скошенном сусло-агаре в пробирках в течение 7 суток при 26 °С. Клетки посевного материала переносили в жидкую среду следующего состава, г/л: сахароза — 20,0, дрожжевой экстракт — 0,4,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  — 2,0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 2,0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,5,  $\text{NaCl}$  — 0,1. В среду добавляли 0,1 мл раствора микроэлементов следующего состава, г/л:  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  — 0,01,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  — 0,01,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,01,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  — 0,01,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  — 0,01,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  — 0,01. Инокулят выращивали в течение 5 суток и далее засеивали ферментационные колбы (по 10 мл на 100 мл среды).

\* Автор для переписки:

© 2007 г. Елькина Елена Андрияновна,  
мл.н.с. Института физиологии Коми НЦ УрО РАН  
167982 Сыктывкар, ул. Первомайская, 50  
Тел./факс: (8212) 241001  
E-mail: elkina@physiol.komisc.ru



Способность данного штамма продуцировать полисахарид изучали в трех жидких питательных средах следующего состава, г/л:

- среда 1 (Роулена — Томсона): глюкоза — 50,0,  $C_4H_4O_6(NH_4)_2$  — 3,3,  $KH_2PO_4$  — 2,0,  $K_2SO_4$  — 0,2,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  — 0,2, кукурузный экстракт — 10,0; раствор микроэлементов (0,1 мл/100 мл среды), %:  $MnSO_4 \cdot 5H_2O$  — 0,008,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  — 0,04,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  — 0,08,  $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  — 0,01,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  — 0,1,  $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$  — 0,03,  $H_3BO_3$  — 0,006,  $CaCl_2 \cdot 6H_2O$  — 0,1;
- среда 2: глюкоза — 50,0, гидролизат казеина — 2,0,  $KH_2PO_4$  — 1,8,  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$  — 0,5,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  — 0,5,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  — 0,001,  $NaCl$  — 0,1,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  — 0,01, дрожжевой экстракт — 0,4;
- среда 3 (Чапека — Докса): глюкоза — 50,0,  $NaNO_3$  — 2,0,  $KH_2PO_4$  — 0,7,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  — 0,3,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  — 0,5,  $KCl$  — 0,5,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  — 0,01.

Ферментации проводили 5–7 суток.

Рост культуры контролировали по весу сухой биомассы, которую получали фильтрованием грибных суспензий через бумажные фильтры и высушиванием их до постоянной массы.

**Выделение и очистка пуллулана.** Пуллулан выделяли из супернатанта, полученного при центрифугировании грибной суспензии (5000 об/мин., 30 мин.). Супернатант концентрировали под вакуумом при 50 °С. Осаждение пуллулана из супернатанта производили добавлением 4 объемов 96%-ного раствора этанола. Для лучшего формирования осадка раствор оставляли на сутки при +4 °С.

Осадок отделяли центрифугированием (5000 об/мин., 30 мин.). Полученный осадок растворяли в дистиллированной воде и диализовали в течение 3 суток при +8 °С. Диализат упаривали под вакуумом при 50 °С и лиофилизировали.

**Аналитические методы.** Качественный и количественный моносахаридный состав полисахарида определяли после полного кислотного гидролиза 2 М трифторуксусной кислотой в течение 3 ч при 100 °С с помощью распределительной бумажной хроматографии (БХ) и методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

БХ проводили на бумаге Filtrak FN-12 в системе растворителей н-бутанол — пиридин — вода (6 : 4 : 3). Для обнаружения пятен на хроматограммах использо-

вали раствор кислого анилинфталата в водонасыщенном бутаноле при 105 °С.

ВЭЖХ проводили на хроматографе HPLC фирмы «Ково» (Чехия) с использованием колонки с привитой аминофазой 901-30302 Separon SGX NH<sub>2</sub>, 5/um; элюент — ацетонитрил — вода (70 : 30), скорость подачи элюирующей смеси — 0,7 мл/мин., детектор — рефрактометр.

Удельное вращение 0,1% водных растворов полисахарида измеряли на круговом поляриметре СМ-3. Молекулярную массу определяли методом скоростной седиментации на ультрацентрифуге MOM-31800 (Венгрия). Анализ седиментограммы проводили по методике [10]. ИК-спектры в диапазоне 400–3600 см<sup>-1</sup> снимали на приборе UR-20 (Германия). Содержание белка в образцах полисахарида определяли по методу Лоури [11].

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили общепринятыми методами [12].

## Результаты и обсуждение

Для изучения способности гриба *A. pullulans* продуцировать пуллулан его культивировали в течение 7 суток в трех средах разного состава (табл. 1). Наиболее активно культура растет в среде 1, что связано, по-видимому, с наличием в ней смеси микроэлементов, в которых нуждаются многие дрожжи и дрожжеподобные грибы. Количество синтезируемого пуллулана сильно варьирует в зависимости от состава питательной среды. Наибольшее накопление полисахарида происходит в среде 1 — до 2,7–2,9 г/л. В среде 2 масса пуллулана за то же время составляет 1,2–1,4 г/л, что в два раза меньше, чем в среде 1. Среда 3 не способствует активному биосинтезу полисахарида данной культурой и масса пуллулана не превышает 0,4 г/л.

Образование пуллулана отмечено при культивировании различных штаммов *A. pullulans* на средах с сахарозой, крахмалом, маннозой, глюкозой, фруктозой, мальтозой, причем больше всего его синтезируется на сахарозе и глюкозе [2, 13]. Для изучения влияния различных источников углерода (глюкоза, ксилоза, сахароза, лактоза) на биосинтез пуллулана *A. pullulans* F-571 нами были выбраны среды 1 и 2 как более продуктивные по выходу пуллулана. Через 5 суток выращивания из четырех испытанных источников углерода максимальное количество пуллулана на обеих средах синтезируется с глюкозой — 2,7 и 1,2 г/л, соответственно (табл. 2).

Однако образцы полисахарида, полученные при культивировании *A. pullulans* в среде 1 со всеми

Таблица 1

**Продуцирование пуллулана культурой *Aureobasidium pullulans* F-571  
в средах с 5%-ным раствором глюкозы**

Время, сут	Биомасса, г/л			Масса пуллулана, г/л		
	среда 1	среда 2	среда 3	среда 1	среда 2	среда 3
3	13,4 ± 0,5	8,7 ± 0,6	5,7 ± 0,8	1,3 ± 0,4	1,0 ± 0,3	0,1 ± 0,1
5	18,7 ± 0,6	15,4 ± 0,5	6,0 ± 0,7	2,7 ± 0,2	1,2 ± 0,2	0,3 ± 0,1
7	19,7 ± 0,7	17,3 ± 0,6	8,4 ± 0,7	2,9 ± 0,5	1,4 ± 0,2	0,4 ± 0,1

Таблица 2

**Влияние источника углерода на продуцирование пуллулана культурой  
*Aureobasidium pullulans* F-571**

Источник углерода	Биомасса, г/л		Масса пуллулана, г/л	
	среда 1	среда 2	среда 1	среда 2
Глюкоза	18,7 ± 0,6	15,4 ± 0,5	2,7 ± 0,2	1,2 ± 0,2
Ксилоза	17,5 ± 0,3	13,6 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,1
Сахароза	19,4 ± 0,4	16,4 ± 0,4	0,9 ± 0,2	1,1 ± 0,2
Лактоза	13,7 ± 0,2	15,4 ± 0,3	1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,2

испытанными источниками углерода, имеют окраску от зеленой до черной, то есть загрязнены пигментом. В среде 2 интенсивность меланиногенеза ниже и зависит от используемого источника углерода. Так, в среде с глюкозой или ксилозой образцы пуллулана имеют зеленую окраску, а в среде с сахарозой или лактозой — белую.

Для исследования особенностей продуцирования пуллулана культурой *A. pullulans* была выбрана среда 2, содержащая в качестве источника углерода сахарозу или лактозу, на которой интенсивность меланиногенеза и соответственно степень загрязнения полисахарида меланином минимальны.

Дальнейший эксперимент был посвящен выбору такого источника азота, с которым выход пуллулана был бы максимальным, а меланиногенез — минимальным.

Известно, что для одних штаммов *A. pullulans* сульфат аммония является оптимальным источником азота для биосинтеза пуллулана; другие штаммы синтезируют максимальное количество экзополисахарида в средах с окисленным источником азота [8, 13–15]. Сульфат аммония также не стимулирует меланиногенез, и ферментационная масса с этим источником азота имеет светлую окраску, тогда как с другими источниками азота

она имеет окраску от коричневого ( $\text{NaNO}_3$ ) до чернотного (пептон) цвета [13].

Были испытаны три различных источника азота органической и неорганической природы: гидролизат казеина,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  и  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Культуру выращивали 5 суток в среде 2, которая содержала 5% сахарозы или лактозы и 0,2% одного из перечисленных источников азота (табл. 3).

Наибольшее количество пуллулана (1,5 г/л) образуется в среде с сахарозой и  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . При других сочетаниях источников углерода и азота полисахарида синтезировалось меньше.

Следует отметить, что в зависимости от используемого источника азота интенсивность образования культурой *A. pullulans* пигмента различна. В среде, содержащей  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , образцы пуллулана загрязнены пигментом и имеют светло-зеленую окраску, в то время как образцы пуллулана, полученные в средах с гидролизатом казеина или  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , имеют грязно-белую и белую окраску, соответственно.

Исходя из количества полученного пуллулана и степени загрязнения его меланином, было обнаружено, что наиболее подходящей для синтеза пуллулана



Влияние источника азота на продуцирование пуллулана (г/л)  
культурой *Aureobasidium pullulans* F-571

Источник азота	Источник углерода	
	сахароза	лактоза
Казеин	1,1 ± 0,2	0,8 ± 0,1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,5 ± 0,2	0,7 ± 0,2
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1

Результаты определения молекулярной массы пуллулана  
*Aureobasidium pullulans* F-571

Образец	[η], дл/г	(1-νρ <sub>0</sub> )	S <sub>0</sub> × 10 <sup>13</sup>	msη × 10 <sup>3</sup>
Пуллулан	0,21	0,359	1,62	12,0

культурой *Aureobasidium pullulans* F-571 является среда 2, содержащая в качестве источника углерода сахарозу (5%), а в качестве источника азота — сульфат аммония (0,2%).

БХ показала, что единственным конечным продуктом полного кислотного гидролиза образцов пуллулана является глюкоза. Метод ВЭЖХ подтвердил, что не менее 95% моносахаридного состава пробы составляет глюкоза.

Положительное значение удельного вращения раствора полисахарида *Aureobasidium pullulans* F-571,  $[\alpha]_d^{20}$ , равное +123 в воде, свидетельствует о преобладании α-гликозидных связей в молекуле полимера. Близкие значения положительного удельного вращения для пуллулана, синтезируемого штаммами *A. pullulans*, установлены другими исследователями [2, 7, 13].

Данные ИК-спектроскопии показали, что в спектре полученного полисахарида наблюдается полоса поглощения при 860 см<sup>-1</sup>, которая может быть отнесена к деформационным колебаниям α-1,6-гликозидной связи.

Известно [4], что молекулярная масса пуллулана варьирует в диапазоне 5 кДа — 2 МДа: она зависит от типа штамма и от условий культивирования. По данным ультрацентрифугирования (табл. 4), пуллулан, продуцируемый штаммом *Aureobasidium pullulans* F-571, имеет молекулярную массу, равную 12 кДа. Содержание белка в исследуемом образце составляет 0,5%.

## Заключение

Таким образом, подобраны оптимальные условия культивирования дрожжеподобного гриба *Aureobasidium pullulans* ВКПМ F-571, способствующие биосинтезу пуллулана без меланиногенеза. Установлено, что в среде 2, содержащей 5% сахарозы и 0,2% сульфата аммония, образуется пуллулан (1,5 г/л), не загрязненный меланином. В этих условиях культура *A. pullulans* продуцирует пуллулан с молекулярной массой 12 кДа.

Авторы выражают благодарность с.н.с., к.х.н. Р.Г. Оводовой (Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН) и с.н.с., к.х.н. В.Ю. Беляеву (Институт химии Коми НЦ УрО РАН) за методическую и консультативную помощь при выделении, очистке и идентификации полисахарида.

## Литература

1. Deshpande M.S., Rale V.B., Zynch J.M. // Enzyme Microb. Technol. — 1992. — Vol. 14. — P. 514–527.
2. Елинов Н.П., Матвеева А.К. // Биохимия. — 1972. — Т. 37. — Вып. 2. — С. 255–257.
3. Catley B.J., Robyt J.F., Whelan W.J. // Biochem. J. — 1966. — Vol. 66. — N. 1. — P. 138–142.
4. Schuster R., Wenzig E., Mersmann A. // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 1993. — Vol. 39. — P. 155–158.
5. Петров П.Т., Шингель К.И., Скрипко А.Д., Царенков В.М. // Биотехнология. — 2002. — № 1. — С. 36–48.

6. Yuen S. // *Process Biochem.* – 1974. – N 11. – P. 7–22.
7. Юрлова Н.А., Кирий А.И., Кудряшова О.А. // *Микробиология.* – 1994. – Т. 63. – Вып. 6. – С. 1031–1037.
8. Кондратьева Т.Ф., Лобачева Н.А. // *Микробиология.* – 1990. – Т. 59. – Вып. 6. – С. 1004–1009.
9. Reelev M., Jorgensen B.B., Jorgensen O.B. // *J. Biotechnol.* – 1996. – Vol. 51. – P. 131–135.
10. Бектуров Е.А., Шаяхметов Ш.Ш., Роганов В.В. *Практическое руководство по исследованию полимеров методом ультрацентрифугирования.* – Алма-Ата: Мектеп, 1983. – 59 с.
11. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.
12. Жукова Р.А., Коммунарская А.Д., Пронина М.И., Терешин И.М., Журавлева Н.П., Шабас М.Н. *Методы селекции продуцентов антибиотиков и ферментов.* – Л.: Медицина, 1978. – 160 с.
13. Юрлова Н.А. // *Микол. фитопатол.* – 1994. – Т. 28. – Вып. 3. – С. 51–57.
14. Юрлова Н.А., Кудряшова О.А., Софьин А.В. // *Микробиология.* – 1997. – Т. 66. – № 4. – С. 468–474.
15. Юрлова Н.А. // *Микробиология.* – 1997. – Т. 66. – № 3. – С. 358–364.

## PULLULAN PRODUCING BY YEAST-LIKE FUNGUS AUREOBASIDIUM PULLULANS VKPM F-571

A.A. SHUBAKOV<sup>1</sup>, E.A. EL'KINA<sup>1</sup>, V.E. LARINA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Department of Molecular Immunology and Biotechnology,*

*Institute of Physiology, Komi Science Centre, The Urals Branch of the Russian Academy of Sciences,*

<sup>2</sup> *Faculty of Biological and General Chemistry, Komi Branch of the Kirov State Medical Academy, Syktyvkar*

The optimal conditions of cultivation of yeast-like fungus *Aureobasidium pullulans* VKPM F-571 were established which are suitable for the biosynthesis of pullulan without melaninogenesis. Pullulan (1.5 g/l) was shown to be produced without melanin on the medium with 5% sucrose and 0.2% ammonium sulphate. *A. pullulans* produced pullulan with molecular mass of 12 kDa at these conditions.

*Keywords:* polysaccharide, pullulan, biosynthesis, molecular mass, filamentous fungi, *Aureobasidium pullulans*.

## О ВОЗМОЖНОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТА ХОНДРОИТИНСУЛЬФАТА ИЗ РЫБ БАЛТИЙСКОЙ АКВАТОРИИ

Е.С. ЗЕМЛЯКОВА, О.Я. МЕЗЕНОВА\*

*Калининградский государственный технический университет, Калининград*

Проблема остеоартроза (ОА) в последнюю четверть XX века приобрела огромное общемедицинское и социальное значение, определяемое широкой распространенностью болезни, быстрым развитием функциональных нарушений при поражении «несущих» суставов нижних конечностей — коленных, тазобедренных. Стало также очевидно, что ОА — болезнь пожилого возраста, распространенность которой после 60 лет увеличивается вдвое. По данным статистики, 12,3% всех больных заболеваниями опорно-двигательного аппарата страдают ОА.

К сожалению, ОА становится одной из самых значимых хронических болезней в высокоиндустриальных странах; стремительно развивается он и в России. ОА редко угрожает жизни, но характеризуется длительным и прогрессирующим характером течения, высокой частотой формирования инвалидности. Данное заболевание сопровождается разрушением суставного хряща и прилегающей костной ткани и поражает крупные суставы. В этиологии этого заболевания играют определенную роль повышенная функциональная нагрузка на суставы (в том числе вследствие избыточной массы тела), нарушения кровоснабжения суставов, хроническое воспаление. По современным представлениям, при возрастной дегенерации хряща происходят деполимеризация и убыль компонентов протеогликанов (в первую очередь хондроитинсульфата), что изменяет гидродинамические свойства хряща и уменьшает скорость диффузии питательных веществ в нем. В связи с этим разработка новых

и совершенствование известных способов получения хондроитинсульфата сегодня актуальны.

Эластичность хряща зависит от его питания, прежде всего, поступления разрушаемых компонентов хондропротекторного действия. С возрастом наш организм утрачивает способность самостоятельно обновлять и поддерживать эластичность хрящевой ткани суставов. Поэтому хондроитинсульфат в совокупности с незаменимыми сопутствующими веществами, участвующими в синтезе хряща, должен постоянно поступать в организм, выполняя защитные и опорные функции.

Целью настоящей работы является разработка биотехнологического способа получения препарата хондроитинсульфата из хрящевой ткани рыб балтийской акватории (судака, леща, лосося и др.). Уникальный природный компонент — хондроитинсульфат, из которого может заново синтезироваться здоровая и эластичная хрящевая ткань суставов, — традиционно получают из трахей и бронхов крупного рогатого скота. Получение его из хрящевой ткани гидробионтов значительно снижает себестоимость лечебно-профилактических препаратов данного типа, при этом решается проблема комплексной переработки и утилизации отходов рыбного сырья.

Общепринятая технология получения хондроитинсульфата из хрящевых тканей заключается в выделении хондроитинсульфата из животных тканей путем экстракции водным раствором смеси неорганической соли и щелочи, очистке экстракта от балластных веществ и осаждении конечного продукта спиртом. Обезжиривание животной ткани производят предварительным нагреванием ее в воде или 0,1–3,5 М водном растворе неорганической соли при 60–120 °С, экстракцию хондроитинсульфата ведут при 40–70 °С, сорбируют хондроитинсульфат из экстракта на макропористом анионите при рН 6,0–8,0, 40–80 °С и концентрации неорганической соли 0,3–1,1 моль/л, элюируют хондроитинсульфат с анионита 1,4–3,0 М водным раствором

\* Автор для переписки:

© 2007 г. Мезенова Ольга Яковлевна  
профессор, заведующий кафедрой  
Калининградского государственного  
технического университета  
236000 Калининград, ул. Профессора Баранова, 43  
Тел.: (0112) 46 35 69  
E-mail: mezenova@klgtu.ru

неорганической соли. Очистку полученного хондроитинсульфата ведут обработкой в водном растворе окислителя, а также активированным углем.

Биотехнологический способ получения хондроитинсульфата основан на предварительном ферментативном гидролизе сырья (например, хрящей из голов судака) 2–3 объемами 0,5–1%-ного раствора пепсина при 38–40 °С и рН 1,5–2, последующей инактивации пепсина (например, нагреванием), отделении образовавшегося осадка с последующим его растворением в воде и сушке. Перед осаждением тканевый гидролизат рекомендуется хроматографировать для идентификации и очистки; при этом в случае использования в качестве элюирующего раствора 1–2 %-ной соляной кислоты целесообразно наполнять колонку диэтиламиноэтилцеллюлозой, а для высушивания использовать диализованный водный раствор целевого продукта.

Данными способами в основном получают высокомолекулярные фракции хондроитинсульфата, которые не разлагаются в желудочно-кишечном тракте; поэтому они пригодны только для внутривенного применения. Разработанные технологии на основе рыбных хрящевых тканей позволяют получать низкомолекулярные фракции хондроитинсульфата (например, из натурального хряща лососевых рыб), которые почти полностью всасываются в желудочно-кишечном тракте и встраиваются в хрящевую ткань.

*Материалы IV Съезда Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова 6–7 декабря 2006 г.*

## ЦИТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ В КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЕ IN VITRO

А.А. КАТАСОНОВА\*

*Институт биологии Уфимского научного центра РАН, Уфа*

Один из способов биотехнологии получения новых сортов растений — создание экспериментальных систем культуры *in vitro*, обеспечивающих воспроизводимые результаты при строго определенных условиях (Бутенко, 1999). Перспективное направление в этой области исследований — метод культуры *in vitro* незрелых зародышей, в основе которого лежит феномен эмбриогенеза — формирования и развития в каллусной культуре эмбриоидов (соматических зародышей), дающих начало полноценным фертильным растениям-регенерантам.

Биотехнология получения фертильных растений-регенерантов яровой мягкой пшеницы путем эмбриогенеза в каллусной культуре *in vitro* разработана недостаточно. В связи с этим цель исследования состояла в экспериментальной разработке основных этапов биотехнологии получения растений-регенерантов яровой мягкой пшеницы из эмбриоидов, полученных в каллусной культуре *in vitro* зародышевого происхождения, на основании данных цито-гистологического анализа и оценки роли фитогормона абсцизовой кислоты (АБК) на отдельных этапах экспериментов.

Каллусы получали через 5–7 сут. культивирования незрелых зародышей на питательной среде МС (Murashige, Skoog, 1962) с добавлением 2,0 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д). Каллусы выдерживали на этой же среде в течение 20–22 сут. для наращивания массы. Затем каллусы переносили на питательную среду МС с добавлением АБК в различной концентрации. Контролем служили каллусы, перенесенные на питательную среду МС без АБК. Во всех вариантах эксперимента в каллусе отмечено образование морфогенетических очагов (МО), состоящих в основном из недифференцированных меристемати-

ческих клеток, способных к дальнейшему развитию. Количество образовавшихся МО в каллусах зависит как от концентрации АБК, так и от длительности культивирования *in vitro*.

В контроле появления МО не отмечено вплоть до окончания культивирования. При концентрации АБК в 1,0 мг/л МО появляются на 5-е сут. культивирования *in vitro* в количестве трех. На 10-е сут. культивирования количество МО увеличивается до 4, на 20-е сут. — до 5. При концентрации АБК в 2,0 мг/л появление МО отмечено уже на 1-е сут. Далее в процессе культивирования количество МО резко возрастает: на 5-е сут. — 6 очагов, на 15-е сут. — 7 очагов. На 20-е сут. отмечено максимальное в условиях выполненных экспериментов количество морфогенетических очагов. Такой режим культивирования можно считать оптимальным. При концентрации АБК в 3,0 мг/л отмечено появление только одного МО на 5-е сут. В ходе дальнейшего культивирования *in vitro* количество очагов не возрастает.

При переносе каллусов на питательную среду по прописи Vlaydes (1966) для регенерации МО дают начало эмбриоидам, из которых регенерируют растения. При этом эмбриоид формируется на 9–12-е сут. культивирования путем реорганизации всего МО. Это может свидетельствовать о том, что процесс образования и развития МО является, по сути, незавершенным эмбриогенезом. К 15–17-м сут. культивирования на питательной среде Vlaydes из зрелых эмбриоидов образовывались проростки растений-регенерантов, которые далее развивались с прохождением типичных для пшеницы фенофаз всходов, 3-го листа и кущения. После этого растения-регенеранты извлекали из пробирок и переносили в условия *ex vitro* в вегетационные сосуды с почвой и доводили до фенофазы полной спелости зерна.

Таким образом, основные этапы биотехнологии получения растения-регенеранта в каллусе *in vitro*, полученном в культуре незрелых зародышей яровой мягкой пшеницы, следующие:

\* Автор для переписки:

© 2007 г. Катасонова А.А.

Институт биологии Уфимского научного центра РАН,  
Уфа, Башкортостан

1 — получение каллуса из незрелого (14–17 сут. после искусственного опыления) зародыша (питательная среда МС с добавлением 2,0 мг/л 2,4-Д);

2 — индукция формирования МО в таком каллусе (питательная среда МС с добавлением АБК);

3 — формирование и развитие эмбриоида из МО (питательная среда Вlaydes);

4 — прорастание эмбриоида в растение-регенерант, развитие растения-регенеранта до фенофазы кущения (питательная среда Вlaydes);

5 — развитие растения-регенеранта до фенофазы полной спелости зерна (в вегетационных сосудах).

Выявленное сходство в цито-гистологическом статусе зрелого эмбриоида (соматического зародыша) и зрелого зиготического зародыша пшеницы, а также сходство

в формировании и развитии растений-регенерантов *in vitro* и *ex vitro* и растений пшеницы зиготического происхождения позволяют рекомендовать использование разработанной биотехнологии в селекционных целях.

*Исследования поддержаны РФФИ (грант № 05-04-97911), РФФИ-офи (грант № 05-04-08114), программой «Ведущие научные школы Российской Федерации» (грант № НШ 4834.2006.4) и ГНТП АН РБ «Воспроизводство биоресурсного потенциала Республики Башкортостан».*

*Материалы IV Съезда Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова 6–7 декабря 2006 г.*



## УНИВЕРСАЛЬНЫЙ АНАЛИТИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС МОДУЛЬНОГО ТИПА ДЛЯ КОНТРОЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Л.П. КИСЛЯКОВА\*, Ю.Я. КИСЛЯКОВ

*Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург*

Для оптимального управления биотехнологическими процессами, связанными с производством новых продуктов питания, лекарственных препаратов, проведением санитарно-гигиенического и экологического контроля, решением проблем медицины, сельского хозяйства и биоэнергетики, разрабатывается универсальный аналитический комплекс модульного типа. Он позволяет оперативно и с достаточной точностью контролировать в жидких, газообразных средах и биологических субстанциях основные показатели, характеризующие состояние биологических систем, участвующих в биотехнологических процессах, а также сред их обитания. К их числу относятся: содержание  $O_2$ ,  $CO_2$ , неорганических ионов (Na, K, Ca и др.), скорость потребления  $O_2$  и выделения  $CO_2$ , величина pH, температура, давление и другие показатели.

Аналитический комплекс представляет собой компьютеризированную исследовательскую и диагностическую систему модульного типа. Он состоит из комплекта измерительных модулей, 2 компьютерных блоков (управления и анализа) и блока пробоподготовки. Каждый измерительный модуль состоит из сенсорного звена с погружными или проточными датчиками, электронного измерительного устройства, комплекта методов измерений и микроконтроллера, управляющего процессом измерений, обработки и передачи информации в компьютер.

Модули высокоточного и быстродействующего определения содержания  $O_2$  (электрохимический метод амперометрии с применением миниатюрного мембранного электрода типа Clark и отечественного электронного микрочипа — высокоточного измерителя малых токов), парциального давления  $CO_2$  в жидких

средах, уровня pH и концентрации неорганических ионов (метод потенциометрии с применением миниатюрных ионоселективных электродов), содержания  $CO_2$  в газовых средах (метод молекулярной корреляционной ИК-спектроскопии на основе полупроводниковых технологий) обеспечивают длительные непрерывные или периодические измерения этих показателей в ходе биотехнологических процессов.

Блок пробоподготовки представляет собой термостатируемую измерительную проточную ячейку с устройством для автоматической непрерывной или периодической подачи микропроб анализируемой среды. Компьютерная система управления с помощью микроконтроллеров обеспечивает автоматическое выполнение процедур: калибровка, ввод пробы в измерительную ячейку, измерение, расчет и отображение исследуемых показателей, контроль качества измерений, в том числе, с применением контрольных материалов любых фирм-изготовителей, контроль работоспособности всех модулей комплекса.

Модуль анализа предназначен для оценки параметров и прогнозирования состояния биотехнологического процесса. Он включает в себя задаваемый оператором план работы комплекса в автоматическом режиме: объем и периодичность пробоотбора, комплекты методик и программ обработки результатов измерений, критерии и способ выдачи сигналов «тревоги», а также формирование банка данных с информацией о результатах каждого эксперимента и выдачу результатов по каналам связи с центральным пультом управления биотехнологическим процессом.

Модульная организация анализатора позволяет оперативно формировать его структуру на основе перечня измеряемых показателей и физических свойств среды, в которой проводятся измерения.

Исследования, проведенные на биологических объектах (лабораторные животные, водные организмы,

\* Автор для переписки:

© 2007 г. Кислякова Л.П.

Институт аналитического приборостроения РАН,  
Санкт-Петербург



накожные измерения, клеточные культуры), свидетельствуют о высоких информационных и диагностических возможностях созданной модульной системы.

Разрабатываемый автоматизированный комплекс по аналитическим характеристикам соответствует лучшим зарубежным специализированным приборам-аналогам модулей комплекса, а по некоторым основным измеряемым параметрам (содержание и потребление  $O_2$ ) превосходит их. Универсальность его сенсорных модулей позволяет осуществлять измерение требуемых показателей в жидких, газообразных и биологических средах.

В отличие от существующих зарубежных специализированных приборов, он может быть использован для комплексных научных исследований. Предоставляемая уникальная возможность наблюдений за изменениями ключевых параметров биотехнологических процессов при действии физических, химических и других факторов чрезвычайно важна для разработки новых перспективных, высокоэффективных технологий и повышения качества выпускаемого продукта.

*Материалы IV Съезда Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова 6–7 декабря 2006 г.*

## МОДЕЛИРОВАНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОЙ L-АСПАРАГИНАЗЫ *ERWINIA CAROTOVORA* С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ ЭФФЕКТИВНОГО ПРОТИВОЛЕЙКОЗНОГО ПРЕПАРАТА

Ю.В. КРАСОТКИНА\*, А.Н. КУЧУМОВА, Н.Н. СОКОЛОВ

ГУ НИИ биомедицинской химии РАМН, Москва

Каталитические свойства бактериальной L-аспарагиназы определяют терапевтическую эффективность фермента, более 30 лет применяющегося как лекарственный препарат при лечении различных форм лейкозов у детей и взрослых. Рекombинантная L-аспарагиназа штамма *E. carotovora* (ECAR-LANS) в настоящее время является основой для разработки противоопухолевого препарата.

Цель данной работы — определение методами молекулярного моделирования структурных элементов молекулы ECAR-LANS, определяющих каталитическую активность и субстратную специфичность фермента.

Трехмерная структура ECAR-LANS была предсказана методом гомологичного моделирования с помощью программы Swiss-pdb Viewer. В качестве матрицы использовали структуру аспарагиназы *Erwinia chrysanthemii* с сукцинатом в активном центре (PDB 1HGOera). Мутагенез был смоделирован программой Swiss-pdb Viewer с последующей минимизацией энергии молекулы силовым полем GROMOS43B1 в вакууме.

Мономер аспарагиназы включает 8  $\alpha$ - и 14  $\beta$ -спиралей и состоит из двух доменов. Большой по размеру N-концевой домен связан с C-доменом линкером длиной около 20 аминокислотных остатков. Активный центр образован каталитическим карманом в углублении N-концевого домена. Вход в активный центр закрывает подвижная петля, состоящая из  $\approx 30$  аминокислотных остатков, среди которых находится высоко консервативный для всех аспарагиназ Thr15. Аминокислотные остатки C-концевого домена, главным из которых является Ser254, также участвуют в образовании активного центра и определяют связывание и стабилизацию лиганда.

Анализ гомологичной модели молекулы ECAR-LANS, кристаллической структуры EгA, данных ли-

тературы о структурно-функциональных особенностях известных бактериальных аспарагиназ показал, что эти два аминокислотных остатка, Thr15 и Ser254, в значительной степени определяют каталитические свойства ECAR-LANS. Также был смоделирован мутагенез молекулы аспарагиназы с целью повысить аспарагиназную активность фермента и снизить его глутаминазную специфичность. Замена Thr15 на структурный аналог — серин, являющийся более сильным нуклеофилом, не приведет к существенному изменению структуры активного центра ECAR-LANS, но повысит каталитическую активность аспарагиназы. Кроме того, в результате мутации Thr15Ser длина водородной связи между карбоксилем боковой группы лиганда и аминогруппой главной цепи Ser15 сокращается с 2,61 Å до 1,65 Å (для L-Glu), что обеспечит дополнительную стабилизацию субстрата при катализе. Ser254 в значительной степени определяет субстратную специфичность фермента. Вместе с Asp96 и Glu62 Ser254 создает область отрицательного заряда в активном центре, увеличивая тем самым взаимодействие с аминогруппой основной цепи лиганда. Это взаимодействие более существенно для связывания глутамина, чем для L-аспарагина. Возможно, замена Ser254Asn дестабилизирует это взаимодействие и изменит ориентацию боковой цепи L-Gln. При этом будут нарушены две водородные связи, стабилизирующие лиганд в активном центре фермента: между  $\delta$ -гидроксильной группой L-Gln и OH- и NH<sub>3</sub>-группами Thr95. Поэтому замена Ser254Asn приведет к дестабилизации L-Gln и тем самым к снижению глутаминазной специфичности ECAR-LANS. Клиническое применение аспарагиназы с высокой каталитической активностью и низкой глутаминазной специфичностью позволит оптимизировать терапевтические схемы химиотерапии лейкозов и снизить риск развития побочных эффектов.

\* Автор для переписки:

© 2007 г. Красоткина Ю.В.

ГУ НИИ биомедицинской химии РАМН, Москва

## РЕГУЛЯТОРЫ РОСТА И РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ В ТЕХНОЛОГИИ ВОЗДЕЛЫВАНИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР

Е.С. РОНЬЖИНА\*

*Калининградский государственный технический университет, Калининград*

В связи с ростом народонаселения нашей планеты вопросы рационального использования, охраны и воспроизводства пищевых растительных ресурсов в настоящее время имеют особую остроту. При этом у сельского хозяйства еще остался нереализованным ряд кардинальных возможностей, которые делают введение в практику подходов интенсивного земледелия необходимым и эффективным. Эта возможность обусловлена тем, что растения не полностью используют потенциалы их жизненной энергии.

Одна из возможностей использования продуктивного потенциала растений связана с применением регуляторов роста и развития. Эти соединения не обладают фитотоксичностью и характеризуются очень высокой физиологической активностью, в очень малых дозах (г/га) изменяя интенсивность физиологических процессов в растениях, что в сочетании с быстрым разложением в растительных тканях должно обеспечивать чистоту сельскохозяйственной продукции.

В наших опытах получены положительные результаты о стимуляции физиологически активными соединениями целого комплекса физиолого-биохимических процессов, оказывающих влияние на рост, развитие и продуктивность различных сельскохозяйственных культур. Среди испытанных регуляторов роста — синтетические аналоги природных фитогормонов цитокининов, ауксинов и брассиностероидов. Нами показано, что все они влияют на очень широкий спектр физиологических и биохимических процессов в растениях, вызывают наиболее существенные положительные эффекты при действии на все стороны продукционного процесса: всхожесть семян, формирование и функционирование фотосинтетического аппарата, транспорт и распределение ассимилятов в растениях, устойчивость к неблагоприятным факторам,

рост, развитие, функционирование хозяйственно ценных органов и отложение запасных питательных веществ.

Столь ценные свойства фиторегуляторов открывают возможности их практического применения, в том числе для повышения урожая; однако с этой целью такие препараты почти не используются. Во многом это связано с отсутствием научно обоснованной теории их использования в растениеводстве. Кроме того, как показали наши данные, подтвержденные имеющимися в литературе сведениями, разработку приемов и способов применения биологически активных соединений необходимо вести для каждой отдельной культуры, поскольку характер их воздействия зависит от целого ряда факторов: систематического положения растений и их компетентности к регулятору, места его воздействия, зависимости оказываемых эффектов от фазы роста и развития культуры, особенностей онтогенеза и технологий ее выращивания, трофических и других факторов.

Поэтому целью нашей работы была разработка научно обоснованных подходов к применению препаратов — аналогов природных фитогормонов цитокининовой, ауксиновой и стероидной (брассиностероидов) природы в растениеводстве — для повышения урожайности важнейших сельскохозяйственных культур. Мы исследовали картофель, томаты, бобы, кукурузу и лекарственные травы 9 видов. В качестве фиторегуляторов выбраны высокоактивные синтетические аналоги природных фитогормонов: цитокининов — 6-бензиламинопурин (БАП), ауксинов — индолил-3-масляная кислота, брассиностероидов — эпибрассинолид (эпин). В результате работы выявлены закономерности, которые важно учитывать при использовании фиторегуляторов.

1. Продуктивность растений, накопление запасных веществ в хозяйственно ценных органах можно повысить с помощью экзогенных обработок фиторегуляторами. Максимального развития эффект достигает при одновременной обработке производящих и потребляющих (запасяющих) ассимиляты органов, то есть листьев и

\* Автор для переписки:

© 2007 г. Роньжина Е.С.

Калининградский государственный технический университет

хозяйственно ценных органов. Однако он проявляется, хотя и в меньшей степени, при обработке только донорных (листьев), или только акцепторных (потребляющих и запасующих) органов.

2. В большинстве случаев наиболее эффективно фиторегулятор влияет на ту программу развития, которую органы проходят в момент обработки. Поэтому, обрабатывая растение на определенных стадиях развития, можно стимулировать развитие фотосинтетического аппарата, рост и формирование запасующих органов, задержать старение. Это увеличивает период интенсивного синтеза ассимилятов в листьях и их отложения в запас. Совокупность этих процессов создает предпосылки для повышения урожая.

3. Нередко фиторегулятор обладает длительным (до 1 мес.) последствием, поэтому для получения желаемого эффекта достаточно 2–3 обработок в течение вегетационного сезона. При этом большее количество обработок зачастую нецелесообразно, а превышение дозы препарата может оказывать ингибирующий эффект.

4. Для получения экологически чистой продукции (например, при выращивании лекарственных трав) возможно заменить обработку растений обработкой семян перед посадкой. Это оказывает положительное влияние

на всхожесть, энергию прорастания семян, а в дальнейшем — на рост и продуктивность растений.

Используя эти подходы, мы приступили к разработке технологии использования фиторегуляторов для повышения урожайности картофеля, томатов, бобов, кукурузы и ряда лекарственных растений. Так, например, БАП повысил урожай клубней картофеля в 1,3 раза, плодов томатов — более чем в 1,5 раза, биомассу надземной части и массу плодов и семян бобов — на 60–70%, зеленой массы кукурузы — примерно на 10%. Эффект был достигнут за счет стимуляции роста надземных органов растений, активации фотосинтеза и задержки старения листьев, что продлевало период ассимиляции  $\text{CO}_2$  и увеличивало период накопления органических веществ в хозяйственно ценных органах растений.

В целом, полученные результаты показали, что синтетические аналоги природных фитогормонов в технологии возделывания сельскохозяйственных культур могут быть с успехом применены в растениеводстве для повышения урожая.

*Материалы IV Съезда Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова 6–7 декабря 2006 г.*

## БИОДЕГРАДАЦИЯ ЭДТА

Э.Г. ДЕДЮХИНА\*, Т.И. ЧИСТЯКОВА, И.Г. МИНКЕВИЧ

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,  
Пушино Московской области*

### Области применения и распространение ЭДТА в природе

Этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) относится к группе аминокислот, характерной особенностью которых является способность связывать ионы металлов путем образования многочленных колец, что обуславливает более высокую стабильность комплексов по сравнению с обычными металл-лигандными комплексами, так называемый «хелатный» (клетчатый) эффект. Молекула ЭДТА содержит четыре карбоксильных группы, соединенных с двумя атомами азота (рис. 1).

Благодаря способности образовывать стабильные водорастворимые комплексы (хелаты) со многими металлами, ЭДТА используется в промышленных процессах для удаления ионов металлов. Известно, что при очистке атомных реакторов на одну операцию расходуется несколько сотен килограммов ЭДТА [1].

В целлюлозно-бумажной промышленности ЭДТА используется для стабилизации перекиси водорода, которая легко разлагается в присутствии ионов металлов (главным образом, марганца и железа), содержащихся в древесине. ЭДТА широко применяется для промывки теплоэнергетического оборудования, труб, котлов; водоподготовки в котельных и теплосетях; в производстве бытовой химии и синтетических моющих средств; в виде стабилизатора в процессах полимеризации; при производстве каучука; в аналитической химии и во многих других областях [1–4]. В последнее время ЭДТА находит широкое применение в сельском хозяйстве как

стимулятор фиторемедиации почв, так как способствует десорбции тяжелых металлов (меди, цинка, кадмия, хрома) из почвы, переводит их в растворимую форму и делает доступными для поглощения растениями [5]. В ряде стран ЭДТА используется в качестве добавок в фармацевтические препараты, косметику и пищу [6]. Применение ЭДТА в медицине связано с удалением тяжелых металлов из организма при лечении отравлений и использовании в качестве антидота при радиоактивном поражении.

Промышленное производство ЭДТА было начато в 1939 году в Германии. Потребление ЭДТА в Европе возросло от 26000 т в 1992 году до 34550 т в 1999 г.; в 2000 году суммарное мировое производство аминокислот, главным образом ЭДТА, достигло 200000 тонн [2, 4, 7].

Показано, что 70–80% от потребленного количества ЭДТА попадает в окружающую среду. В настоящее время ЭДТА считается одним из наиболее распространенных антропогенных загрязнителей в мире; концентрация ЭДТА в реках Европы и США варьирует от 10 до 100 мкг/л [2, 4, 8].

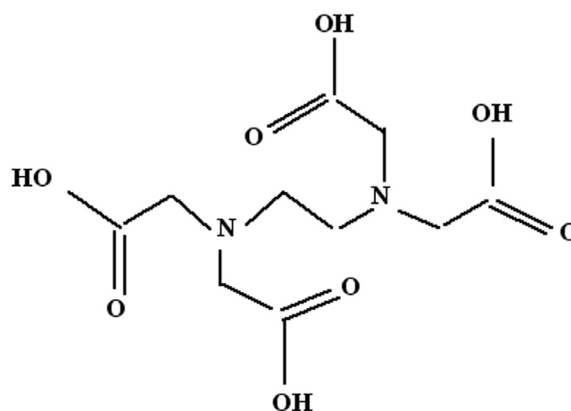


Рис. 1. Структурная формула ЭДТА

\* Автор для переписки:

© 2007 Дедюхина Эмилия Георгиевна,  
канд. биол. наук, ИБФМ РАН  
142290 Пушино Московской области  
Тел. 7-495-925-74.48  
E-mail: dedeg@rambler.ru



Считается, что ЭДТА характеризуется слабой токсичностью для млекопитающих [9]. В частности, было показано, что добавление ЭДТА в корм крысам в концентрации 250 мг/кг не вызывает отрицательных симптомов [6]. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), ежедневное потребление ЭДТА в форме  $\text{CaNa}_2$ -ЭДТА в концентрации 2,5 мг/кг не оказывает токсичного действия на организм человека; концентрация ЭДТА в питьевой воде не должна превышать 600 мкг/л [9].

Однако в литературе отсутствуют данные о влиянии ЭДТА на организм при длительном воздействии.

Имеются данные, что ЭДТА в свободном виде при концентрации более 2,8 г/л ингибирует рост грамотрицательных бактерий [7]. Предполагается, что ЭДТА взаимодействует с ионами металлов клеточных мембран, вызывая лизис клеток.

Отрицательное влияние ЭДТА в окружающей среде обусловлено, главным образом, хелатообразующим свойством этого соединения. Накопление ЭДТА в почве и воде рек и водоемов крайне нежелательно, так как это приводит к ремобилизации ионов металлов ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ) из почвы, ила и донных осадков и загрязнению ими грунтовых вод и питьевой воды.

Накопление ЭДТА в природе обусловлено тем, что ЭДТА является чрезвычайно устойчивым соединением. Единственным абиотическим путем разрушения ЭДТА в естественных водоемах является фотохимическое разложение комплекса Fe(III)-ЭДТА под воздействием УФ-лучей на поверхности воды [1, 10, 11]. Однако этот процесс зависит от климатических условий, сезона, освещенности и не может рассматриваться в качестве существенного фактора разрушения ЭДТА в природе [6].

Заметной деградации ЭДТА в очистных сооружениях обычно не происходит; фильтрация и озонирование питьевой воды не приводят к снижению в ней уровня ЭДТА [12, 13].

### Микроорганизмы-деструкторы ЭДТА

Микроорганизмы, способные к деградации ЭДТА, обнаруживаются в природе довольно редко. Имеются данные о выделении из активного ила промышленных очистных сооружений смешанной культуры ЭДТА-разрушающих микроорганизмов, состоящей из 14 видов бактерий, относящихся к родам *Methylobacterium*, *Variovorax*, *Enterobacter*, *Aureobacterium*, *Bacillus* [14].

В результате исследований, ведущихся уже более 40 лет, было выделено лишь несколько чистых культур ЭДТА-деградирующих бактерий. Сравнительная характеристика известных к настоящему времени штаммов-деструкторов ЭДТА приведена в таблицах 1 и 2.

Штамм *Agrobacterium radiobacter* ATCC 55002 был выделен из сточных вод, содержащих Fe(III)-ЭДТА, и способен использовать это соединение в качестве единственного источника углерода и энергии [15, 16]. Штамм способен разрушать высокие концентрации Fe(III)-ЭДТА (более 100 мМ), но не разрушает ЭДТА в свободном виде и другие металл-ЭДТА (Me-ЭДТА) комплексы. В условиях периодического культивирования бактерий деградация ЭДТА была наиболее эффективна при низких начальных значениях pH. Добавление в среду пептона или дрожжевого экстракта не оказывало влияния на деградацию ЭДТА, тогда как добавление глицерина резко подавляло этот процесс. Было высказано предположение, что в присутствии глицерина бактерии использовали ЭДТА только как источник азота. *Agrobacterium radiobacter* ATCC 55002 является единственным известным в настоящее время штаммом, способным разрушать такой устойчивый комплекс, как Fe(III)-ЭДТА.

Штамм грам-отрицательных бактерий BNC1 (DSM 6780), относящийся к  $\alpha$ -подгруппе *Proteobacteria*, был выделен из промышленных сточных вод [17]. Бактерии характеризовались потребностью в витаминах (биотин, тиамин, фолиевая кислота) и лучше росли в смешанной культуре с другим штаммом (BNC2), не способным к деградации ЭДТА [7]. Удельная скорость роста штамма BNC1 в смешанной культуре в присутствии Mg-ЭДТА варьировала в пределах 0,03–0,07 ч<sup>-1</sup>; выход клеток от потребленного субстрата (YX/S) составлял 27,0% [18]. Me-ЭДТА комплексы по скорости их разрушения клетками штамма BNC1 располагались в следующем порядке: (Mg-ЭДТА, Ba-ЭДТА, Ca-ЭДТА) > Mn-ЭДТА (см. табл. 2). Бактерии не разрушали более стабильные Me-ЭДТА комплексы. Не обнаружено роста бактерий в присутствии ЭДТА в свободном виде. Предполагается, что ЭДТА удаляет ионы  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  из наружных мембран, что приводит к лизису клеток [7, 17, 19].

Наиболее изученным представителем ЭДТА-деградирующих бактерий является штамм DSM 9103, отнесенный к новому роду в группе *Mesorhizobium/Phyllobacterium* [20–22]. Бактерии обладают способностью разрушать ЭДТА в свободном виде и широкий спектр Me-ЭДТА комплексов, которые по скорости

Таблица 1

## Физиологические показатели роста различных штаммов ЭДТА-деградирующих бактерий

Показатели	<i>Agrobacterium radiobacter</i> ATCC 55002) [15, 16]	BNC1 (DSM 6780) + BNC2 [18]	DSM 9103 [32]	<i>Pseudomonas sp.</i> LPM-410 [27, 28]	LPM-4 (ВКМ В-2445) [28, 29]
Оптимальная температура для роста клеток, °С	30	35	30	28–30	32–34
Максимальная удельная скорость роста, ч <sup>-1</sup> ( $\mu_{\max}$ )	—	0,03–0,07	0,053	0,088	0,095
Траты на поддержание жизнедеятельности клеток, ч <sup>-1</sup> ( $m_s$ )	—	—	0,020	0,070	0,068
Выход клеток от потребленного субстрата по массе, % ( $Y_{X/S}$ )	—	27,0	31,3	27,3	22,0
Выход клеток от потребленного субстрата по энергии, % ( $\eta_{X/S}$ )	—	—	44,8	39,0	31,4
Разрушаемые Me-ЭДТА комплексы	Fe-ЭДТА	Mg-, Ba-, Ca-, Mn-ЭДТА	Mg-, Ca-, Zn-, Mn-, Zn-, Pb-, Co-, Cu-ЭДТА	Mg-, Ca-, Ba-, Mn-, Zn-ЭДТА	Mg-, Ba-, Ca-, Mn-, Zn-ЭДТА

Примечание: знак «—» означает «нет данных»

их разрушения клетками располагаются в следующем порядке: Mg-ЭДТА > Ca-ЭДТА > Mn-ЭДТА > Zn-ЭДТА > Pb-ЭДТА > Co-ЭДТА > Cu-ЭДТА (см. табл. 2).

В условиях непрерывного культивирования данного штамма на ЭДТА-содержащей среде выявлены физиологические показатели роста клеток [23]. Показано, что максимальная удельная скорость роста ( $\mu_{\max}$ ) равна 0,053 ч<sup>-1</sup>; траты на поддержание жизнедеятельности клеток ( $m_s$ ) составляют 0,02 ч<sup>-1</sup> (см. табл. 1). По сравнению с другими деструкторами ЭДТА, штамм DSM 9103 характеризуется наиболее высокими значениями выхода клеток от потребленного субстрата. Выход клеток по массе достигает 31,3%. Энергетический выход клеток ( $\eta_{X/S}$ ), характеризующий долю энергии субстрата, перешедшую в ЭДТА, достигает 44,8% [23]. Известно, что энергия, выделяемая при окислении метаболитов в реакциях, катализируемых оксигеназами или оксидаза-

ми, не используется или используется только частично в дальнейших метаболических процессах [24, 25].

Обнаруженные высокие значения выхода биомассы у штамма DSM 9103 при ассимиляции ЭДТА позволяют высказать предположение, что энергия окисления боковых цепей молекулы ЭДТА при участии монооксигеназы частично используется клетками [23].

Показана возможность эффективной деградации различных Me-ЭДТА комплексов иммобилизованными клетками штамма DSM 9103 [26].

Штамм *Pseudomonas sp.* LPM-410 был выделен из городских очистных сооружений [27]. Установлено, что бактерии разрушают ЭДТА как в свободном виде, так и в виде комплексов с металлами, которые располагаются по скорости их разрушения клетками в следующем порядке: Mg-ЭДТА > Ca-ЭДТА > Ba-ЭДТА > Mn-ЭДТА > Zn-ЭДТА (см. табл. 2).

Скорости деградации ЭДТА различными штаммами бактерий

Me-ЭДТА комплекс	Константа стабильности ( $\log K_{Me-ЭДТА}$ ) [32]	<i>Agrobacterium radiobacter</i> ATCC 55002 [15, 16]	BNC1 (DSM 6780) + BNC2 [18]	DSM 9103 [32]	<i>Pseudomonas sp.</i> LPM-410 [27]	LPM-4 (VKM B-2445) [29]
		Скорость деградации				
		мМ/сут	$\mu$ М/(г белка мин)	мМ/(г клеток ч)	мМ/(г клеток ч)	мМ/(г клеток ч)
ЭДТА		0	0	0,146	0,506	0,453
Ba-ЭДТА	7,8	0	20,0	—	0,372	0,423
Mg-ЭДТА	10,6	0	20,0	0,255	0,525	0,501
Ca-ЭДТА	10,7	0	20,0	0,245	0,383	0,364
Mn-ЭДТА	15,6	0	15,0	0,096	0,363	0,310
Zn-ЭДТА	18,3	0	0	0,106	0,195	0,143
Pb-ЭДТА	18,0	0	0	0,099	0	0
Co-ЭДТА	18,1	0	0	0,048	0	0
Cu-ЭДТА	20,5	0	0	0,021	0	0
Fe(III)-ЭДТА	25,0	24,0	0	0	0	0

Примечание: знак «—» означает «нет данных»

При непрерывном культивировании бактерий в режиме рН-ауксостата, обеспечивающем рост клеток с максимальной скоростью, были определены зависимости физиологических показателей роста клеток от температуры культивирования [28] и рассчитаны значения максимальной удельной скорости роста ( $\mu_{max} = 0,088 \text{ ч}^{-1}$ ), затрат на поддержание жизнедеятельности клеток ( $ms = 0,070 \text{ ч}^{-1}$ ) и выхода клеток от потребленного субстрата как по массе ( $Y_{X/S} = 27,3\%$ ), так и по энергии ( $\eta_{X/S} = 39\%$ ) при оптимальной для роста бактерий температуре (28–30 °C) (см. табл. 1).

Недавно Т.И. Чистяковой (ИБФМ РАН) из городских очистных сооружений был выделен новый штамм бактерий, деградирующих ЭДТА (LPM-4, депонированный во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером VKM B-2445), который характеризуется уникальным свойством облигатности в отношении ЭДТА. На основании данных секвенирования 16S рДНК данный штамм был отнесен к группе  $\alpha$ -*Proteobacteria* [29]. Штамм характеризуется необычными питательными потребностями и растет только в присутствии ЭДТА.

Не обнаружено роста клеток на МПА, МПБ и на средах, содержащих глюкозу, этанол или ацетат в ка-

честве источников углерода и энергии и источники азота как неорганические (сульфат аммония, нитрат калия), так и органические (мочевина, пептон, гидролизат казеина, аминокислота или дрожжевой экстракт). Неорганические источники азота (сульфат аммония и нитрат калия), добавленные в ЭДТА-содержащую среду, не оказывали влияния на рост клеток, тогда как органические источники азота (пептон, гидролизат казеина, аминокислота) ингибировали рост бактерий [29].

При внесении глюкозы в ЭДТА-содержащую среду потребление нового субстрата начиналось только после исчерпания ЭДТА и приводило к дополнительному росту клеток [30]. В экстрактах клеток облигатного деструктора ЭДТА не обнаружено активностей ферментов гликолиза (6-фосфофруктокиназы, альдолазы-1,6-дифосфата) и 2-кето-3-дезоксид-6-фосфоглюконата, что, вероятно, является одной из причин неспособности данного штамма расти на углеводах [31].

Штамм LPM-4 способен разрушать ЭДТА в свободном виде и такой же спектр Me-ЭДТА комплексов, как штамм *Pseudomonas sp.* LPM-410. Бактерии характеризуются более высоким температурным оптимумом для роста клеток (32–34 °C), чем штамм DSM 9103 и *Pseudomonas sp.* LPM-410 (см. табл. 1).

В условиях непрерывного культивирования штамма LPM-4 определены физиологические показатели роста и деградации ЭДТА ([28]. Как видно из таблицы 1, величина максимальной удельной скорости роста у штамма LPM-4 ( $0,095 \text{ ч}^{-1}$ ) близка к таковой у *Pseudomonas* sp. LPM-410 ( $0,088 \text{ ч}^{-1}$ ), но значительно выше, чем у штамма DSM 9103 ( $0,053 \text{ ч}^{-1}$ ). Траты на поддержание жизнедеятельности клеток у штаммов LPM-4 и LPM-410 мало различаются ( $0,068$  и  $0,070 \text{ ч}^{-1}$ , соответственно) и значительно выше, чем у штамма DSM 9103 ( $0,020 \text{ ч}^{-1}$ ). Штамм LPM-4 характеризуется наиболее низким выходом клеток от потребленного субстрата по сравнению со штаммами LPM-410 и DSM 9103. Величина (YX/S) составляла 22% при  $30\text{--}32 \text{ }^\circ\text{C}$  и снижалась в 1,3 раза при  $20$  и  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  [28]. Наибольшая величина энергетического выхода клеток составляла лишь 31,4% (см. табл. 1). Сравнительно высокая удельная скорость роста клеток и низкие значения выхода биомассы от потребленного субстрата определяют перспективность данного штамма для практического использования при очистке сточных вод от ЭДТА.

### Деградация бактериями различных металл-ЭДТА комплексов

Интенсивность бактериальной деградации ЭДТА существенно зависит от природы комплексов ЭДТА с металлами. Стабильность металл-ЭДТА комплексов характеризуется константой стабильности ( $K_{\text{Me-ЭДТА}}$ ), которая рассчитывается по формуле:

$$K_{\text{Me-ЭДТА}} = [\text{Me-ЭДТА}] / ([\text{Me}] [\text{ЭДТА}]),$$

где  $[\text{Me}]$  — концентрация иона металла;  $[\text{ЭДТА}]$  — концентрация ЭДТА;  $[\text{Me-ЭДТА}]$  — концентрация металл-ЭДТА комплекса в равновесном состоянии.

Сравнительные данные о деградации Me-ЭДТА комплексов известными в литературе деструкторами ЭДТА представлены в таблице 2. Среди исследованных бактерий выделяется штамм *Agrobacterium* sp. ATCC 55002, обладающий способностью разрушать только высоко устойчивый комплекс Fe(III)-ЭДТА ( $\log K_{\text{Me-ЭДТА}} 25,0$ ) со скоростью  $24 \text{ мМ/сут}$  [15, 16].

Штамм BNC1 при росте в смеси со штаммом BNC2 разрушал комплексы Ba-ЭДТА, Mg-ЭДТА и Ca-ЭДТА с одинаковой скоростью:  $20 \text{ мМ/(г белка мин.)}$  и комплекс Mn-ЭДТА с меньшей скоростью:  $15 \text{ мМ/(г белка мин.)}$  [18].

Отмытые клетки штаммов LPM-4 и *Pseudomonas* sp. LPM-410 разрушали комплексы с относительно низ-

кой константой стабильности ( $\log K_{\text{Me-ЭДТА}}$  ниже 16), такие как Mg-ЭДТА, Ca-ЭДТА, Ba-ЭДТА и Mn-ЭДТА с постоянной скоростью:  $0,310\text{--}0,525 \text{ мМ ЭДТА/(г клеток ч)}$  (см. табл. 2). Более стабильный комплекс Zn-ЭДТА разрушался клетками только частично с начальной скоростью  $0,145\text{--}0,195 \text{ мМ ЭДТА/(г клеток ч)}$  [27, 29].

Спектр Me-ЭДТА комплексов, разрушаемых штаммом DSM 9103, был шире и включал также такие стабильные комплексы, как Pb-ЭДТА, Co-ЭДТА и Cu-ЭДТА (см. табл. 2) [32].

Было установлено, что вид металла в комплексе Me-ЭДТА оказывает существенное влияние на динамику разрушения этого комплекса бактериями. На рисунках 2 и 3 представлены данные о деградации различных Me-ЭДТА комплексов суспензией клеток штамма DSM 9103 [32]. Обнаружено, что ЭДТА в свободном виде и Me-ЭДТА комплексы с относительно низкой константой стабильности ( $\log K_{\text{Me-ЭДТА}}$  ниже 16), такие как Mg-ЭДТА, Ca-ЭДТА и Mn-ЭДТА, полностью разрушались клетками в течение 10 ч инкубации с постоянной скоростью (рис. 2). Удельные скорости разрушения этих комплексов коррелировали с константами их стабильности. Такие же результаты были получены в опытах с другими деструкторами ЭДТА — *Pseudomonas* sp. LPM-410 [27] и штаммом LPM-4 [29].

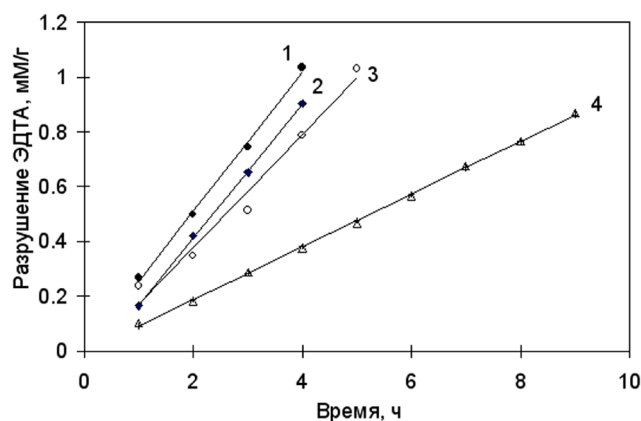


Рис. 2. Деградация ЭДТА в свободном виде (3) или в виде комплексов с  $\text{Mg}^{2+}$  (1),  $\text{Ca}^{2+}$  (2),  $\text{Mn}^{2+}$  (4) отмытыми клетками штамма DSM 9103 (по данным [32])

Совершенно иная картина наблюдалась при деградации клетками штамма DSM 9103 стабильных Me-ЭДТА комплексов ( $\log K_{\text{Me-ЭДТА}}$  18 и выше), таких как Zn-ЭДТА, Pb-ЭДТА, Co-ЭДТА и Cu-ЭДТА (рис. 3). Удельная скорость деградации этих комплексов была наибольшей в течение первых 5–10 ч инкубации, а затем



резко снижалась, что, возможно, объясняется токсичным действием ионов тяжелых металлов, высвобождаемых из Me-ЭДТА комплексов в процессе их деградации. Начальные удельные скорости деградации (в течение первых 5 ч) Zn-ЭДТА, Pb-ЭДТА, Co-ЭДТА и Cu-ЭДТА составляли соответственно 0,106; 0,099; 0,048 и 0,021 мМ ЭДТА/(г клеток ч). Полного разрушения Me-ЭДТА комплексов не происходило за 48 ч инкубации с клетками бактерий; степень деградации Co-ЭДТА, Zn-ЭДТА и Pb-ЭДТА составляла 55–85%, а Cu-ЭДТА – лишь 30% [32].

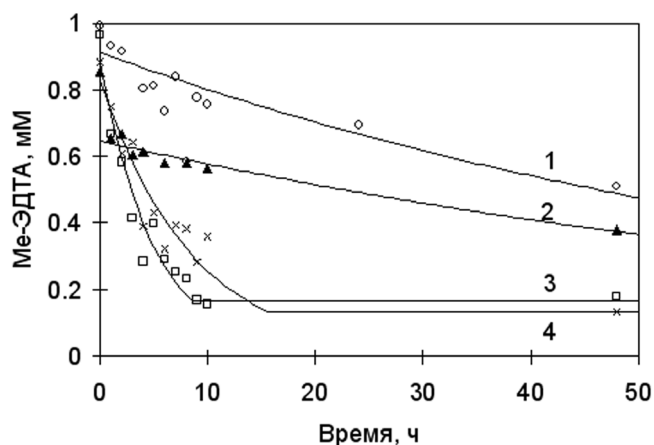


Рис. 3. Деградация комплексов ЭДТА с  $\text{Co}^{2+}$  (1),  $\text{Cu}^{2+}$  (2),  $\text{Pb}^{2+}$  (3),  $\text{Zn}^{2+}$  (4) отмытыми клетками штамма DSM 9103 (по данным [32])

Таким образом, Me-ЭДТА комплексы по степени биodeградируемости могут быть разделены на три группы: 1) комплексы с относительно низкой константой стабильности ( $K$  ниже 1016), такие как Mg-ЭДТА, Ca-ЭДТА, Ba-ЭДТА и Mn-ЭДТА, они разрушаются клетками бактерий с постоянной скоростью; 2) трудно деградируемые Me-ЭДТА комплексы с константами стабильности выше 1018, такие как Zn-ЭДТА, Pb-ЭДТА, Co-ЭДТА и Cu-ЭДТА, разрушаются клетками лишь частично; 3) Me-ЭДТА комплексы, не деградируемые бактериями: в частности, в литературе отсутствуют сведения о биodeградации таких комплексов, как Cd-ЭДТА, Ni-ЭДТА и Hg-ЭДТА с константами стабильности ( $K_{\text{Me-ЭДТА}}$ ) 1016,3; 1019,4 и 1021,2, соответственно.

Зависимость бактериальной деградации ЭДТА от природы Me-ЭДТА комплексов следует учитывать при прогнозировании биodeградации ЭДТА в окружающей среде. Например, имеются данные [1], что в реке Глатт (Швейцария) комплексы ЭДТА с металлами содержатся в следующем соотношении: Fe(III)-ЭДТА (31%), Zn-

ЭДТА (30%), Mn-ЭДТА (15%), Ca-ЭДТА (12%), Ni-ЭДТА (10%), Pb-ЭДТА (2%), Cu-ЭДТА (0,5%). Следовательно, в данной реке только 30% ЭДТА (в форме Ca-ЭДТА и Mn-ЭДТА) доступно для быстрой деградации при использовании штаммов DSM 9103, LPM-4, *Pseudomonas sp.* LPM-410 и BNC1. Комплекс Zn-ЭДТА может быть частично разрушен в течение длительного времени при использовании первых трех из указанных штаммов.

Анализ данных об эффективности роста и деградации ЭДТА различными штаммами бактерий (см. табл. 1 и 2) показывает, что штаммы LPM-4 и *Pseudomonas sp.* LPM-410, в отличие от штамма DSM 9103, характеризуются более высокими скоростями роста, меньшими значениями выхода клеток от использованного субстрата и более высокими значениями удельных скоростей деградации комплексов Mg-, Ca-, Mn- и Zn-ЭДТА (это является преимуществом с точки зрения их возможного практического использования для очистки сточных вод). Вместе с этим они не способны разрушать более устойчивые комплексы Pb-, Co- и Cu-ЭДТА. Штамм LPM-4 отличается от известных деструкторов ЭДТА уникальным свойством облигатности в отношении ЭДТА и может расти только в присутствии ЭДТА; другие углеродные субстраты, такие как глюкоза, могут потребляться клетками только после исчерпания ЭДТА и не оказывают влияния на деградацию ЭДТА [30].

Следует отметить, что ЭДТА-деградирующая активность клеток в периодической культуре существенно зависит от фазы роста бактерий. Удельная скорость деградации Mg-ЭДТА суспензией отмытых клеток штамма DSM 9103 была наибольшей в экспоненциальную фазу роста и резко падала при истощении ЭДТА из среды в период стационарной фазы [33]. Ранее в исследованиях с бактериальным штаммом BNC1 также было обнаружено резкое снижение жизнеспособности клеток в стационарную фазу [7]. Эти данные подчеркивают необходимость использовать только клетки из экспоненциальной фазы роста для засева среды при культивировании ЭДТА-деградирующих бактерий.

Специфичность бактерий в отношении деградации различных Me-ЭДТА комплексов, возможно, определяется специфичностью транспортных систем и/или ЭДТА-деградирующего ферментного комплекса.

### Транспорт ЭДТА в бактериальную клетку

Исследования, проведенные с бактериальными штаммами DSM 9103 и BNC-1, показали, что транспорт



ЭДТА в цитоплазму клеток осуществляется индуцибельной энергозависимой транспортной системой [18, 21]. У бактерий DSM 9103 скорость транспорта ЭДТА ( $V_{\max}$ ) составляла 1,0 нмоль/(мг белка мин.); константа насыщения была равна 0,39–0,06 мкмоль. Скорость транспорта ЭДТА в клетки существенно зависела от температуры, рН и от природы комплексов ЭДТА с металлами. Обнаружена корреляция между константами стабильности Me-ЭДТА комплексов и скоростями их транспорта внутрь клеток. В частности, показано, что Me-ЭДТА комплексы с низкими константами стабильности ( $\log K_{\text{Me-ЭДТА}} = 7,8-10,7$ ), такие как Mg-, Ca- и Ba-ЭДТА, потреблялись клетками штамма DSM 9103 со скоростями 5,7–6,4 нмоль/(мг белка мин.); скорость транспорта Mn-ЭДТА ( $\log K_{\text{Me-ЭДТА}} = 15,6$ ) была в два раза ниже, тогда как хелаты с константой стабильности выше 1016 не потреблялись клетками.

Предполагается два механизма транспорта ЭДТА в бактериальную клетку [21]: 1) переносчик способен переносить все Me-ЭДТА комплексы, но с различной скоростью; 2) только один хелат может транспортироваться в клетку, например, ЭДТА в свободном виде или специфический Me-ЭДТА комплекс. Последний механизм предполагает обмен металлов в Me-ЭДТА комплексе перед его транспортом; этот механизм может объяснить, почему только комплексы с низкой константой стабильности потребляются клетками.

До настоящего времени остается неясным вопрос, может ли ЭДТА переноситься внутрь клеток в свободном виде или только в форме комплексов с металлами. Было высказано предположение, что ЭДТА, даже в отсутствие металлов в среде, может образовывать комплексы с ионами металлов, адсорбированными на поверхности клеток, и в виде Me-ЭДТА комплексов проникать в цитоплазму [21].

Если ЭДТА переносится в клетки в виде Me-ЭДТА комплексов, возникает вопрос о судьбе большого количества ионов металлов, проникших в клетку. Имеются данные, что клетки могут не только экскретировать ионы металлов в среду, но и осаждать их внутри цитоплазмы. В частности, при электронно-микроскопическом исследовании клеток штамма DSM 9103, выращенного на среде с ЭДТА, в цитоплазме были обнаружены темные, электронно-плотные округлые включения, содержащие высокие концентрации кальция, магния и фосфора [21, 22]. Аналогично этому при выращивании бактерий с ЭДТА-хелатом железа были получены электронно-плотные нерастворимые внутриклеточные включения, содержавшие магниточувствительные соединения железа [34].

## Механизм деградации ЭДТА у бактерий

Механизм начальных этапов деградации ЭДТА был исследован у бактериальных штаммов DSM 9103 [35], BNC1 [18, 36, 37] и у штамма LPM-4, облигатного деструктора ЭДТА [31]. Было показано, что начальные этапы деградации ЭДТА включают последовательное окислительное отщепление из молекулы ЭДТА двух ацетильных групп с образованием глиоксилата. В качестве промежуточного продукта образуется этилендиаминриацетат (ЭДЗА), конечным продуктом является  $N,N'$ -этилендиаминдиацетат ( $N,N'$ -ЭДДА) (рис. 4). Реакция проходит в два этапа: 1) трансформация ЭДТА в ЭДЗА с выделением глиоксилата; 2) деградация ЭДЗА с образованием  $N,N'$ -ЭДДА и глиоксилата. Поскольку лишь незначительные концентрации ЭДЗА обнаруживаются в реакционной смеси, было высказано предположение, что фермент имеет равное сродство к ЭДТА и ЭДЗА. Установлено, что реакция удаления второй ацетильной группы из молекулы ЭДТА является стерео селективной, поскольку из двух возможных изомеров ЭДДА только  $N,N'$ -ЭДДА был идентифицирован в реакционной смеси. Следует отметить, что  $N,N'$ -ЭДДА не является субстратом для данной ферментной системы, хотя его дальнейшее превращение наблюдалось в экстрактах клеток штамма DSM 9103 и не зависело от присутствия каких-либо кофакторов [35].

Установлено, что начальная деградация ЭДТА осуществляется ферментным комплексом, ЭДТА-монооксигеназой (ЭДТА-МО), состоящим из двух компонентов (А и В) [35]. Компонент А является монооксигеназой, которая катализирует расщепление ЭДТА и ЭДЗА в присутствии кислорода и восстановленного флавинонуклеотида (ФМН- $H_2$ ). Компонент В является НАД- $H_2$ : ФМН оксидоредуктазой, обеспечивающей перенос восстановительных эквивалентов от НАД- $H_2$  к ФМН с образованием ФМН  $H_2$ .

Было обнаружено, что ферментный комплекс ЭДТА-МО использует в качестве субстратов только комплексы ЭДТА с  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  и не использует ЭДТА в свободном виде или в виде Ca-ЭДТА [35]. Не обнаружено корреляции между стабильностью Me-ЭДТА комплексов и их деградацией ЭДТА-монооксигеназой. В частности, комплекс Ca-ЭДТА ( $\log K_{\text{Me-ЭДТА}} = 10,7$ ) не разрушался ЭДТА-МО, тогда как Co-ЭДТА ( $\log K_{\text{Me-ЭДТА}} = 18,1$ ) использовался в качестве субстрата. Установлено, что комплекс Mg-ЭДТА окислялся ЭДТА-МО с наибольшей скоростью. Предполагается, что поскольку ионы  $Mg^{2+}$  являются

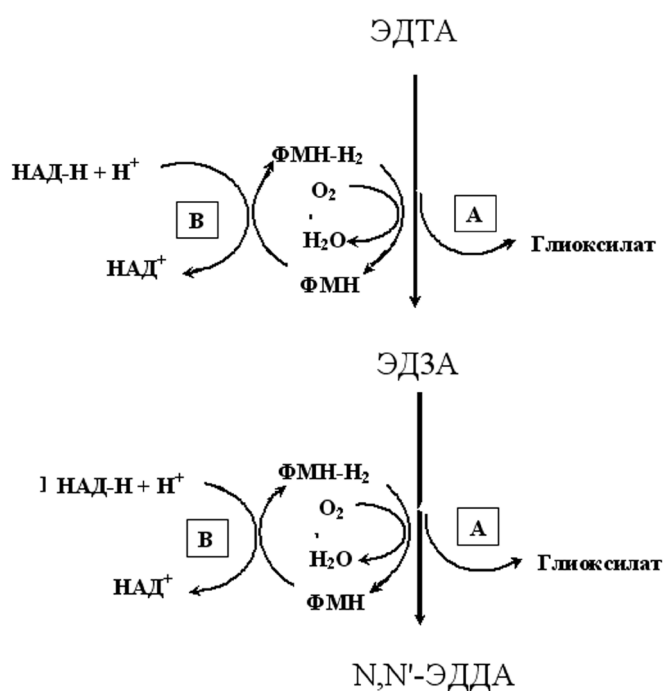


Рис. 4. Механизм деградации ЭДТА бактериальным штаммом DSM 9103. А и В – компоненты ферментного комплекса ЭДТА-МО (по данным [35])

преобладающими внутриклеточными двухвалентными катионами, ЭДТА присутствует в цитоплазме клеток преимущественно в виде комплекса Mg-ЭДТА. Высказывается предположение, что стабильные Me-ЭДТА комплексы должны подвергаться диссоциации перед прохождением внутрь клетки; этот процесс значительно усиливается при высоких значениях рН [1].

### Практическое использование ЭДТА-деградирующих микроорганизмов

Перспективным направлением практического использования ЭДТА-деградирующих микроорганизмов является разработка на их основе биосенсоров для эффективного мониторинга ЭДТА в окружающей среде, поскольку существующие в настоящее время методы анализа ЭДТА с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии, газо-жидкостной хроматографии и капиллярного электрофореза трудоемки и требуют дорогостоящего оборудования. В этом отношении представляют интерес данные [22] о возможности определения очень низких концентраций ЭДТА (от 5 до 100  $\mu$ М) с использованием такого косвенного показателя, как скорость потребления кислорода иммобилизованными клетками бактериального штамма DSM 9103.

Наиболее важным направлением является использование ЭДТА-деградирующих микроорганизмов для очистки сточных вод, поскольку существенного разрушения ЭДТА в очистных сооружениях в процессе традиционной биологической или физико-химической обработки не происходит. Первое сообщение об использовании смешанных микробных популяций для деградации ЭДТА в промышленных сточных водах относится к 1975 году [38]. В лабораторных условиях было показано, что около 90% Fe-ЭДТА было разрушено за 5 сут, причем в среде обнаружены промежуточные продукты ЭДТА деградации, ЭДЗА и иминодиацетат. Позднее был запатентован процесс очистки сточных вод от высоких концентраций Fe-ЭДТА с использованием чистой культуры бактерий *Agrobacterium sp.* [16].

В промышленных условиях, с применением смешанной культуры ЭДТА-разрушающих бактерий в очистных сооружениях целлюлозно-бумажного комбината, была отмечена биодеградация 80% ЭДТА за 28 сут при 35 °С [39].

При использовании смешанной культуры бактерий, деструкторов ЭДТА, иммобилизованных на твердом носителе, было достигнуто почти полное разрушение ЭДТА (99%) в сточной воде, содержащей 200 мг ЭДТА/л при рН 9,0–9,5 [40]. Установлено, что биодеградация ЭДТА наиболее эффективна при высоких значениях рН, в частности, оптимальная деградация ЭДТА в очистных сооружениях была отмечена при рН 8,0–9,0, тогда как при рН 7,0 разрушения ЭДТА не наблюдалось [41]. При обработке сточных вод целлюлозно-бумажного производства с использованием смешанной культуры бактерий, эффективность деградации ЭДТА возрастала от 10 до 50% при изменении рН от 6,5–7,0 до 8,0–9,0 [1]. Влияние рН на биодеградацию ЭДТА, вероятно, обусловлено тем, что при низких значениях рН в сточных водах преобладает чрезвычайно устойчивый комплекс Fe(III)-ЭДТА [13].

Имеются данные об успешном использовании штамма DSM 9103 для очистки городских сточных вод, содержащих 3,5 мМ ЭДТА [20]. Необходимым условием эффективной деградации ЭДТА было добавление минеральной среды, содержащей высокие концентрации щелочноземельных металлов, что подтверждает зависимость бактериальной деградации ЭДТА от металлов, преобладающих в составе Me-ЭДТА комплексов.

Для обработки промышленных ЭДТА-содержащих сточных вод разработан процесс с использованием смеси бактериальных штаммов BNC1 и BNC2. Клетки фиксировали на твердом носителе и использовали в

виде биопленки в эрлифтном циркуляционном реакторе. Разрушение ЭДТА составляло 95–98% при начальной концентрации 0,45 г/л. Скорость деградации достигала 12, 8 кг ЭДТА/(м<sup>3</sup> сут) при скорости протока 1,2 ч<sup>-1</sup> [7]. Однако при длительной работе реактора ионы металлов, высвобождающиеся из Me-ЭДТА комплексов, осаждались в виде солей на носителе, удерживающем клетки. Для решения этой проблемы было предложено использовать реактор с вращающимся диском или струйный реактор с периодической флюидизацией нарощей биомассы или осадка солей [18]. Обнаружено, что при добавлении глицерина в реактор степень деградации ЭДТА постепенно снижалась из-за изменения состава микробной популяции. В связи с этими наблюдениями было предложено использовать двухстадийный процесс для очистки сточных вод, содержащих, кроме ЭДТА, высокие концентрации легкоусвояемых соединений. Первая стадия включала в себя удаление легкоусвояемых углеродных субстратов; на второй стадии проводили разрушение ЭДТА с использованием бактериального штамма BNC-1 [18].

Недавно был разработан двухстадийный процесс для обработки сточных вод, содержащих высокие концентрации Fe(III)-ЭДТА [18]. Первая стадия заключалась в физико-химической обработке сточных вод с целью замещения ионов железа в Me-ЭДТА комплексе на ионы кальция (для этого сточные воды обрабатывали гидроокисью кальция). На второй стадии разрушение Ca-ЭДТА проводили с использованием смеси штаммов BNC1 и BNC2 (Noertemann, 2005).

Таким образом, в результате анализа литературных данных можно сделать заключение, что технология биodeградации ЭДТА в сточных водах, содержащих, кроме ЭДТА, легкоусвояемые углеродные субстраты или ионы тяжелых металлов, должна включать в себя две стадии: 1) физико-химическая обработка сточных вод для замещения ионов тяжелых металлов в Me-ЭДТА комплексах на Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> или Mn<sup>2+</sup>, а также удаление легкоусвояемых соединений путем традиционной обработки; 2) биodeградация ЭДТА с использованием чистых культур ЭДТА-разрушающих бактерий или их смесей. Представленные выше сведения о путях и механизмах разрушения ЭДТА чистыми культурами бактерий являются основой для разработки эффективных промышленных способов биodeградации ЭДТА.

*В обзоре представлены результаты собственных исследований, полученные при финансовой поддержке РФФИ (грант 06-04-49580а).*

## Литература

1. *Bucheli-Witschel M., Egli T.* Environmental fate and microbial degradation of aminopolycarboxylic acids // *FEMS Microbiol. Rev.* — 2001. — Vol. 25. — P. 69–106.
2. *Sillanpaa M.* Environmental fate of EDTA and DTPA // *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* — 1997. — Vol. 152. — P. 85–111.
3. *Sillanpaa M.* Distribution and fate of chelating agents in the environment // In: *Biogeochemistry of Chelating Agents* / Eds. Nowack B., VanBriesen J.M. / ACS Symposium Series 910. — N.Y.: Washington, DC. — 2005. — P. 226–233.
4. *Nowack B., VanBriesen J.M.* Chelating agents in the environment // In: *Biogeochemistry of Chelating Agents* / Eds. Nowack B., VanBriesen J.M. / ACS Symposium Series 910. — N.Y.: Washington, DC. — 2005. — P. 1–18.
5. *Song J., Luo Y.M., Wu L.H.* Chelate-enhanced phytoremediation of heavy metal contaminated soil // In: *Biogeochemistry of Chelating Agents* / Eds. Nowack B., VanBriesen J.M. / ACS Symposium Series 910. — N.Y.: Washington, DC. — 2005. — P. 366–382.
6. *Wolf K., Gilbert P.A.* EDTA—Ethylenediaminetetraacetic acid // In: *The Handbook of Environmental Chemistry* / Ed. Hutzinger O. — Berlin, Heidelberg: Springer Verlag. — 1992. — P. 241–259.
7. *Henneken L., Noertemann B., Hempel D.C.* Influence of physiological conditions on EDTA degradation // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 1995. — Vol. 44. — P. 190–197.
8. *Gardiner J.* Complexation of trace metals by ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) in natural waters // *Water Res.* — 1976. — Vol. 10. — P. 507–514.
9. *Grundler O.J., Arnold T.M., van der Steen, Wilmot J.* Overview of the European risk assessment on EDTA // In: *Biogeochemistry of Chelating Agents* / Eds. Nowack B., VanBriesen J.M. / ACS Symposium Series 910. — N.Y.: Washington, DC. — 2005. — P. 336–347.
10. *Means J.L., Kucak T., Crerar D.A.* Relative degradation rates of NTA, EDTA and DTPA and environmental implications // *Environ. Pollut. (Series B).* — 1980. — P. 45–60.
11. *Kari F.G., Giger W.* Modeling the photochemical degradation of ethylenediaminetetraacetate in the river Glatt // *Environ. Sci. Technol.* — 1995. — P. 2814–2827.
12. *Hinck M.L., Ferguson J., Puhaakka J.* Resistance of EDTA and DTPA to aerobic biodegradation // *Wat. Sci. Tech.* — 1997. — Vol. 35. — P. 25–31.
13. *Kari F.G., Giger W.* Speciation and fate of ethylenediamine tetraacetate (EDTA) in municipal wastewater treatment // *Water Res.* — 1996. — Vol. 30. — P. 122–134.
14. *Thomas R.A.P., Lawlor K., Bailey M., Macaskie L.E.* Biodegradation of metal-EDTA complexes by an enriched microbial population // *Environ. Microbiol.* — 1998. — Vol. 64. — P. 1319–1322.



15. Lauff J.J., Steele D.B., Coogan L.A., Breitfeller J.M. Degradation of the ferric chelate of EDTA by a pure culture of an *Agrobacterium* sp. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1990. – Vol. 56. – P. 3346–3353.
16. Lauff J., Breitfeller J., Steele D.B., Coogan L. Pure culture of *Agrobacterium* sp. which degrades ferric chelates // *US Patent.* 5,364,786. – 1994.
17. Noertemann B. Total degradation of EDTA by mixed cultures and a bacterial isolate // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1992. – Vol. 58. – P. 671–676.
18. Noertemann B. Biodegradation of chelating agents: EDTA, DTPA, PDTA, NTA, and EDDS // In: *Biogeochemistry of Chelating Agents* / Eds. Nowack B., VanBriesen J.M. / ACS Symposium Series 910. – N.Y.: Washington, DC. – 2005. – P. 150–170.
19. Wilkinson S.G. Cell walls of *Pseudomonas* species sensitive to ethylenediaminetetraacetic acid // *J. Bacteriol.* – 1970. – Vol. 104. – P. 1035–1044.
20. Witschel M., Weilenmann H-U., Egli T. Degradation of EDTA by a bacterial isolate // Poster presented at the 54<sup>th</sup> Annual Meeting of the Swiss Society of Microbiology, Lugano, 1995.
21. Witschel M., Egli T., Zehnder A.J.B., Wehrli E., Spycher M. Transport of EDTA into cells of the EDTA-degrading bacterial strain DSM 9103 // *Microbiology.* – 1999. – Vol. 145. – P. 973–983.
22. Weilenmann H-U, Engeli B., Bucheli-Witschel M., Egli T. Isolation and growth characteristics of an EDTA-degrading member of the  $\alpha$ -subclass of Proteobacteria // *Biodegradation.* – 2004. – Vol. 15. – P. 289–301.
23. Minkevich I.G., Satroutdinov A.D., Dedyukhina E.G., Chistyakova T.I., Eroshin V.K. Degradation of EDTA by a chemostat culture of bacterial strain DSM 9103 // *Process Biochem.* – 2003. – Vol. 38. – P. 1559–1564.
24. Minkevich I.G., Eroshin V.K. Energetic indices of aerobic microbial growth // *Stud. Biophys.* – 1975. – Vol. 49. – P. 43–52.
25. Minkevich I.G. Estimation of available efficiency of microbial growth on methanol and ethanol // *Biotechnol. Bioeng.* – 1985. – Vol. 27. – P. 792–799.
26. Eroshin V.K., Satroutdinov A.D., Minkevich I.G., Dedyukhina E.G., Chistyakova T.I., Reshetilov A.N. Kinetic characteristics of metal–EDTA degradation by immobilised cells of bacterial strain DSM 9103 // *Process Biochem.* – 2002. – Vol. 38. – P. 151–154.
27. Chistyakova T.I., Belikova V.L., Satroutdinov A.D., Dedyukhina E.G., Eroshin V.K. A novel EDTA-degrading *Pseudomonas* sp. // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2003. – Vol. 19. – P. 977–980.
28. Minkevich I.G., Satroutdinov A.D., Dedyukhina E.G., Chistyakova T.I., Kaparullina E.N., Koshelev A.V., Okunev O.N. The effect of temperature on bacterial degradation of EDTA in pH-auxostat // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2006. – Vol. 22. – P. 1205–1213.
29. Chistyakova T.I., Dedyukhina E.G., Satroutdinov A.D., Kaparullina E.N., Gavrish E.Yu., Eroshin V.K. EDTA-dependent bacterial strain // *Process Biochem.* – 2005. – Vol. 40. – P. 601–605.
30. Satroutdinov A.D., Chistyakova T.I., Dedyukhina E.G., Minkevich I.G. Microbial degradation of EDTA: New EDTA-degrading bacterial strains // In: *Biogeochemistry of Chelating Agents* / Eds. Nowack B., VanBriesen J.M. / ACS Symposium Series 910. – N.Y.: Washington, DC. – 2005. – P. 171–182..
31. Доронина Н.В., Капаруллина Е.Н., Вайнштейн М.Б., Троценко Ю.А. Особенности метаболизма облигатного деструктора этилендиаминтетраацетата // *Микробиология.* – 2006. – № 3. – С. 420–423.
32. Satroutdinov A.D., Dedyukhina E.G., Chistyakova T.I., Witschel M., Minkevich I.G., Eroshin V.K., Egli T. Degradation of metal–EDTA complexes by resting cells of the bacterial strain DSM 9103 // *Environ. Sci. Technol.* – 2000. – Vol. 34. – P. 1715–1720.
33. Сатрутдинов А.Д., Дедюхина Э.Г., Чистякова Т.И., Минкевич И.Г., Ерошин В.К., Эгли Т. Исследование бактериальной деградации ЭДТА // *Микробиология.* – 2003. – № 1. – С. 14–18.
34. Vainshtein M., Suzina N., Kudryashova E., Ariskina E. New magnet-sensitive structures in bacterial and archaeal cells // *Biol. Cell.* – 2002. – Vol. 94. – P. 29–35.
35. Witschel M., Nagel S., Egli T. Identification and characterization of two-enzyme system catalyzing oxidation of EDTA in the EDTA-degrading bacterial strain DSM 9103 // *J. Bacteriol.* – 1997. – Vol. 179. – P. 6937–6943.
36. Kluener T., Hempel D.C., Noertemann B. Metabolism of EDTA and its metal chelates by whole cells and cell-free extracts of strain BNC1 // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1998. – Vol. 49. – P. 194–201.
37. Payne J.W., Bolton H.J., Campbell J.A., Xun L. Purification and characterization of EDTA monooxygenase from the EDTA-degrading bacterium BNC1 // *J. Bacteriol.* – 1998. – Vol. 180. – P. 3823–3827.
38. Belly R.T., Lauff J.J., Goodhue C.T. Degradation of ethylenediaminetetraacetic acid by microbial populations from an aerated lagoon // *Appl. Microbiol.* – 1975. – Vol. 29. – P. 787–794.
39. Kaluza U., Klingelhoefner P., Taeger K. Microbial degradation of EDTA in an industrial wastewater treatment plant // *Water Res.* – 1998. – Vol. 32. – P. 2843–2845.
40. Gschwind N. Biologischer Abbau von EDTA in einem Modellabwasser // *Wasser Abwasser.* – 1992. – Bd. 133. – S. 546–549.
41. Van Ginkel C.G., Vandenbroucke K.L., Stroo C.A. Biological removal of EDTA in conventional activated-sludge plants operated under alkaline conditions // *Bioresource Technol.* – 1997. – Vol. 59. – P. 151–155.

## ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОТОПЛИВА В РОССИИ. СООБЩЕНИЕ 2: БИОЭТАНОЛ

Р.Г. ВАСИЛОВ\*

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

### Введение

В предыдущем номере журнала был опубликован обзор о биодизеле (Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова, 2007, Т. 3, № 1, с. 47–54). В настоящей статье тема биотоплива будет продолжена на материале биоэтанола.

Биоэтанол является одним из альтернативных видов моторного топлива из возобновляемого сырья. Пока этиловый спирт является неполной заменой бензину и используется чаще всего в виде 5–10%-ных добавок к углеводородам. В некоторых странах, таких как Бразилия, добавляют до 20% биоэтанола к моторному топливу. Правда, Бразилия идет впереди многих государств, развернув программу по биоэтанолю еще с 1975 г. и в настоящее время выпуская 80% собственных автомобилей, могущих работать на этиловом спирте в чистом виде.

Ради исторической справедливости следует отметить, что Генри Форд на рубеже XIX–XX веков создал автомобиль на спиртовом горючем, в том числе популярную модель Ford T, и ориентировался на перспективность данного направления, однако сухой закон и нефтяной бум в Техасе заставили сделать выбор в пользу бензина.

Главным источником сахара для выработки биоэтанола служит сырье из пшеницы, кукурузы, маиса, сорго, сахарного тростника, сахарной свеклы и т.д. Кроме того, могут использоваться отходы сельскохозяйственного производства и деревообрабатывающей промышленности (солома, трава, древесина, опилки и др.), твердые бытовые отходы. В Америке основным источником раститель-

ного сырья для биоэтанола являются сахарный тростник и кукуруза, а в Европе — сахарная свекла и пшеница.

Этанол представляет собой бесцветную жидкость, биodeградируемую, мало токсичную; продукты распада не загрязняют окружающую среду. Этанол имеет высокое октановое число. При смешивании с бензином (или газOLIном) оксигенирует топливную смесь, обеспечивая более полное сгорание и уменьшение выброса загрязнений. В США наиболее распространена марка E10, или «газохол» (10% биоэтанола + 90% бензинового горючего). Изменений в автомобиле при этом не требуется. Для марки E85 (85% спирта и 15% бензина) необходима гибкая модификация (автомобили «Flex» от англ. «flexible»), что было сделано начиная с 2004 года ведущими автомобильными компаниями (Дженерал моторс, Форд, Фольксваген, Фиат и др.). Машины типа «Flex» работают на газOLIне, спирту или любой смеси из них (предпочтительно до 85% этанола).

Надо отметить, что биоэтанол химически идентичен синтетическому этиловому спирту (дифференцировка возможна только с помощью радиоуглеродного анализа), полученному из нефти — путем гидратации этилена с серной кислотой в качестве катализатора. Синтетического спирта в мире производится около 5% от общего количества этанола (ежегодно 2 млн. тонн). Этот аспект существенен, поскольку общая тенденция идет к перефилированию спиртовых заводов, задействованных в цепочку нефтеперерабатывающей промышленности, в биоэтанольные предприятия.

Очень важно то, что во всех государствах, где реализуются программы по биотопливу, направление по биоэтанолю, как правило, комплементарно (а не альтернативно!) по отношению к таковому биодизеля. Это происходит даже в странах, где отдается предпочтение одному из видов биотоплива. Но также встречается, когда оба направления развиваются паритетно, как например, во Франции.

\* Автор для переписки:

© 2007 г. Василов Раиф Гаянович

профессор, президент Общества биотехнологов России

им. Ю.А. Овчинникова

E-mail: obr@biorosinfo.ru



## Решение проблемы биоэтанола за рубежом

Нужно иметь перед собой глобальную макрокартину мирового производства биоэтанола и, прежде всего, его лидеров. Вот как выглядит первая пятерка производителей (табл. 1).

**Таблица 1**  
**Первые пять мировых производителей биоэтанола**  
(млрд. л)

Страна	2004 г.	2005 г.	2006 г.
Бразилия	15	16	17
США	13	16	18
Китай	4	4	4
Индия	2	2	2
Франция	1	1	1

Источник: Renewable Fuels Association — [www.ethanolrfa.org](http://www.ethanolrfa.org)

Общий объем всего произведенного биоэтанола в мире в 2003 г. составлял 22,0 млрд. л, в 2004 году — 41, в 2006 г. — около 50, а к 2010 году ожидается выход на 80 млрд. л., что будет соответствовать 4%-ному замещению минерального топлива в целом.

### **Бразилия**

Бразилия относится к числу мировых лидеров по производству биоэтанола. И по объемам, и по длительности разработки данного направления она занимает ведущие позиции, поэтому ее опыт заслуживает самого тщательного анализа. Производство биоэтанола основано на ферментации биомассы из сахарного тростника (главным образом) и сахарной свеклы. Страна производит ежегодно около 15–18 млрд. литров, 3,5 млрд. л из которых экспортируется (из них 2 млрд. — в США). По данным 2003 г., в бразильской программе по биоэтанолю было занято 700000 работников, а экономия по импорту нефтепродуктов за 1975–2002 гг. составила 50 млрд. долларов. Планы Бразилии: к 2010 году довести общий объем ежегодного производства биоэтанола до 26 млрд. литров.

Эти успехи зиждутся на прочных государственных гарантиях по 3 пунктам: 1) гарантированные закупки государственной нефтяной компанией «Petrobras», 2) ссуды (заем) под низкие проценты для агропромышленных этаноловых фирм, 3) фиксированные цены на газолин и этанол: стоимость гидратированного спирта (93% спирт + 7% вода) составляет 59% от установленной государством цены газаolina в бензоколонке). Кроме

того, с 1980 г. предусмотрены меры за счет налоговых льгот стимулировать покупки автомобилей, работающих на чистом спирте. Основные импортеры бразильского биоэтанола: Япония, США, Швеция. Рассматривается перспектива значительного расширения экспорта бразильского биоэтанола в Канаду, где импортная пошлина 4,92 канадских цента за литр.

### **США**

Несмотря на продолжающиеся дискуссии между специалистами и в обществе о преимуществах и недостатках биоэтанола в США в последнее время были запущены довольно значительные мощности по производству биоэтанола, чтобы достичь в ближайшие годы уровня 11,8 млрд. гал = 44,7 млрд. л (1 амер. гал = 3,785 л, 1 англ. гал = 4,546 л). В 2004 г. было произведено 13 млрд. литров биоэтанола, в 2005 г. — 16, в 2006 г. — 18. К концу 2007 года намечается выпуск 11,2 млрд. гал. Работают 113 спиртовых заводов, в процессе строительства находятся еще 78. Основным сырьем является кукуруза. В отрасли заняты 154000 человек (по данным 2005 г.) с общим семейным доходом 5,7 млрд. долларов и 3,5 млрд. долларов налоговых поступлений разных уровней (федеральных, муниципальных, штатов). В США сейчас в большинстве автомобилей используется смесь с добавкой этанола не более 10%. Хотя с появлением автомобилей типа «Flex» к середине 2006 г. в США насчитывалось около 6 млн. таких машин, совместимых с заправкой смеси E85. Следует отметить, что вступление в силу 5 мая 2006 г. запрета на использование в США метилтрибутиловых присадок в автомобильном топливе повысило потребность в биоэтаноле. Этому способствует и то, что США в 2006 г. стали инициаторами межгосударственного соглашения о развитии производства альтернативных источников топлива с Бразилией. В результате подписан договор о совместном производстве биоэтанола (к 2010 году двусторонний товарооборот достигнет 35 млрд. долларов). Надо постоянно иметь в виду, что США являются и крупнейшим мировым потребителем углеводородного моторного топлива — 140 млрд. гал в год.

### **Евросоюз**

В ЕС проблема биотоплива вообще и биоэтанола, в частности, лежит в русле главной стратегии европейцев, связанной с последними экологическими инициативами А. Меркель, — сохранения экологии и борьбы с глобальным потеплением планеты, что в значительной степени базируется на отказе от нефти и газа и переходе на новые возобновляемые виды топлива, в том числе и моторное. В этом контексте, как уже указывалось нами

в предыдущей статье, основное внимание уделяется биодизелю. Для этого есть объективные основания — в Европе меньше сахаросодержащего сырья, лесов и т.д. Тем не менее имеется определенный сектор экономики, связанный с производством биоэтанола, не говоря о том, что уже сформировался довольно устойчивый европейский рынок потребления биоэтанола, включая соответствующий автомобильный парк, заправочные станции, сеть бизнес-структур, законодательную проработку и т.д.

В настоящее время в Европе разрешена добавка до 5 об % биоэтанола к стандартному бензину DIN EN 228, а также применение бутиловой присадки (ЕТВЕ — ethyl tertiary butyl ether) до 15%. ЕТВЕ, повышающий октановое число, получают из этанола.

В 5,75% добавках к моторному топливу, установленных ЕС как ориентир к 2010 г., есть доля и биоэтанола. По-видимому, сохранится определенная пропорция для биоэтанола и в будущем.

Общие сведения о производстве биоэтанола в Европе представлены в таблице 2.

**Таблица 2**  
**Производство биоэтанола в Европе**  
**в 2005–2006 гг.**

Страна	Объем производства (млн. л)	
	2005	2006
Германия	165	431
Испания	303	402
Франция	144	250
Швеция	153	140
Италия	8	128
Польша	64	120
Венгрия	35	34
Литва	8	18
Нидерланды	8	15
Чехия	0	15
Латвия	12	12
Финляндия	13	0
Всего	913	1565

Источник: eBio 2007

Таким образом, в настоящее время из 25 стран ЕС производителями биоэтанола являются 11 членов, которые выпустили в 2005 г. 913 млн. л, в 2006 г. — 1565.

В целом ЕС значительно уступает странам Северной и Южной Америки по объемам производства биоэтанола — цифра 1,565 млрд. л в год несравнима с американскими десятками миллиардов литров. Экспертами называется примерно такая же цифра по ежегодному потреблению Европой моторного этилового спирта — 1,7 млрд. л. Указывается, что около 230 млн. л в год импортируется преимущественно из Бразилии. Основными импортерами биоэтанола являются Великобритания и Финляндия, пока не выпускающие собственный биоэтанол, и Швеция, имеющая у себя его производства.

Следует заметить, что несмотря на прогресс в области производства биоэтанола его доля в моторном топливе еще крайне мала. Так, в 2004 г. Европе его было произведено 2,4 млн. т (0,5 — биоэтанола, 1,9 — биодизеля), что составляет 0,8% от общего потребления горючего.

Интересно сравнить соотношение производства биоэтанола и биодизеля в европейских странах по данным 2002–2004 гг. (табл. 3).

**Таблица 3**  
**Биотопливо в Европе (2002–2004 гг.)**

Страна	Биодизель (млн. гал)			Биоэтанол (млн. гал)		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004
Австрия	8	10	18	0	0	0
Великобритания	1	3	3	0	0	0
Германия	141	224	324	0	0	7
Дания	3	13	22	0	0	0
Испания	0	2	4	59	53	85
Италия	66	85	100	0	0	0
Польша	0	0	0	22	20	12
Франция	114	112	109	30	27	34
Чехия	22	22	19	2	0	0
Швеция	0	0	0	17	17	17
Всего	355	471	599	130	117	155

Источник: EurObserver, N 167, May-June 2005 (с изменениями)

Здесь становится ясным, что только в небольшом числе стран выдерживается линия на параллельное развитие обоих видов топлива (Франция, Испания). Кроме того, в исторической ретроспективе видно, что 3–5 лет

назад Германия и Италия практически не производили биоэтанол, а ныне вошли в число ведущих производителей.

### **Франция**

Франция стоит на 1-м месте в Европе по производству этилового спирта. В 2005 г. она выпустила 9,1 млн. гектолитров, что составляет 33%, Испания — 14%, Германия — 13%.

Правда, Испания в 2005 г. занимала 1-е место по производству биоэтанола, уступив его в 2006 г. Германии. Во Франции же из 9,1 млн. гектолитров 7,632 были получены из сельскохозяйственного сырья: 81% — сахарная свекла, 19% — зерно. Франция приняла все целевые установки ЕС по биотопливу и намеревается выйти на 5,75% биоэтанола в 2008 г., на 7% — в 2010 г., на 10% — в 2015 г. Расчеты показывают, что для достижения уровня 5,75% требуется выделение 280 тыс. га под зерновые культуры (3% общей пахотной площади), 55 тыс. га — под сахарную свеклу (15% общей площади). В стране функционируют 5 заводов по производству биоэтанола и строятся 6 новых (общая производственная мощность последних составляет 1,105 млн. тонн в год).

### **Испания**

Биомасса обеспечивает 3,2% от общей потребляемой энергии в Испании, которая в 2006 г. составила эквивалент в 165 млн. т нефти. На долю биомассы приходится 50% энергии из возобновляемого сырья. Кроме получения энергии из биомассы, в этой стране активно и в широких масштабах используется энергия ветра и солнца.

Испания разрабатывает проблему биотоплива по направлениям биодизеля и биоэтанола. В отношении биоэтанола цифры следующие: 2002 г. — 268 млн. л, 2003 г. — 240, 2004 г. — 386, 2005 г. — 303, 2006 — 402 (цифры за 2002–2004 гг. пересчитаны с английских галлонов).

В последние годы Испания является в ЕС основным потребителем биоэтанола, уступая только Германии и Швеции. В 2006 г. в ней биоэтанол составил 3% от общего количества бензинового горючего.

В Испании существует законодательство, благоприятствующее развитию направления, связанного с получением энергии из возобновляемых источников. Так, в 2005 г. принят план по возобновляемой энергии на 2005–2010 гг. Даны административные распоряжения, способствующие внедрению биотоплива.

### **Германия**

Сырьевым источником для биоэтанола в Германии являются зерно и сахарная свекла. В настоящее время

действуют 3 завода общей производственной мощностью 600 тыс. тонн биоэтанола в год. В процессе строительства находятся 6 заводов общей мощностью 300–400 тыс. тонн в год (из них в Росток — на 200 тыс. тонн). В 2005 г. было произведено 165 млн. л биоэтанола, в 2006 г. — 431 млн. л. Германский рынок биоэтанола в 2005 г. составил 225 тыс. тонн, в 2010 году намечается выход на 1,1 млн. тонн. Предельный прогнозируемый уровень производства биоэтанола — 5–7 млн. тонн в год. Выше не позволит конкуренция с пищевым сектором. 5%-ная смесь этанола уже получила достаточное распространение. Проявляется интерес и к E10, и к E85. Производится и широко используется бутиловая присадка ETBE.

### **Швеция**

Швеция в последние годы занимает 3–4-е места в Европе по производству биоэтанола (близки к ней по объемам производства Италия и Польша). В 2004–2006 гг. Швеция ежегодно выпускала около 120–150 млн. л этого биотоплива. При этом она импортирует довольно большое количество биоэтанола из Бразилии и Испании. В каждом пятом автомобиле в Стокгольме, по крайней мере, частично используется альтернативное топливо, главным образом этиловый спирт. Биоэтанол E85 составляет 2,5% от общего объема шведского моторного топлива — 800 заправочных станций (самый высокий уровень в Европе). В 2008 г. намечено в 25% заправочных станций иметь топливо из возобновляемого сырья.

Швеция известна как страна, в которой производство биоэтанола пользуется государственной поддержкой. Так, по закону цена на биоэтанол должна быть на 25% ниже таковой бензина. Налоги также меньше на 20% для биотоплива. Для автомобилей, работающих на биоэтаноле, предусмотрена свободная парковка во многих шведских городах. Свыше 80% автомобилей Saab, проданных в Швеции в 2006 г., были исполнены во «Flex»-варианте. В 2008 году в общественном транспорте будут автомобили-«гибриды» — электромобили, одновременно работающие на биоэтаноле. Большие надежды в будущем в стране возлагают на следующий технологический этап в производстве биоэтанола с применением лигноцеллюлозного материала.

### **Китай**

Китай принято включать в тройку мировых лидеров по производству биоэтанола после США и Бразилии. Начиная с 2000 г. в стране реализуется программа по биоэтанолю, согласно которой данная отрасль развивается в 5 городах центральных и северо-восточных провинций

(включая провинции Хенань, Хэйлунцзян с г. Харбин и др.). Здесь также актуальна проблема создания альтернативного топлива в связи с экспоненциальным ростом потребления нефтепродуктов. В Китае биоэтанол производят из пшеницы, риса, маниоки (кассавы), сахарного сорго и др. В 2005 году было произведено более 1,0 млн. тонн биоэтанола. Сейчас строятся мощные заводы. Государственный план — выход на 10%-ное замещение бензина биоэтанолом к 2020 году. Для этого потребуется создать производственные мощности 22,8 млн. тонн биоэтанола в год. Пока Китай таковыми не располагает — можно достичь лишь 11,0 млн. тонн, то есть около 50% потребности.

### **Япония**

Япония занимает уникальную позицию в отношении биоэтанола. Она пока является его импортером, в основном из Бразилии. Биоэтанол применяется в виде марки Е3. Кроме того, используется бутиловая присадка ЕТВЕ. У государства имеются планы собственного производства 500 млн. л в год Е3 и ЕТВЕ, что эквивалентно 0,58% годовой потребности страны в бензине и дизельном топливе. В стратегической перспективе объявлено о выходе к 2030 г. на рубеж 10% биотоплива. При этом делается акцент на развитие производства целлюлозного этанола.

### **Индия**

Индия представляет собой страну с прогрессирующим биотехнологическим потенциалом. Естественно, в ней уделяется внимание и проблеме альтернативного топлива. Что касается биоэтанола, то стандарт Е5 уже введен. Выход на 10%-ную смесь — это в перспективе. Объемы производства биоэтанола достаточно велики и составляют около 2 млрд. л в год.

### **Австралия**

В Австралии биоэтанол производится 3 компаниями в восточной части страны. Общая производственная мощность этих предприятий — около 150 млн. л биоэтанола в год. Разрешено применять 10% смесь, то есть марку Е10. Федеральное правительство поддерживает это направление, поставив задачу достижения к 2010 г. уровня ежегодного производства биотоплива (включая биоэтанол, биодизель и др.) 350 млн. л. Предусмотрены соответствующие преференции и налоговые льготы, в том числе благоприятные тарифы на импортируемый биоэтанол до 1 июля 2011 года.

### **Индонезия**

В Индонезии оказывается государственная поддержка производству биотоплива, в том числе благодаря указу Президента 2006 г. Сырьем для получения биоэтанола служат сахарный тростник, корни маниоки,

сладкий картофель и др. К 2010 г. поставлена задача замены на газохол ВЕ-10 20% из 15 млрд. л бензина, для чего потребуется выделение 100 тыс. га под плантации сладкого картофеля с урожайностью 30 т/га. Для выхода на уровень 10% в 2010 году необходима выработка 200 млн. л биоэтанола. В дальнейшем имеются планы к 2020 г. году получать 1,1 млрд. л биоэтанола.

## **СНГ**

### **Казахстан**

В Казахстане имеется четкая программа развития отрасли, связанной с внедрением биоэтанола, которая поддерживается главой государства Н. Назарбаевым. В последнее время в Северо-Казахстанской области (г. Тайынша) вступил в строй первый в СНГ комплекс по производству биоэтанола мощностью 57 тыс. тонн в год. Благодаря совместным усилиям казахстанской компании ТОО «Баско» и российской ГК «Титан» завод был построен за 13 мес. Кроме того, в Жамбыльской области заканчивается строительство другого завода проектной мощностью 30 тыс. тонн биоэтанола в год. Строятся еще два завода в Таразе и в Уральске.

### **Украина**

Украина снизила акцизы на биоэтанол вдвое: с 1 января 2007 г. вступил в силу закон, регламентирующий снижение ставки акцизного сбора на биоэтанол до 30 евро за тонну с ранее действовавшей ставки в 60 евро. Законом также устанавливается нулевая ставка акцизного сбора на биоэтанол, производимый на украинских спиртовых заводах, который будет использоваться для производства бензинов. Кроме того, для еще большей инвестиционной привлекательности Правительство Украины снижает таможенные пошлины на ввоз оборудования и комплектующих. 8 июня 2007 г. Верховная Рада приняла закон о развитии производства и использовании биотоплива, который обязывает власти крупных городов (с населением более 500 тыс.) перевести до 2010 г. транспортные средства с двигателями внутреннего сгорания на использование биотоплива. Планирует наращивание производства биоэтанола госконцерн «Укрспирт» (в его ведении находятся 15 заводов, выпускающих биоэтанол). В течение 2 лет в Винницкой области два спиртовых завода будут перепрофилированы на производство биоэтанола. ООО «Биодизель Бессарабии» в 2007 г. открывает в Одесской области мини-завод по производству биоэтанола мощностью 7 тыс. тонн в год (с удвоением ее через год). Есть планы строительства в стране двух заводов общей мощностью 260 тыс. тонн биоэтанола в год. Министерством транспорта и связи утверждена генеральная схема развития Херсонского морского тор-



гового порта, предусматривающая строительство в нем первого в Украине терминала по накоплению, хранению и отгрузке биоэтанола. В целом на Украине намечено строительство 23 новых заводов по производству биоэтанола до 2010 г., правда, с привлечением средств инвесторов. Как результат — в Украине налажен выпуск этанольного топлива БИО-100, которое уже появилось на АЗС. В его состав входят: этиловый спирт (более 60%), газовый конденсат и метил-трет-бутиловый эфир (МТБЭ).

### Технологические аспекты

Общая технологическая схема производства биоэтанола сводится к следующему. Сначала осуществляется предварительная обработка сырья, далее проводится процедура превращения крахмала в сахар («осахаривание») с использованием фермента, после чего следуют дрожжевое спиртовое брожение (ферментация), дистилляция, дегидратация (до 99,5% чистого этилового спирта — «абсолютированный технический спирт 99,5%», или «fuel grade ethanol» [FGE]), и денатурация (необязательная).

Последовательные этапы получения биоэтанола выглядят следующим образом:

сырье ⇒ предварительная обработка ⇒  
«осахаривание» ⇒ ферментация ⇒  
дистилляция ⇒ дегидратация ⇒  
абсолютный этиловый спирт 99,5%

Зерно (пшеница, кукуруза) как один из главных источников биоэтанола (исключая сахарный тростник, сахарную свеклу) можно превращать в этиловый спирт с помощью технологий сухого или влажного помола.

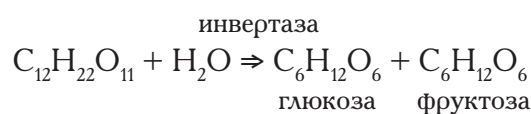
При осуществлении процесса влажного помола зерно погружается в теплую воду, что помогает разрушать белки, высвобождать крахмал, а также размягчать зерно для помола. Зерно затем перемалывают, чтобы получить зародыши, волокна и крахмал. Зародыши используют для других целей, а крахмальная фракция подвергается центрифугированию и превращается в сахар. Далее этанол получают посредством процесса брожения (ферментации) и перегонки (дистилляции). Обычно технологию влажного помола используют на заводах с производственной мощностью несколько сотен миллионов галлонов биоэтанола в год.

Процесс сухого помола включает в себя очистку и раздробление зерна на мелкие частицы с помощью ударно-жерновых устройств. При этом получается

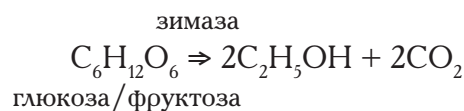
мука грубого помола, содержащая зародыши, крахмал и волокна. Для производства сахара смесь гидролизуют с помощью ферментов или разбавленной кислоты. Смесь затем нагревают и добавляют дрожжи для проведения спиртового брожения. Эта технология, как правило, используется на заводах, производящих ежегодно менее 50 млн. гал биоэтанола. Выход готового продукта — из 1 т пшеницы 0,624 т спирта, а из 1 т кукурузы — 410 л.

*Процесс ферментации (сбраживания) сахара*

К раствору сахара добавляют дрожжи и повышают температуру до 25–30 °С. Фермент дрожжей инвертазы превращает сахарозу в глюкозу и фруктозу. Происходит реакция:



Далее глюкоза и фруктоза под действием зимазы (совокупность дрожжевых ферментов спиртового брожения) превращается в этиловый спирт и углекислый газ.



Весь процесс брожения происходит примерно за 3 суток.

*Перегонка (дистилляция)*

Биоэтанол, полученный в процессе брожения, содержит значительное количество воды. Это — «брага» с содержанием 10% алкоголя. Избыток воды удаляется фракционной перегонкой: точка кипения этилового спирта 78,3 °С и поэтому он возгоняется раньше воды, после чего конденсируется.

На выходе из брагоректификационного аппарата получается спирт крепостью не более 96,0–96,2%. В связи с тем, что этанол образует с водой азеотроп, получить в чистом виде этиловый спирт невозможно. По техническим требованиям для приготовления смесей с повышенным (более 10%) содержанием биоэтанола в моторном топливе нужно использовать абсолютный, то есть полностью обезвоженный спирт.

Существуют несколько методов промышленной полной дегидратации (абсолютирования) этанола: азеотропная ректификация с разделяющимися агентами, вакуумная ректификация, мембранная очистка. Обезвоживание окисью кальция в широких масштабах промышленности не применяется.



Наиболее часто используется метод азеотропной дистилляции с бензолом или циклогексаном. При этом достигается крепость биоэтанола не менее 99,2. При абсолютировании утрачивается примерно 1% от исходного количества спирта-сырца. В производстве биоэтанола используется метод укороченной дистилляции в двух ректификационных колоннах вместо пяти. Поэтому в конечном обезвоженном продукте содержится метанол и сивушные масла, то есть после процедуры абсолютирования биоэтанол становится непитьевым, техническим продуктом.

В случае непроведения абсолютизации обязательно осуществляется добавление к биоэтанолу денатурирующих веществ (бензина или других ингредиентов). Можно по показаниям денатурировать и абсолютный спирт.

Общая схема получения биоэтанола представлена на рисунке 1. На ней, кроме основной технологической цепочки выработки биоэтанола, изображены дополнительные линии получения побочных продуктов (глютена, барды).

Имеется технологическая цепь, предназначенная для производства биоэтанола из биомассы (отходы сельскохозяйственного производства, солома, стебли трав и т.д.). Такая биомасса содержит сложную смесь углеводных полимеров из клеточных стенок растений — целлюлозы, гемицеллюлозы, лигнина. Для экстракции сахаров из биомассы применяются 3 подхода: гидролиз концентрированной кислотой, гидролиз разбавленной кислотой и ферментный гидролиз.

При гидролизе концентрированной кислотой используют 70–77%  $H_2SO_4$ , которую добавляют к биомассе, высушенной до 10% влажности. Соотношение — 1,25 : 1 (кислота — биомасса). Нагрев при температуре 50 °С. Затем добавляют воду для снижения крепости кислоты до 20–30% и нагревают смесь до 100 °С в течение 1 ч. Образовавшийся гель прессуют для высвобождения сахаров, а затем разделяют на chromatографической колонке кислоту и сахара.

Гидролиз разбавленной кислотой представляет собой наиболее старый, простой и эффективный метод

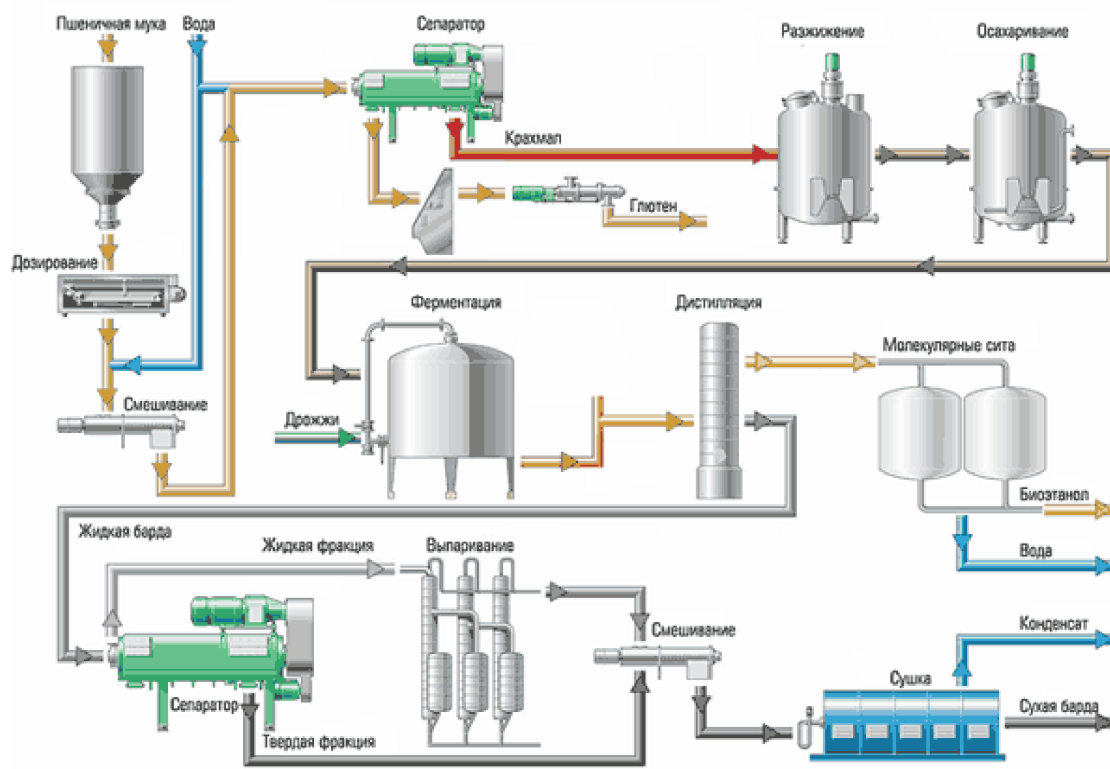


Рис. 1. Блок-схема производства биоэтанола

Источник: <http://www.expert.ru/schemes/expert/2007/05/document230051/>



Рис. 2. Общий вид завода по выпуску биоэтанола

получения биоэтанола из биомассы. На первом этапе применяется 0,7% раствор серной кислоты при 190 °С для гидролиза гемицеллюлозы в биомассе. На втором этапе идет обработка наиболее устойчивой целлюлозной фракции, что достигается использованием 0,4% раствора  $H_2SO_4$  при 215 °С. Жидкий гидролизат нейтрализуется и поступает в дальнейший процесс.

При ферментативном гидролизе применяют прямое воздействие ферментов на биомассу. Однако этот процесс очень дорогой и пока находится в стадии разработки.

Есть мнение, что целлюлозный этанол будет следующим этапом зеленой биотехнологии. США планируют к 2030 г. выйти на рубеж 60 млрд. гал спирта, полученного таким способом.

В натуральном виде современный завод по выпуску биоэтанола представлен на рисунке 2.

### **Преимущества, недостатки, экономика**

#### *Преимущества*

К числу бесспорных положительных свойств биоэтанола, помимо уже указанной возобновляемости, относятся, прежде всего, экологические показатели. Более низкий, по сравнению с чистым бензином, вклад в парниковый эффект, поскольку выделяемый при сжигании углекислый газ имеет первичное атмосферное

происхождение. Использованный 5%-ный биоэтанол дает снижение выделения углерода на 3,5%, а Е85 — на 50%. При наличии в биотопливе до 15% этилового спирта происходит уменьшение в выхлопных газах СО на 25%, углеводородов и оксидов азота — на 5–15%, так как биоэтанол дожигает вредные выбросы бензина. Биоэтанол является биodeградируемым продуктом и менее токсичен по сравнению с минеральным топливом. Биоэтанол практически не содержит серы. Добавление этанола в бензин повышает октановое число, что избавляет от необходимости добавлять ТЭС или бутиловую присадку. Наконец, биоэтанол увеличивает детонационную стойкость топлива, поскольку температура самовоспламенения бензина 290 °С, а в смеси со спиртом — 425 °С. Кроме того, он выполняет функцию антифриза.

#### *Недостатки:*

- биоэтанол по сравнению с нефтяными топливами имеет меньшую теплоту сгорания (на 30%), то есть выделяется меньше энергии, падает мощность, а расход топлива увеличивается;
- водосодержащий биоэтанол вызывает коррозию металлов;
- наличие воды и колебаний температуры создает возможность для расслоения топливной смеси;
- опасность разгерметизации труб и емкостей с биотопливом и увеличения процентного содержания воды.

Часть специалистов, особенно из нефтяного лобби, пытается расширить перечень отрицательных качеств биоэтанола за счет развенчивания его достоинств, в особенности по части экологии и автомобильной техники. Тем не менее даже оппоненты признают уменьшение токсических продуктов в выхлопных газах при использовании биоэтанола, то есть более полное сгорание.

Возникшая в глобальном масштабе дискуссия, помимо разговоров о большей экологической «вредности» биоэтанола по сравнению с нефтепродуктами и предпочтении энергии ветра, солнца и электричества вместо зеленой биотехнологии, затрагивает и такую значимую проблему, как энергетический баланс. Был выдвинут тезис, что производство биоэтанола требует больше энергозатрат, чем будет выделено при использовании топлива: приводились данные о том, что его энергетическая ценность на 30% меньше, чем энергия, потребленная при его производстве. Однако специалисты аргументированно опровергли такое мнение. В докладе Министерства сельского хозяйства США 2006 г. был обоснован положительный, а не отрицательный, энергобаланс биоэтанола: цифра — 1,24.

#### *Экономические вопросы*

Здесь надо различать себестоимость и розничную цену. Дело в том, что во многих странах стимулируется спрос на биоэтанол. Поэтому на заправке он примерно на 10% дешевле бензина. Что касается себестоимости биоэтанола, то в Бразилии — 20–25 центов за 1 л, в США — 30–35 центов, в Китае — 40 центов, в ЕС — 50 центов. В России прогнозируемая себестоимость — около 10 руб. за литр. Для сравнения — себестоимость ближневосточного бензина в Роттердаме — 50 центов (без налогов и акцизов). Правда, рыночная цена биотоплива пока в 2–2,5 раза выше нефтяных продуктов, и поэтому вводится государственный протекционизм.

Безусловно, на выгодность производства биоэтанола и ценовую политику влияют цены на основное сырье — пшеницу. Однако общая тенденция рынка идет к разворачиванию этого бизнеса, тем более учитывая повсеместную государственную поддержку. Хотя некоторые считают, что в условиях подорожания пшеницы производить биоэтанол нерентабельно (даже рискованно).

### **Биоэтанол в России: состояние и перспективы**

В России проблема развития производства биоэтанола сводится к двум аспектам: экспорт и внутренний рынок. Его экспорт, причем безакцизный, разрешен на Запад и в Японию. Внутренний рынок пока имеет

проблемы в связи с акцизами. Необходимо совершенствование законодательства в данной области. Для этого, прежде всего, требуется коррекция закона «Об обороте этилового спирта», в который нужно ввести понятие о топливном этаноле, и таким образом вывести биоэтанол за акцизы. Акцизы на спирт и спиртосодержащую продукцию увеличивают стоимость биоэтанола в несколько раз и делают его производство нерентабельным. Известно, что акциз на спирт в РФ составляет 23 руб. за литр, на спиртосодержащую продукцию — 162 руб. за литр.

В РФ в 2004 году принят ГОСТ Р 52201-2004 на спиртосодержащие моторные топлива «бензолы» с содержанием этанола 5–10%, однако к широкомасштабному развитию моторного топлива это не привело (ГОСТ позволяет это делать, но не обязывает). Имеющиеся здесь национальные этические проблемы (возможное пищевое использование биоэтанола или ценовые манипуляции) могут быть постепенно решены, как и во всех цивилизованных странах. У критиков биоэтанола имеются аргументы и о суровом климате России, где водная добавка может отрицательно влиять при низких температурах, и о трудностях с герметизацией систем хранения и транспортировки и др.

Тем не менее производство биоэтанола в Российской Федерации имеет тенденцию к наращиванию, пока с ориентацией на гарантированный экспорт. Интернет полон сообщений о строящихся новых объектах, предназначенных для производства биоэтанола. Примеров здесь уже много. Чаще всего упоминают и в наших, и в зарубежных источниках о строящемся заводе в Волгограде (начало строительства — весна 2007 г., окончание — через 2 года) с производственной мощностью 900000 тонн биоэтанола и 905000 тонн сухой барды в год. Стоимость проекта — 200–250 млн. долларов. Подписано соглашение между компанией «Випойл», международной организацией PricewaterhouseCoopers и Волгоградской областью. Руководство области при этом планирует наращивать производство зерновых культур — до 6,0–6,5 млн. тонн (по сравнению с нынешними 4,0 млн. тонн).

Алтайское ОАО «Пава» намечает строительство завода по глубокой переработке продовольственной пшеницы и производства топливного биоэтанола и сухой пшеничной клейковины.

В Томске ОАО «Экстрасиб» осенью 2007 г. планирует репрофилирование своего спиртопроизводящего предприятия (мощностью 610000 дал в год) на промышленный выпуск биоэтанола.



ГК «Титан» имеет планы развернуть строительство заводов по производству биоэтанола в Омской области и Республике Адыгея (в последней оно намечается на март 2008 г.). Эта же нефтехимическая группа собирается в 2009 г. запустить завод мощностью 150 тыс. тонн в год в станции Павловская Краснодарского края, причем на арендованных землях (100 га) она будет выращивать свое зерновое сырье для производства — кукурузу и пшеницу.

В Республике Татарстан рассматривается проект строительства завода, производящего 200–300 тыс. тонн биоэтанола в год. Его стоимость — 6 млрд. рублей.

В Ростовской области планируют построить через 2 года завод по выпуску биоэтанола в Азовском районе.

Проявляется инициатива в Тамбовской области (ОАО «Тамбовский завод «Комсомолец»).

Есть намерения развивать данное направление и в Липецкой области: подписано соглашение между губернатором и президентом группы компаний «Виноградов» о начале производства альтернативного моторного топлива — биоэтанола.

Имеет перспективные планы Самарская область — к 2009–2010 гг. Сырье здесь есть (кукуруза и рожь), имеются и фирмы («Аликор»), готовые к работам по производству биоэтанола.

Однако в обсуждаемой проблеме есть и иной ракурс. Оказывается, можно и не строить новые заводы, а загрузить уже работающие 170 спиртовых заводов, но использующие мощности лишь на 41%, сырьем для производства биоэтанола. Требуется только решение в общем плане.

### Заключение

Проблема производства биоэтанола, несмотря на разные взгляды на нее представителей общества и бизнеса, имеет большое значение для современной жизни. То, что такие ведущие государства, как США, Бразилия, Китай, находятся в лидерах по производству биоэтанола, свидетельствует о перспективности данного направления. Позиция России пока неопределенна, однако имеется консенсус по вопросу о целесообразности на нынешнем этапе разворачивания собственных производств с целью поставки биоэтанола на экспорт. Состоявшийся в апреле 2007 г. в Москве 2-й Международный конгресс по топливному этанолу также констатировал сходную позицию, хотя уделил много внимания необходимости государственной поддержки

развития этой отрасли и, в первую очередь, законодательного и нормативно-правового обеспечения, равно как и разработке оптимальных способов использования биоэтанола в условиях России. Еще ранее было проведено обсуждение этой проблемы в Государственной Думе ФС РФ. Бесспорно, важна недавняя инициатива Совета Федерации ФС РФ, который при поддержке Минсельхоза России подготовил законопроект о развитии биоэнергетики в РФ, в котором предлагается снизить акцизы на биоэтанол. Хотя акцизы — это существенная, но не снимающая все трудности проблема: есть еще противодействие экономических министерств и нефтяных компаний.

*Автор выражает благодарность президенту Российской биотопливной ассоциации А.Р. Аблаеву за ценные советы и консультации.*

### Литература

1. Баранник В.П., Емельянов В.Е., Макаров В.В. и др. Этиловый спирт в моторном топливе / Под ред. В.В. Макарова. — М.: ООО «РАУ-Университет», 2005. — 184 с.
2. Василов Р.Г. Перспективы развития производства биотоплива в России. Сообщение 1 // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2007. — Т. 3. — № 1. — С. 47–54.
3. Пантелеев Д.Н. Выбор технологии абсолютирования спирта — одна из проблем Кировского биохимзавода — потенциального производителя топливного этанола // Бизнес практик. — Спецвыпуск, июнь 2007. — С. 18–19.
4. Шпак В.С., Шаповалов О.И., Габитов Д.М. и др. Этанольные топлива в России // Химия и бизнес. — 2004. — № 3.
5. *Agriculture as a producer and consumer of energy* / Outlaw J.L., Collins K.J., Duffield J.A., (eds.). — CAB International, 2005.
6. Ballesteros M. et al. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SSF) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 // *Process Biochemistry*. — 2004. — Vol. 39. — P. 1843–1848.
7. *Bioethanol in India: recent past and emerging future* / *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. — Springer: Berlin, Heidelberg. — 2003. — Vol. 85. — P. 1–27.
8. Brown R.C. *Biorenewable resources: new products from agriculture*. — Ames, Iowa: Iowa State Press, 2003. — 240 p.
9. Doxon L.E. *The alcohol fuel handbook*. — Infinity Pub, 2001. — 127 p.

10. *Ecco C. van Ierland, Oude Lansink A.G.* Economics of sustainable energy in agriculture (economy & environment). – 2002.
11. *Goldenburg J. et al.* Ethanol for a sustainable energy future // *Science*. – 2007. – Vol. 315. – P. 808–810.
12. *Kim S., Dale B.E.* Environmental aspects of ethanol derived from no-tilled corn grain: nonrenewable energy consumption and greenhouse gas emissions // *Biomass and Bioenergy*. – 2005. – Vol. 28. – P. 475–489.
13. *Laureano-Perez L., Teymouri F., Alizadeh H. et al.* Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass // *Appl. Biochemistry and Biotechnology*. – 2005. – Vol. 121. – P. 1081–1100.
14. *Mosier N., Wyman C., Dale B. et al.* Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass // *Bioresource Technology*. – 2005. – Vol. 96. – P. 673–686.
15. *Singh A. a. Ward O.* Bioethanol technology: developments and perspectives // *Advances in Appl. Microbiology*. – 2002. – Vol. 51. – P. 53–80.
16. *Techno-economic assessment of bioenergy in India*. – 2006.
17. *Wyman Ch. E. (ed.)*. Handbook on bioethanol: production and utilization (applied energy technology series). – CRS, 1996. – 442 p.

## Интернет-источники:

[http://en.wikipedia.org/wiki/Ethanol\\_fuel](http://en.wikipedia.org/wiki/Ethanol_fuel)  
<http://www.renewableenergyaccess.com/>  
[http://europa.eu.int/comm/energy/res/index\\_en.htm](http://europa.eu.int/comm/energy/res/index_en.htm)  
<http://www.bioethanol.ru>  
[http://ec.europa.eu/environment/co2/co2\\_home.htm](http://ec.europa.eu/environment/co2/co2_home.htm)  
<http://www.ethanol.org/usingethanol.html>  
[www.eBio.org](http://www.eBio.org)  
[www.german-renewable-energy.com/](http://www.german-renewable-energy.com/)



## К 100-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ АЛЕКСАНДЕРА ТОДДА, ВЫДАЮЩЕГОСЯ ХИМИКА XX СТОЛЕТИЯ, ОДНОГО ИЗ СОЗДАТЕЛЕЙ ФУНДАМЕНТА СОВРЕМЕННОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

В.С. ВОРОБЬЕВ\*, О.В. ВОРОБЬЕВА

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



В истории науки существует традиция сверхпризнания ученого за его выдающиеся заслуги. Известно почитание Ньютона в Великобритании, Гельмгольца — в Германии, Ивана Петровича Павлова — в России. Больше того, англичане и другие нации даже ввели обычай посвящения в рыцари или пэры своих знаменитостей. Среди них есть имена физика М. Фарадея (правда, он отказался от титула баронета), химика У. Рамзая, медика А. Флеминга и т.д. В Швеции был возведен в рыцарское достоинство и пожалован титулом барона Й.Я. Берцелиус. Находится в этом списке и имя английского химика

Александра Тодда (1907—1997), получившего в 1962 г. титул пэра (лорда). В 2007 году исполняется 100 лет со дня его рождения. Имеются еще круглые даты: в 1957 г. он получил Нобелевскую премию, а 10 лет назад скончался. Так что у физико-химических биологов и биотехнологов есть все основания для мемориальных мероприятий по этому поводу.

### **Биография ученого**

Александр Робертус Тодд по происхождению шотландец. Родился 2 октября 1907 г. в местечке Кэткарт [Cathcart] к югу от Глазго в семье служащего метро Александра Тодда и Джин Тодд (урожденной Лэури), работницы обувной фирмы. Он был старшим сыном (рядом росли еще старшая сестра и младший брат). Семья располагала средним достатком, однако кредо отца было образование для детей любой ценой. До 11 лет Тодд учился в местной школе, после чего продолжил учебу в школе Алена Глена в Глазго. Здесь под влиянием учителя химии Роберта Джиллеспы у него пробудился интерес к этому предмету. В 1924 г. по окончании средней школы Тодд поступил в Университет Глазго. Он был замечен преподавателями как талантливый студент и уже на первом курсе был удостоен медали Джеймса Блэка и премии Роджера Мьюайерхеда [Muirhead], что гарантировало ему стипендию до окончания учебы в университете. В 1928 г. он окончил его по первому классу, получив степень бакалавра по органической химии. Ему была присуждена стипендия Карнеги (100 фунтов в год), что дало возможность заниматься химией у профессора Т.С. Паттерсона. Вместе с последним Тодд опубликовал в 1929 г. свои первые две статьи [31]. Именно по рекомендации Паттерсона он в 1929 г. отправился для дальнейшей стажировки в лабораторию Вальтера Борше в Германию, во Франкфурт-на-Майне.

Сам Тодд считал время, проведенное в Германии, решающим для его научного формирования. Здесь он

\* 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

основательно овладел немецким языком, познакомился с русским языком через российских стажеров (он обладал лингвистическими способностями и любил овладевать новыми языками до зрелого возраста), сблизился с Берти Блаунтом (его будущим большим другом), а самое главное — выполнил серьезное исследование по химии желчных кислот, главной темой работ В. Борше, известного химика-органика, ученика Отто Валлаха (1847—1931), лауреата Нобелевской премии 1910 г. По результатам данного исследования Тоддом была защищена диссертация в 1931 г. на степень доктора философии по химии желчных кислот, а также вышла в свет совместная публикация с В. Борше [34].

В 1931—1934 гг. он продолжил научные исследования в Ориель-колледже Оксфордского университета в качестве стипендиата выставки 1851 г. [1851 Exhibition Senior Student]. В Оксфорде в лаборатории Роберта Робинсона (1886—1975), будущего лауреата Нобелевской премии 1947 г., которого Тодд считал своим учителем, он занимался изучением антоцианинов — натуральных пигментов растений. Данные этих исследований легли в основу второй его диссертации, которая была защищена в 1933 г., по вопросам синтеза пигментов цветков розы, мальвы, герани, василька и примулы. Вышла серия публикаций по данному вопросу [18]. В колледже он проявил себя и как превосходный игрок в теннис и перед ним стоял выбор пути между карьерой профессионального спортсмена или химика. Он выбрал последнее.

В 1934 г. А. Тодд, получив грант Медицинского исследовательского совета, вернулся в Шотландию и приступил к работе в Эдинбургском университете в должности ассистента кафедры медицинской химии под руководством Дж. Баргера (1878—1939). Он проработал в этой должности год, а потом стал стипендиатом Мемориала Бейта. В 1936 г. он перешел на работу в Листеровский институт профилактической медицины (Челси), а в 1937 г. стал преподавателем биохимии в Лондонском университете.

В 1937 г. произошло важное событие в его жизни — он женился. Его избранницей оказалась Элисон Сара Дейл, старшая дочь известного физиолога Генри Дейла, лауреата Нобелевской премии 1936 г. От этого брака родились сын (тоже Александер) и две дочери — Хелен Джин и Хилари Элисон.

Перед 30-летним ученым с уже приобретенным именем в науке встал вопрос о кафедре. И его учитель Р. Робинсон, и тесть Г. Дейл рекомендовали занять вакантную кафедру биохимии в Торонто. Однако в это время пришло приглашение Тодду стать гостевым лек-

тором Калифорнийского технологического института (Пасадена). Весной 1938 г. он вместе с женой пробыл 5 недель в США, где познакомился с Лайнусом Полингом и другими выдающимися исследователями.

По возвращении в Великобританию он получил предложение занять должности профессора на кафедре химии в Сэр Самюэль Холле и директора химических лабораторий в Университете Манчестера. Это была одна из престижных кафедр химии в стране, в табели о рангах она занимала 3-е место после Оксфорда и Имперского колледжа. Здесь он собрал высококвалифицированный коллектив и трудился до 1944 года, когда был утвержден профессором на кафедре органической химии в Кембриджском университете. Он занимал эту должность до 1971 г. Кстати, с собой в Кембридж Тодд взял 14 штатных сотрудников из Манчестера и 4 присоединившимся к ним, что дало ему возможность сохранить преемственность исследований. Больше того, ему удалось провести техническую реорганизацию лаборатории (заменить газовое освещение на электрическое, выстроить новое здание и т.д.), что позволило ей занять одно из ведущих мест в мире. Одновременно с 1944 г. он состоял членом Крайст-колледжа (впоследствии в 1963 г. он стал его главой и исполнял эту обязанность до 1978 г.). Он способствовал созданию Черчилль-колледжа в структуре Кембриджского университета.

В 1965 году Тодда избирают первым президентом Университета Стрэтклайда [Strathclyde] в Глазго, преобразованного из Королевского технического колледжа, в котором он занимался на курсах металлургии и бактериологии 38 лет назад. На этом посту он находился до 1991 г.

Тодду часто делали предложения стать приглашенным профессором. В этом качестве он выступал в Университете Чикаго (1948), Университете Сиднея (1950), Массачусетском технологическом институте (1954). В 1978—1986 гг. Тодд был приглашенным профессором Хэтфилдского политехникума. Кроме того, он был Тилден-лектором Химического общества Великобритании (1941), Педлер-лектором (1946), Лерверхьюлм-лектором Британского общества химической промышленности (1948).

К 40-м годам XX века он стал широко известным специалистом, авторитет которого признавался как в научном мире, так и в государственных структурах. В результате последовали его назначения на разные ответственные посты. Этому в немалой степени способствовала и обстановка военного времени. С 1939 г. Тодд вместе с Р. Робинсоном стал членом ICI Dyestuffs Research Panel.

Он участвовал в антималярийных исследованиях и в реализации международного пенициллинового проекта. В это время он выполнил работу по выделению и идентификации фактора вылупления личинок червя — картофельного паразита. Он был привлечен также к оборонным исследованиям в Химическом комитете (сначала как его член, а затем председатель) при Министерстве снабжения. Химический комитет был ответственен за создание и производство боевых химических веществ. В военные годы Тодд разработал эффективный метод производства дифениламинхлорарсина (раздражающего отравляющего вещества) и спроектировал опытный завод по производству азотистого иприта (горчичного газа, отравляющего вещества кожно-нарывного действия). Правда, спустя много лет ученый невысоко оценивал результативность этих работ. В 1947 г. он стал членом Консультативного совета по научной политике, а с 1952 по 1964 г. был его председателем. С 1950 по 1973 г. Тодд был распорядителем Фонда Наффилда, финансирующего научные исследования в Великобритании. Эти ключевые посты давали ему возможность объективно и профессионально координировать развитие науки в масштабах страны. Кроме того, в 1965–1968 г. он исполнял обязанности председателя Королевской комиссии по медицинскому образованию. В 1961–1963 г. он был президентом Химического общества Великобритании, в 1981–1982 г. — президентом Британского общества химической промышленности. В 1970 г. он стал президентом Британской ассоциации продвижения науки. В 1942 г. он был избран членом Лондонского королевского общества, а с 1975 по 1980 г. состоял его президентом.

Не менее важные позиции Тодд занимал и в международных общественных организациях. В 1963–1965 г. он возглавлял Международный союз по чистой и прикладной химии. На данном посту (и до этого) он много сделал для укрепления международной кооперации ученых. Еще ранее им была выполнена работа по послевоенному восстановлению потенциала германской химической промышленности в Британской оккупационной зоне. Значима и его деятельность по воссозданию Германского химического общества и сохранению химических энциклопедий Гмелин и Бейльштейн и соответствующих институтов во Франкфурте.

Естественно, такая крупная фигура в научном мире не могла уйти из поля зрения химических и фармацевтических компаний. В 1963–1978 г. он был директором компании Файсонс (Fisons Ltd.). В 30-е годы он вместе со своим коллегой Баргером во время проведения работ по синтезу витамина  $V_1$  сотрудничал с

швейцарской фирмой Хоффман ла Рош (исследования проводились в соперничестве с немецкой группой Мерк и американской компанией R.R. Williams). В 50-е годы Тодд работал вместе с компанией Глаксо (в конкуренции с Мерк и Ледерле) при разработке препаратов для лечения пернициозной анемии — речь идет о синтезе витамина  $V_{12}$ . В 1961–1962 г. он был главой компании Солтерс [Salters]. По-видимому, он консультировал и другие профильные фирмы.

Получение А. Тоддом Нобелевской премии в 1957 г. в еще большей мере стимулировало его признание в национальном и мировом масштабе.

В 1954 году он был возведен в рыцарское достоинство, а в 1962 г. ему был присвоен титул пэра с наименованием «Барон Тодд Трамлингтонский» (графство Кембриджшир).

В 1977 г. Тодд удостоивается высшей награды — Королевского ордена «За заслуги». Это событие особенно обрадовало жену, поскольку оно уравнило ее мужа с отцом (Генри Дейлом) по числу высоких наград: Нобелевская премия, президент Лондонского королевского общества, германский орден «Pour le merite» и британский Королевский орден «За заслуги».

В 1987 г. умерла супруга ученого, с которой он прожил в счастливом браке 50 лет. Тодд пережил жену на 10 лет и скончался в почти 90-летнем возрасте 10 января 1997 года.

#### Научные достижения

Александр Тодд олицетворяет собой сравнительно редкий тип ученого, который, выходя за пределы лаборатории и узкой профессии, становится крупной государственной фигурой, вначале на национальном, а затем международном уровнях.

Его путь химика отмечен рядом беспрецедентных открытий и удач, которых бы хватило на нескольких исследователей.

Безусловно, сыграли свою роль на стартовом этапе стажировка в Германии и особенно работа с Р. Робинсоном, который дал правильные уроки методологии в области органической химии (об этом Тодд сам упоминает в Нобелевской речи). В частности, учитель всегда напоминал о необходимости сочетания синтеза и разложения при изучении химических веществ.

Первый успех к молодому ученому пришел на родине, в Шотландии, куда он вернулся в начале 30-х годов после получения двух докторских степеней. Сосредоточившись под руководством Дж. Баргера на проблеме болезни «бери-бери» (заболевания, связанного с недостатком витамина  $V_1$  — синонимы: тиамин, анев-

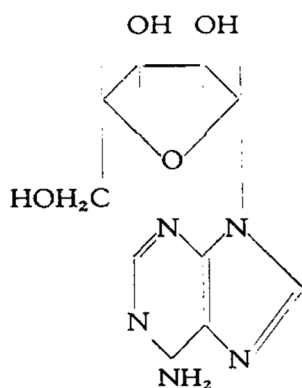
рин), он вскоре синтезировал тиамин в кристаллическом виде [10]. Его технология была широко применена в фармацевтической промышленности для производства витамина В<sub>1</sub>.

В конце 30-х годов Тодд начал заниматься исследованием витаминов Е (токоферола) и В<sub>12</sub>. В 1938 г. он осуществил полный синтез α-токоферола и его аналогов [35]. Химическую структуру витамина В<sub>12</sub> он установил позднее, в 1955 году в совместной работе с Доротой Ходжкин [32]. Одновременно Тодд изучал фармакологические свойства алкалоидов из марихуаны (*Cannabis indica*) и гашиша. В результате был синтезирован неактивный каннабинол и тетрагидроканнабинол с высокой активностью [16].

Важный рубеж в научной жизни Тодда — 1939 год, когда он приступил к исследованиям нуклеиновых кислот, нуклеотидов, нуклеотидных кофакторов. Именно здесь ему предстояло сделать ряд выдающихся открытий. Да, не Тодду выпала честь создания двуспиральной модели ДНК, как это посчастливилось в 1953 г. Уотсону и Крику. Однако на его долю досталась кропотливая работа по построению фундамента будущей молекулярной биологии, что он выполнил последовательно, методично и надежно.

В серии работ 1939—1941 гг. Тодд установил фуранозную форму рибозы и ее бета-конфигурацию в составе нуклеотидов.

Во время Второй мировой войны (1941—1944) и позднее он синтезировал все рибонуклеозиды и дезоксиуридин. При этом были проведены подготовительные исследования по выяснению места присоединения пиримидинового и пуринового оснований. Им было определено, что это происходит в 3-м положении пиримидинового кольца и 9-м положении — пуринового. Таким образом, было установлено, что рибонуклеозиды аденозин (1) и

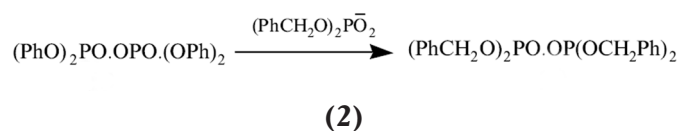


(1)

гуанозин являются 9-β-D-рибофуранозидами аденина и гуанина, соответственно, а уридин и цитидин являются 3-β-D-рибофуранозидами урацила и цитозина, соответственно. Сейчас все это находится в учебниках, а в те годы данные синтезы были величайшим достижением человеческой мысли.

Для реализации своих работ Тодду необходимо было решить проблему фосфорилирования нуклеозидов. Встала задача преобразования фосфатов в несимметричные полифосфаты (АДФ, АТФ и нуклеотидные коферменты).

Существенным моментом здесь стало открытие А. Тоддом в соавторстве с Н.С. Корби и Дж. Кеннером реакций пирофосфатного обмена (2) [28].



Большую роль сыграл и подход с применением дициклогексилкарбодиимида (совместно с индийским исследователем Х.Г. Кораной, будущим лауреатом Нобелевской премии 1968 г., который в 1949—1952 гг. трудился в лаборатории А. Тодда) [29].

Благодаря решению методических проблем удалось быстро осуществить синтез многих кофакторов, среди них: кофермент флавин-зависимых дегидрогеназ — флавинадениндинуклеотид (ФАД) — 1952 год [33], никотинамидадениндинуклеотид (НАД, синонимы: дифосфопиридиндинуклеотид, козимаза, кофермент I) — 1957 год [20], никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ, синонимы: трифосфопиридиндинуклеотид, фосфокозимаза, кофермент II), уридиндифосфатглюкоза (УДФГ), уридиндифосфатгалактоза (УДФГал) и ряд нуклеозиддифосфатов и нуклеозидтрифосфатов. ФАД был синтезирован с помощью конденсации солей рибофлавин-5'-фосфата с 2',3'-О-изопропилиден аденозин-5'-бензилфосфохлоридом с последующим удалением протективных групп. Синтез НАД проводился с использованием дициклогексилкарбодиимида для соединения АМФ и β-никотинамидмононуклеотида.

В 1947 г. Тодд с соавт. осуществил синтез аденозинмонофосфорной кислоты (АМФ), затем с помощью последовательного фосфорилирования АМФ получил аденозиндифосфорную кислоту (АДФ) [24], а далее — аденозинтрифосфорную кислоту (АТФ). Это произошло в 1949 г. В 1954 году он синтезировал уридинтрифосфорную кислоту.



К 1951 году он на основании экспериментов с ферментным гидролизом ДНК установил химическую структуру нуклеиновой кислоты как 3', 5'-связанного полимера. Об этом им было сообщено в 1951 г. в США на 75-м ежегодном собрании Американского химического общества.

В это же время начались исследования по синтезу несимметричных динуклеозидфосфатов как простейшего примера межнуклеотидных связей в нуклеиновых кислотах. В работе с А.М. Майкельсоном [25] был синтезирован дитимидинфосфат, содержащий 3',5'-межнуклеотидную связь.

Эти экстраординарные успехи химика-органика можно сравнить лишь с циклом работ А. Байера или других плодовитых химиков XIX века.

Целесообразно наложить на вышеизложенное ретроспективную оценку 83-летнего Тодда своих работ по нуклеотидам [23]. Очень существенно, что Тодд, как и в Нобелевской лекции, очерчивает три главные задачи: 1) синтез и окончательное выяснение структуры естественных нуклеозидов; 2) разработка методов фосфорилирования и полифосфорилирования нуклеозидов, то есть синтез нуклеотидов; 3) связывание нуклеозидов и других молекул посредством фосфатных и полифосфатных групп, то есть конечная стадия синтеза коферментов.

Первая задача была решена в 1943–1949 гг. В итоге были синтезированы нуклеозиды аденозин, гуанозин, урацил, цитозин. Результаты были напечатаны в 26 статьях.

Вторая задача — разработка методов фосфорилирования — решалась в течение 1945–1961 гг. Были предложены соответствующие методы, в том числе с использованием дициклогексилкарбодимида. Данные были опубликованы в серии 26 работ под общим названием «Исследования по фосфорилированию» (главным образом в *Journal of the Chemical Society*).

Третья задача была логическим завершением всего цикла работ по нуклеотидам, и ее решение привело в 1947–1961 гг. к синтезу ряда ключевых коферментов — АТФ, ФАД, НАД, НАДФ, УДФГ. Результаты отражены в 46 публикациях под рубрикой «Нуклеотиды», в основном в *Journal of the Chemical Society*.

Ученый подчеркивает, что успех пришел благодаря исходным исследованиям структуры витамина B<sub>1</sub>.

По завершении перечисленных исследований, а также ряда работ по нуклеиновым кислотам Тодд практически прекратил деятельность в данном направлении. Хотя он следил за прогрессом в этой области: по достоинству оценил остроумие правил Чаргаффа, отдал дань

уважения открытию Уотсона и Крика двойной спирали ДНК. В этом отходе Тодд усматривает несколько причин: неуверенность в некоторых гипотезах; направление, связанное с изучением коферментов, становилось полем деятельности больше молекулярной биологии, чем органической химии; автор переключился с нуклеотидов на изучение витамина B<sub>12</sub> и пигментов тли. Кроме того, не менее значимым моментом является распад исследовательской группы по нуклеотидам: часть ушла в академические структуры, часть — на производство (за редкими исключениями — Д.В. Браун, А.М. Майкельсон, Х.Г. Корана).

В середине 50-х годов А. Тодд выступил со статьями, обобщающими материалы по нуклеотидам [4, 9, 17, 21, 26].

Таким образом, к 50-м годам XIX века Тодд как бы свершил то главное, к чему был призван, и ровно к 50-летию юбилею со дня рождения ему была вручена Нобелевская премия по химии (1957) «за работы по нуклеотидам и нуклеотидным коэнзимам».

Нобелевский триумф А. Тодда заслуживает подробного описания. По сути дела, это было первое признание Нобелевским комитетом значимости работ по нуклеиновым кислотам. Уже после этого следуют награды Очоа, Корнберга (1959), Уотсона, Крика, Уилкинса (1962), Ниренберга, Кораны, Холли (1968) и других молекулярных биологов.

Знаменательна фраза из поздравительной презентационной речи профессора Арне Фредга от имени Нобелевского комитета по химии Шведской Королевской академии наук. Он назвал работы А. Тодда «прочным основанием для будущего развития в этой области» [7].

Интересны высказывания и самого А. Тодда на Нобелевских торжествах. В Нобелевской речи он подчеркивает аспект органической химии, связанный с выяснением функций живых организмов, о чем в свое время говорил великий шведский химик Йенс Якоб Берцелиус [8]. Но в речи на банкете он придал этой мысли более законченную форму. Конечно, в этом был акт вежливой учтивости перед шведским гостеприимством и благодарности за нобелевское признание. Однако это были не просто слова — за ними стояли большие реальные дела. Много из того, что он сделал как химик-органик, работало на будущее молекулярной биологии.

Вот эти слова: «Как химик-органик я испытываю нежные чувства к Швеции, поскольку именно ваш соотечественник Берцелиус первым дал определение органической химии как химии веществ, обнаруженных в живой материи. Позднее были даны и другие определения раз-



ного характера — безусловно ясно, что огромное развитие индустрии органической химии привело к мнению, что эта наука имеет дело со многими вещами, кажущимися далекими от жизненных явлений. Однако я сам в своей работе следовал в основном определению Берцелиуса и полагаю, что сегодня мы стоим на пороге новой эры, в которой химик-органик, следуя этим путем, может получить ключи, необходимые для раскрытия тайны ядра клетки. Ныне существует естественная тенденция восторгаться секретами атомного ядра, исследование которого физиками и практическое использование — и, увы, неадекватное использование, — человеком стали отличительной особенностью нашего века к настоящему времени. Ядру клетки уделено гораздо меньшее внимание. Но, на мой взгляд, тайны клеточного ядра столь же важны, как и таковые атомного ядра, и их раскрытие может стать величайшим триумфом человечества во второй половине XX столетия. В раскрытии этой тайны химик-органик должен играть главную роль, и перспективы для молодого исследователя здесь широкие и многообещающие, как это бывало и в прошлом» [15].

По-видимому, не случайно Тодд искал и устанавливал контакты со своими единомышленниками в среде органиков и биооргаников, такими как М.М. Шемякин, А.Н. Несмеянов, Ю.А. Овчинников, В. Прелог и др. [3, 13]. Созвучны взгляды А. Тодда и с представлениями Ф. Сенгера, Р.Б. Вудворда, не говоря уже о его учителе Р. Робинсоне.

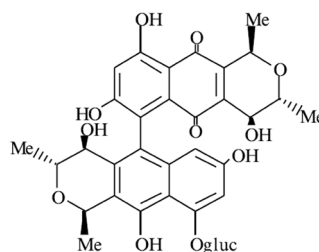
Следует отметить, что Тодд был шестым (из семи) знаменитым шотландцем, получившим Нобелевскую премию за научные исследования: до этого были медик Рональд Росс (1902), химик У. Рамзай (1904), медик Дж.Дж.Р. Маклеод (1923), физик Ч.Т.Р. Вильсон (1927), медик А. Флеминг (1945).

Было бы неверным не упомянуть о других работах Тодда, кроме нуклеотидного цикла. Конечно, на фоне работ с нуклеотидами другие исследования ученого кажутся скромнее. Но все равно их характеризуют тщательность, актуальность, востребованность и, как правило, установка на будущее.

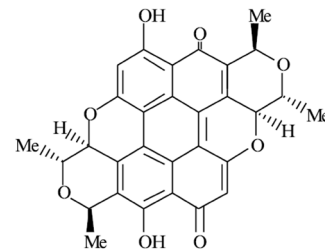
В 30-е годы им проведены работы по растительным пигментам — антоцианинам (в биографическом разделе об этом уже кратко говорилось). Здесь, находясь в сфере научных интересов Р. Робинсона, он синтезировал диглюкозидные антоцианины: гирсутин, мальвин, пеларгонин, пеонин, цианин. Кроме того, он занимался изучением структуры и синтезом одного из продуктов патогенного антрахинона — гельминтоспорина. Эта серия работ знаменательна тем, что он 3 года экспериментировал один,

без соавторов и прошел отличную школу скрупулезного труда химика-органика, а его наставник Робинсон предоставил полную свободу для развития его таланта.

Надо сказать, что к теме натуральных красящих веществ, как и в Оксфорде, Тодд вернулся в 1948 году и не оставлял ее вплоть до окончания своей научной карьеры. Теперь он обратился к пигментам тли из надсемейства *Aphididae* (ныне *Aphidoidea*), которые обладают бледно-желтым пигментом в гемolimфе, превращающимся в красный. Ему удалось увлечь этой проблемой ряд энтузиастов (А.В. Джонсон, С.Ф. МакДональд, Д.В. Камерон) и в результате было разработано новое направление в химии полициклических хинонов [11]. У бобовой (свекловичной) тли (*Aphis fabae*) была установлена структура протоарфина (3), ксантоарфина, хризоарфина и эритроарфина (4).



(3)



(4)

Кроме того, на основании изучения грибов и высших растений Тодд пришел к выводу, что эти вещества являются результатом симбиоза грибов и тли.

### Награды

Имя Тодда получило всемирное признание. Это выразилось, кроме мнения и оценки специалистов, в бесчисленных наградах и почетных званиях. Список довольно солиден: медаль Лавуазье Французского химического общества (1948), медаль Деви Лондонского Королевского общества (1949), Бейкеровский лектор (1954), Королевская медаль Лондонского Королевского общества (1955), медаль Канниццаро Итальянского химического общества (1958), медаль Пауля Карреры Цюрихского университета (1962), медаль Стаса (Stas) Бельгийского химического общества (1962), медаль Лонгстаффа Британского химического общества (1963), медаль Копли Лондонского Королевского общества (1970), золотая медаль имени М.В. Ломоносова АН СССР (1979), медаль Коперника Польской академии наук (1979), медаль Хэнбери (Hanbury) Фармацевтического общества Великобритании (1986). Он был удостоен звания почетного члена ряда зарубежных обществ и академий, в том числе иностранного члена АН СССР (1982) и как правопреемника — РАН (с 1991 г.).

Он имел почетные степени университетов Парижа, Страсбурга, Лондона, Гарварда, Оксфорда, Кембриджа, Глазго, Ливерпуля, Киля, Мадрида, Калифорнии, Мичигана, Чикаго, Мельбурна, Сиднея, Хоккайдо, Гонконга и др. В Шотландии его также избрали почетным членом Королевского общества Эдинбурга (1966). Он был удостоен такой редкой награды, как Орден Восходящего Солнца (Япония). О вышеуказанных наградах и знаках отличия (Нобелевская премия, рыцарство, пэрство и т.д.) мы не упоминаем.

### **Характеристика личности**

Помимо интеллектуальных и деловых качеств, Тодд был наделен уникальными природными физическими данными, которые позволяли ему выдерживать многочисленные нагрузки. Он был высокого роста, имел сильный темперамент, завидную выносливость северянина-шотландца. Его громкий голос хорошо, подбадрывающе действовал на молодежь. В молодости был увлеченным спортсменом (теннис), что сохранило его осанку на многие годы. Все это отвечало требованиям к личности-лидеру и помогало обеспечивать успех во всех его делах. Он обладал непреклонной волей и умел доводить все до конца. Мог слушать и учитывать мнение других и принимать решения, направленные на достижение позитивного результата. Эти качества, несомненно, были замечены государственными деятелями, особенно в военное время, что сыграло определенную роль впоследствии в приоритетном развитии химии в Великобритании.

В исследовательской работе он мог создавать обстановку корпоративного научного братства. Так было и в Манчестере и в Кембридже. Маленький штрих: когда он приехал из Манчестера в Кембридж, то все прибывшие с ним сотрудники (всего 18) дали слово встречаться каждый год в первую пятницу мая и так делали до кончины Тодда (с 70-го года этому клубу дали название «The Toddlers»). Уже упоминалось, что он не оставил коллег на старом месте, а многих взял с собой.

Тодд был чужд аристократической рисовки, хотя титул лорда обязывал его к этому, по крайней мере, формально. Особенно это проявилось во время его 27-летнего президентства в Университете Стрэтклайда в Глазго. Ему импонировала эта должность на своей родине, в Шотландии. Студенты отвечали ему тем же: он был популярен среди них, в том числе и из-за своих демократических привычек. Так, например, студенты называли паб в университетском кампусе, который любил посещать президент и простаивать у бара за кружкой пива, «Лорд Тодд» (у ученого было чувство юмора и

самоиронии, поэтому у него это не вызывало отрицательных эмоций и даже нравилось).

У него был стойкий интерес к изучению иностранных языков. Кроме европейских, он пытался овладеть и другими. Так, например, он выучил иврит, чтобы в Хайфе на конференции закончить доклад на этом языке!

Тодд был долгожителем и сумел за 90 лет сделать многое. В том числе написать, как и другие известные химики (С. Очоа, А. Корнберг, С. Лурья и др.), автобиографию с колоритным названием «Время вспомнить» (1983) [13]. В ней он честно и объективно делится своими соображениями о науке и личной жизни. Такая же прямота была свойственна ему и в одном из своих многочисленных ежегодных президентских посланий, для которого он избрал заглавие «Пора думать» (1970) [14], что вызвало у публики негативную реакцию, постепенно сгладившуюся. Хорошо отдавая отчет в значении своих дел для истории, он в 1985–1997 гг. систематизировал личный архив и сдал его на хранение в виде 8 поступлений (коробок) в Архивный центр Черчилль-колледжа в Кембридже (см. <http://janus.lib.cam.ac.uk>).

В целом это была яркая, сильная личность, оставлявшая неизгладимое впечатление у всех, общавшихся с ним.

### **Контакты с русскими учеными**

Очень содержательна и насыщена событиями тема взаимодействия А. Тодда с российскими исследователями. Здесь выстраивается почти 50-летняя история (если не считать общение молодого ученого с русскими стажерами в Германии в 30-е годы).

Известно, что у Тодда были встречи в 50-е годы с президентом АН СССР А.Н. Несмеяновым, химиком по специальности, основоположником элементоорганической химии. На одной из встреч на заседании Международного союза по чистой и прикладной химии летом 1955 г. между ними была достигнута договоренность о желательности стажировки молодых химиков за границей. В этом же году осенью Великобританию посетил заместитель Председателя Совета Министров СССР А.Н. Косыгин, к которому А. Тодд обратился с предложением принять двух стажеров из Советского Союза только с одним условием: знать химию и не заниматься политической пропагандой. Итогом был приезд в лабораторию Тодда осенью 1956 г. русских исследователей — Н.К. Кочеткова и Э.А. Мистрюкова. Николай Константинович Кочетков (1915–2005) провел в Кембридже два года (1956–1957), позднее стал академиком АН СССР

и членом-корреспондентом АМН СССР. Стажировка у Тодда, безусловно, повлияла на развитие его научных интересов. Э.А. Мистрюков также продолжил работу в области органической химии, занимаясь вопросами хроматографии (им сконструирован прибор, названный его именем).

Отдельная глава — контакты Тодда с М.М. Шемякиным и его школой. Английский ученый высоко ценил его вклад в органическую химию, общался с ним на международных конференциях, переживал его неожиданную смерть в 1970 г., тревожась о преемнике. Однако в лице нового директора Ю.А. Овчинникова он нашел достойную замену. Незадолго до смерти М.М. Шемякин познакомил Тодда с Ю.А. Овчинниковым. Отношения между ними стали особенно активными в период, когда Тодд был президентом Лондонского Королевского общества (1975—1980), а Юрий Анатольевич вступил на должность вице-президента АН СССР (с 1974 г.) (рис. 1).

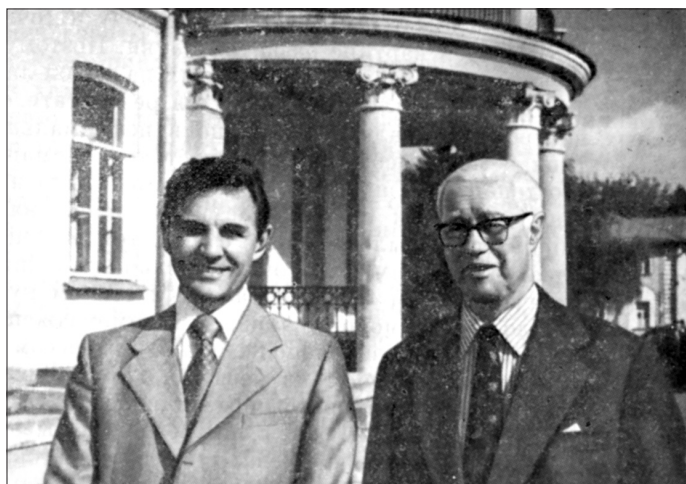


Рис. 1. А. Тодд и Ю.А. Овчинников  
(Москва, 1978)

Ю.А. Овчинников хорошо знал истинный вклад Тодда в науку и использовал весь свой авторитет для формального признания нашей страной заслуг выдающегося британского химика. Результат налицо: в 1979 г. Тодд получает золотую медаль имени М.В. Ломоносова АН СССР (1979), а в 1982 г. становится иностранным членом Академии наук СССР. Тодд неоднократно посещал Советский Союз. Так, по приглашению Ю.А. Овчинникова он вместе с В. Прелогом участвовал в симпозиуме «Перспективы биоорганической химии и молекулярной биологии», посвященном памяти М.М. Шемякина в Ташкенте (1978). В статье, посвященной памяти Ю.А.

Овчинникова в мемориальной книге 1991 г., А. Тодд пишет: «В лице Юрия я потерял бесценного друга, а его страна — одного из своих лучших посланников, представляющих науку за рубежом. И я сомневаюсь, сможет ли кто-то заменить его» [3]. Так мог сказать только человек, который хорошо разбирается в людях науки, не говоря уже о том, что он понимает и ценит настоящую мужскую дружбу.

Наконец, есть очень любопытный эпизод из истории контактов Тодда с российскими учеными. Речь пойдет о целевой поездке бывшего президента АН СССР академика А.Н. Несмеянова в марте 1976 года в Англию для официального зачисления его иностранным членом Лондонского Королевского общества (решение об этом было принято еще в 1961 г.). Это событие подробно описано супругой А.Н. Несмеянова в ее книге воспоминаний [2]. Описание еще раз свидетельствует о том глубоком уважении, которое испытывал Тодд по отношению к русским ученым: на торжественной церемонии А.Н. Несмеянов был первым вызван президентом Лондонского Королевского общества Тоддом для того, чтобы поставить подпись в почетной книге членов данного общества (до этого от СССР там расписались В.А. Амбарцумян, И.М. Виноградов, А.Н. Колмогоров, Н.Н. Семенов), на банкете в мужском клубе «Атенеум» он сидел рядом с лордом Тоддом. Здесь же на банкете ему был вручен диплом «Золотой медали за заслуги в области химии» (сама медаль была вручена позднее в Москве), выпущенной журналом «Тетраэдрон», учрежденным Р. Робинсоном и Р.Б. Вудвордом.

Факты жизни и деятельности Александра Тодда освещены в ряде публикаций [1, 5]. Наиболее полные биографические и библиографические сведения о нем представлены в публикации [6], в информации Нобелевского комитета (7, 8, 15), в Интернет-источниках. Имеется 3-часовой фильм с его участием [12].

## Литература

1. *Лауреаты Нобелевской премии. Энциклопедия: пер. с англ. В 2-х т. Т. 2. М-Я.* — М.: Прогресс, 1992. — С. 500—501.
2. *Несмеянова М.А. Свет любви: Воспоминания об Александре Николаевиче Несмеянове.* — М.: Наука, 1999. — С. 288—292.
3. *Тодд А.Р.* / В кн. Юрий Анатольевич Овчинников. *Жизнь и научная деятельность.* — М.: Наука, 1991. — С. 133—134.



4. *Todd A.R.* Нуклеиновые кислоты / Перспективы развития органической химии. Под ред. А. Тодда. Пер. с англ. — М.: ИЛ, 1959.
5. *Чолаков В.* Нобелевские премии. Ученые и открытия / Пер. с болг. — М.: Мир, 1986. — 368 с.
6. *Brown D.M., Kornberg H.* Alexander Robertus Todd, O.M., Baron Todd of Trumpington. 2 October 1907 — 10 January 1997 // *Biogr. Memoirs of Fellows of the Royal Society*. — 2000. — Vol. 46. — P. 516–532.
7. *Fredga A.* Presentation Speech. The Nobel Prize in Chemistry 1957 / In: *Nobel Lectures. Chemistry 1942–1962*. — Elsevier, Amsterdam, 1964.
8. *Nobel Lectures. Chemistry 1942–1962*. — Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1964.
9. *Nucleic acids. In: Perspectives in organic chemistry (ed. by A.R. Todd)*. — New York: Interscience, 1956. — 245 p.
10. *Todd A.R.* Aneurin. Part VII. A synthesis of aneurin // *J. Chem. Soc.* — 1937. — P. 364 (co-auth. — Bergel F.).
11. *Todd A.R.* Aphid pigments / In: *Organic substances of natural origin. Vol. 2 (Oxidating coupling)*. Eds W.I. Taylor a. A.R. Battersby. — New York: Marcel Dekker, 1967. — P. 203 (co-auth. — Cameron D.W.).
12. *Todd. A life of discovery in bio-organic chemistry: Lord Alexander Todd O.M. FRS in conversation with Professor Sir Hans Kornberg FRS, 26 June 1990* (Film, Duration 175 mins 40 secs). <http://www.filmandsound.ac.uk/collections/records/0028-0000-2734-0000-0-0000-0000-0>
13. *Todd A.R.* A time to remember: the autobiography of a chemist. — Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1983.
14. *Todd A.R.* A time to think (Presidential Address, B.A.) // *Advmt. Sci.* — 1970. — Vol. 27. — P. 1–6.
15. *Todd A.R.* Banquet speech / In: *Les Prix Nobel en 1957*. Ed. Goeran Liljestrand, [Nobel Foundation], Stockholm, 1958. <http://nobelprize.org>.
16. *Todd A.R.* Cannabis indica. Part XII. Some analogues and a water-soluble derivative of Tetrahydrocannabinol // *J. Chem. Soc.* — 1943. — N 6. — P. 286–287 (co-auth. — Bergel F., Morrison A.L., Rinderknecht H., MacDonald A.D., Woolfe G.).
17. *Todd A.R.* Chemistry of nucleotides (Bakerian Lecture) // *Proc. Roy. Soc. London. Series A, Math. and Physi. Sci.* — 1954 Oct. 21. — Vol. 226. — N 1164. — P. 70–82.
18. *Todd A.R.* Experiments on the synthesis of anthocyanins. Part XVI. A synthesis of malvin chloride // *J. Chem. Soc.* — 1932. — P. 2299 (co-auth. — Robinson R.).
19. *Todd A.R.* Experiments on the synthesis of purine nucleosides. Part 1. Model experiments on the synthesis of 9-alkypurines // *J. Chem. Soc.* — 1943. — P. 383–386 (co-auth. — Baddley J., Lythgoe B., McNeil D.).
20. *Todd A.R.* / In: *The Nucleic Acids*. Ed. by E. Chargaff a. J.N. Davidson. — Academic Press, New York, 1955. — Vol. 1. — P. 409 (co-auth. — Brown D.M.).
21. *Todd A.R.* // *J. Chem. Soc.* — 1957. — P. 3733 (co-auth. — Hughes N.H., Kenner G.W.).
22. *Todd A.R.* // *Nature*. — 1936. — Vol. 138. — P. 76 (co-auth. — Bergel F.).
23. *Todd A.R.* Nucleotides, nucleotide coenzymes and phosphorylation // *Current Contents/ AB&ES*. — 1990 June 4. — Vol. 21. — N 23. — P. 16–17.
24. *Todd A.R.* Nucleotides. Part 1. Muscle adenylic acid and adenosine diphosphate // *J. Chem. Soc.* — 1947. — P. 648–651 (co-auth. — Baddley J.).
25. *Todd A.R.* A.M. Nucleotides. Part 32. Synthesis of dithymidine phosphate containing a 3', 5'-internucleotidic linkage // *J. Chem. Soc.* — 1955. — P. 2632 (co-auth. — Michelson A.M.).
26. *Todd A.R.* Recent advances in the synthesis of nucleotide coenzymes / In: *Festschrift Arthur Stoll*. — Basel: Sandoz, 1957.
27. *Todd A.R.* Studies on phosphorylation. Part 1. Dibenzyl chlorophosphonate as a phosphorylating agent // *J. Chem. Soc.* — 1945. — P. 382–385 (co-auth. — Atherton F.R., Opershaw H.T.).
28. *Todd A.R.* Studies on phosphorylation. Part 10. The preparation of tetra-esters of pyrophosphoric acid from diesters of phosphoric acid by means of exchange reactions // *J. Chem. Soc.* — 1952. — P. 3669 (co-auth. — Corby N.S., Kenner G.W.).
29. *Todd A.R.* Studies on phosphorylation. Part 11. The reaction between carbodiimides and acid esters of phosphoric acid. A new method for the preparation of pyrophosphates // *J. Chem. Soc.* — 1953. — P. 2257 (co-auth. — Khorana H.G.).
30. *Todd A.R.* Synthesis in the study of nucleotides (Nobel Lecture) // *Science*. — 1958. — Vol. 127. — P. 787 (see also *Les Prix Nobel en 1957*. Stockholm, Sweden: Norstedt Soener, 1958, p. 119–133).
31. *Todd A.R.* The action of phosphorus pentachloride on ethyl tartrate // *J. Chem. Soc.* — 1929. — P. 1768 (co-auth. — Patterson T.S.).
32. *Todd A.R.* The structure of vitamin B<sub>12</sub>. In: *Recent work on naturally occurring nitrogen heterocyclic compounds* (ed. K. Schofield). — London, Chemical Society // *Chem. Soc. Spec. Publ.* — 1955. — N 3. — P. 109 (co-auth. — Hodgkin D.C., Johnson A.W.).
33. *Todd A.R.* Total synthesis of flavin-adenine-dinucleotide // *Nature*. — 1952. — N 4335. — P. 924 (co-auth. — Christie S.M.H., Kenner G.W.).
34. *Todd A.R.* Ueber Apocholsaeure und Dioxy-cholensaeure Schmelzp. 259–260 o // *Z. Physiol. Chem.* — 1931. — Bd. 197. — S. 173 (co-auth. — Borsche W.).
35. *Todd A.R.* Vitamin E. Synthesis of a-tocopherol // *Nature*. — 1938. — Vol. 142. — P. 38 (co-auth. — Bergel F., Jakob A., Work T.S.).

Интернет-источники:

<http://nobelprize.org>

<http://en.wikipedia.org>

<http://www.britannica.com>

<http://janus.lib.cam.ac.uk/>

<http://www.chu.cam.ac.uk/archives/collections/>

The Nobel Prize Internet Archive

**Резюме.** По случаю 100-летия со дня рождения лауреата Нобелевской премии по химии, Лорда Александра Тодда сделан обширный обзор его жизни и деятельности. Представлен список его основных трудов и биографий.

*Ключевые слова:* история науки, химия, нуклеозиды, нуклеотиды, нуклеиновые кислоты, биография, Александр Тодд.

## ON THE CENTENARY OF THE BIRTH OF ALEXANDER TODD, AN OUTSTANDING CHEMIST OF 20<sup>th</sup> CENTURY, ONE OF FOUNDERS OF THE BASE OF THE MODERN MOLECULAR BIOLOGY

V.S. VOROBYEV, O.V. VOROBYEVA

*Ovchinnikov Society of Biotechnology of Russia, Moscow*

The full review of biography and scientific activity of Lord Alexander Todd, Nobel Prize winner on chemistry was presented on occasion of the centenary from his birth. A list of his works and biographic sketches was published also.

*Keywords:* history of science, chemistry, nucleosides, nucleotides, nucleic acids, biography, Alexander Todd.



## ЮБИЛЕЙНЫЕ И ЗНАМЕНАТЕЛЬНЫЕ ДАТЫ 2007 ГОДА

### СОБЫТИЯ, ФАКТЫ

#### К 80-летию открытия радиационного мутагенеза\*

В 1927 году произошло значимое для генетики событие: была напечатана статья Германа Меллера «Искусственная трансмутация гена» (Mueller H.J. Artificial transmutation of the gene. — Science, 1927. — Vol. 66. — N 1699. — P. 84–87). Эта публикация относится к веховым столбам биологии: она стоит в одном ряду с

классическими работами Менделя, Моргана, Дельбрюка, Уотсона и Крика, Ниренберга и Маттеи и др. По индексу цитирования она занимает высокое место — из более 6000 ссылок на Меллера в 1945–1990 гг. данная работа упоминалась чаще всего (284 раза). Выход в свет этого сообщения сразу же сделал ученого мировой знаменитостью. Способствовал всеобщему признанию и доклад Меллера в Берлине на V Международном генетическом съезде в 1927 году под названием «Проблема генетической модификации». Ниже приводятся фрагменты оригинала статьи (рис. 1).

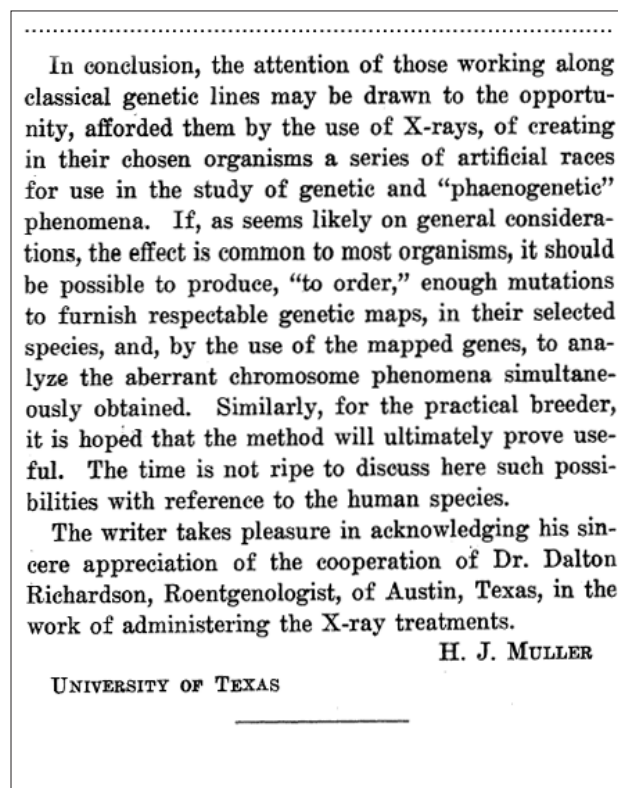
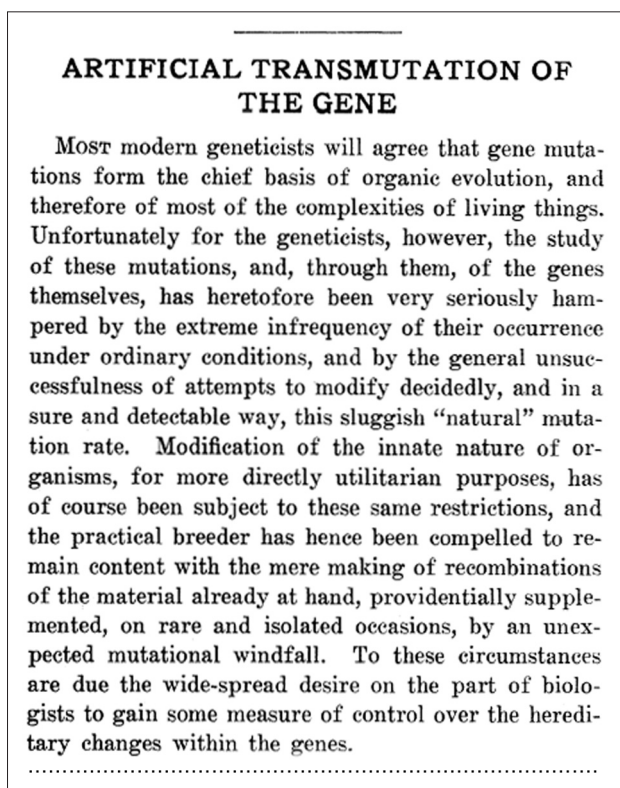


Рис. 1. Начало и конец статьи Г. Меллера 1927 г. в журнале «Science»

Полный текст в pdf см. на сайте: <http://www.sciencemag.org/cgi/reprint/66/1699/84.pdf>.

В указанной статье Меллер впервые изложил суть своего открытия радиационного мутагенеза. Сам факт увеличения скорости мутаций по сравнению с нормой под действием рентгеновских лучей был обнаружен американским исследователем в 1926 г.

Еще в 1920 году Г. Меллер вместе со своим коллегой по Колумбийскому университету Э. Альтенбургом предложил метод измерения скорости мутаций. Он

работал с дрозофилами и поставил перед собой задачу получить вызванные, искусственные мутации. Вначале он использовал повышение температуры и установил при этом увеличение числа мутаций. Применялось также облучение светом. А в 1923 г. были начаты опыты с воздействием на плодовых мушек рентгеновскими лучами и радием. Здесь на первых порах ученого постигла неудача: связь между радиацией и мутацией было трудно установить, поскольку радиация стерилизовала дрозофил. Однако в 1926 г. ему удалось провести эксперименты с облучением разными дозами рентгеновских лучей, в которых он использовал свои линии 1919 г. с супрес-

\* Материал подготовлен О.В. Воробьевой

сией кроссинговера. Эффект превзошел все ожидания. Была сразу же установлена количественная линейная зависимость между радиацией и летальными мутациями. В потомстве облученных дрозофил наблюдались почти 100%-ные мутации, что в тысячи раз превышало частоту мутаций в естественных условиях.

Это было основание новой науки — радиационной генетики, значимость которой выросла после бомбардировки Хиросимы и Нагасаки. По-видимому, не случайно Г. Меллер получил Нобелевскую премию в 1946 году. Активно восприняли метод искусственного мутагенеза селекционеры: уже в 1928 г. Л. Стедлер применил его к кукурузе с положительным эффектом. В этом же году опыты Меллера были повторены П. Уайтингом на представителе паразитических ос-наездников из семейства Braconidae — *Habrobracon juglandis* (Whiting P.W., Science, 1928, Vol. 68, P. 59–60). Далее метод радиационного мутагенеза стал широко применяться в лабораториях мира.

Было бы не совсем корректным в исторической заметке о выдающемся ученом не упомянуть о его ключевых фактах жизни и личностных характеристиках, тем более о таком ярком, колоритном и необычном человеке, как Меллер. А ведь его жизнь изобилует экстраординарными, порой парадоксальными поступками и увлечениями: от попытки суицида и страсти к евгенике до письма Сталину и участия в гражданской войне в Испании.

Герман Джозеф Меллер родился 21 декабря 1890 г. в Нью-Йорке. По окончании университета в 1910 г. занимался физиологией в Корнельском университете (Нью-Йорк). В 1912 г. присоединился к группе исследователей под руководством Т.Х. Моргана — А. Стертеванту и К. Бриджесу, где трудился 3 года, после чего по приглашению Джулиана Хаксли переехал в Техас. В лаборатории Моргана он овладел методами исследования генетики дрозофилы, сделал ряд интересных наблюдений, подготовил диссертацию. Меллер опубликовал несколько работ, в том числе и вошел в список авторов фундаментального труда «Механизм менделевской наследственности» (Morgan T.H., Sturtevant A.H., Muller H.J., Bridges C.B. Mechanism of Mendelian Heredity. — Henry Holt & Co, 1915). Однако он не включался в число авторов главных периодических публикаций и к тому же некоторые его теоретические представления расходились с группой Моргана.

Работая в Институте Райса и университете в Остине, он осуществил исследования, приведшие его, как указано выше, к открытию радиационного мутагенеза.

Пришедшая к нему после 1927 г. слава недолго удерживала его в состоянии равновесия. События Великой депрессии, разочарование в капитализме, семейные неурядицы привели его к пессимизму и даже к попытке самоубийства. Он стал проявлять интерес к социализму и в нем увидел выход из положения. В частности, он помогал стажерам из СССР в своей лаборатории подпольно издавать и распространять левую студенческую газету «Искра» («The Spark»).

В 1932 году он отправился в 8-летнее заграничное путешествие по 5 странам (Германия, СССР, Испания, Франция, Великобритания). Сначала он поработал в Берлине у Н.В. Тимофеева-Ресовского, а в 1933 г. принял приглашение Н.И. Вавилова возглавить лабораторию в новом Институте генетики (сначала — в Ленинграде, потом — в Москве). Общение с Н.И. Вавиловым оставило у него неизгладимое впечатление, сблизило их, вместе они объездили многочисленные биостанции ВИРа и даже чуть было не разбились в самолете на Кавказе. Необходимо сказать, что это был второй приезд Меллера в СССР (первый состоялся в 1922 г., когда он посетил лаборатории Н.И. Вавилова и Н.К. Кольцова и привез линии дрозофил). Меллеру принадлежит ряд замечательных высказываний о значении Н.И. Вавилова для мировой науки и его человеческих чертах. Вот одно из них: «Всех, кто знал Николая Ивановича, воодушевляли его неисчерпаемая жизнерадостность, великодушные и обаятельная натура, многосторонность интересов и энергия. Эта яркая, привлекательная и общительная личность как бы вливалась в окружающих свою страсть к неутомимому труду, к свершениям и радостному сотрудничеству. Я не знал никого другого, кто разрабатывал бы мероприятия такого гигантского масштаба, развивая их все дальше и дальше, и при этом вникал бы так внимательно во все детали».

В Советской России Г. Меллер продолжал свои генетические исследования, особенно по радиационному мутагенезу. Из наиболее известных его работ этого периода надо указать на определение размеров гена (совместно с А.А. Прокофьевой-Бельговской). Здесь же вновь вспыхнуло его увлечение евгеникой. В 1935 г. он выпустил в свет книгу по евгенике — «Выход из мрака: взгляд биолога на будущее» (Out of the Night. A biologist's view of the future. — New York, 1935). Ощущая революционно-преобразовательный дух социалистического государства, он попытался увлечь своими решительными евгеническими идеями его лидера — Сталина и даже обратился к нему с пространством письмом-предложением, которое осталось без ответа (к письму на русском языке

он приложил и книгу на английском «Выход из мрака»: перевод ее, по свидетельству Меллера, произвел на вождя неблагоприятное впечатление). Текст этого письма был обнаружен в архиве И.В. Сталина и опубликован Юрием Николаевичем Вавиловым, сыном Н.И. Вавилова: Письмо Германа Меллера — И.В. Сталину. ВИЭТ, 1997, № 1, С. 65—76. О крайней бездоказательности доктрин, развиваемых великим генетиком, можно судить по следующей цитате: «Многие матери завтрашнего дня, освобожденные от оков религиозных предрассудков, будут горды смешать свою плазму с плазмой Ленина или Дарвина и дать обществу ребенка, наследующего их биологические качества ...».

В феврале 1934 г. Меллер по представлению Н.И. Вавилова был избран членом-корреспондентом АН СССР.

В середине 30-х годов Г. Меллер принял участие в острых дискуссиях с начавшими набирать силу лысенковцами-ламаркистами. Здесь он проявил весь свой темперамент и глубокие знания генетики, нередко применяя в спорах аргумент о том, что если будут наследоваться приобретенные признаки бедности, недостаточного питания и т.д., то тогда перспективы мировой революции весьма сомнительны. Однако по совету Н.И. Вавилова он во избежание возможных репрессий покинул СССР.

Весной 1937 г. Меллер отправился из России в республиканский Мадрид, где работал в республиканской интернациональной бригаде, помогая в вопросах переливания крови. Затем после короткого пребывания в Париже в лаборатории Бориса Эфрусси прибыл в сентябре 1937 г. в Эдинбург (Шотландия).

В 1940 году ученый вернулся на родину. В 1941—1945 гг. работал в Амхерст колледже (Массачусетс). Во время 2-й Мировой войны продолжал заниматься дрозофильной тематикой, сосредоточившись на измерении скорости спонтанных мутаций (в противоположность вызванных радиацией). Был также советником по Манхеттенскому проекту, правда, без допуска к секретам. Несмотря на его социалистические взгляды в 1945 г. он занял должность профессора зоологии в Индианском университете.

Нобелевская премия, присужденная ему в 1946 году, открыла совершенно новые перспективы. Он оказался в центре общественных и научных дискуссий об атомной угрозе человечеству и со свойственной ему страстью выступил против ядерного оружия. Излишне

говорить о том, что его включали во все авторитетные комиссии по данному вопросу. В 1955 г. он в числе 11 выдающихся ученых (среди них 10 лауреатов Нобелевской премии: Макс Борн, Лайнус Полинг, Фредерик Жолио-Кюри, Сэвил Пауэл и др.) подписал Манифест Рассела — Эйнштейна, что привело впоследствии к развертыванию Пагоушского движения (1957).

Для полноты и биографической достоверности нужно добавить, что после войны, в 1949 г. в знак протеста против лысенковщины и преследования Орбели, Шмальгаузена и других ученых Меллер снял с себя звание иностранного члена АН СССР (такую же акцию проделал и другой иностранный член АН СССР, Нобелевский лауреат, английский физиолог Генри Дейл). Однако в 1990 г. Меллер посмертно восстановлен в этом звании.

В последние годы жизни он много времени посвятил реформам преподавания биологии в школе и разработке евгенической программы «Выбор зачатия», центральной идеей которой является замораживание спермы выдающихся мужчин для последующего использования с целью улучшения поколений. Это была все та же «позитивная» евгеника 30-х годов, делающая ставку на размножение «лучших» и ограничение рождаемости «худших».

В отставку из Индианского университета Г. Меллер ушел в 1964 г. Умер он 5 апреля 1967 г.

Более подробно биография ученого изложена в работах Carlson E.A. Genes, radiation, and society: the life and work of H.J. Muller (1981) и И.А. Захарова с соавт. (1990, 1992). Сборники его трудов и библиография представлены в: Muller H.J. Studies in genetics (1962); Man's future birthright: essays on science and humanity. Ed. by E.A. Carlson (1973). Архивные материалы, включая рукописи, оттиски, переписку, хранятся в Индианском университете — справки: <http://purl.dlib.indiana.edu/iudl/findingsaidslilly/IndU-Li-VAA1280>. Интернет-источники: [www.nobelprize.org](http://www.nobelprize.org), [www.en.wikipedia.org](http://www.en.wikipedia.org), [www.britannica.com](http://www.britannica.com).

В заключение следует отметить, что 2007 год является также круглой датой и для других юбилеев Меллера: 40-летия со дня смерти и 60-летия публикации его статьи «The Gene» в Proc. R. Soc. Lond., 1947, Vol. 134, P. 1—37 — Трастовской лекции перед Лондонским Королевским обществом 1 ноября 1945 г. Так что внимание к памяти ученого в современном журнале вполне уместно.



## СОБЫТИЯ ПЕРВОГО ПОЛУГОДИЯ 2007 ГОДА\*

**17–18 апреля 2007 года** в Москве состоялся II Международный конгресс «Топливный биоэтанол-2007». Он проводится под эгидой Российской биотопливной ассоциации. Общество биотехнологов России также числится среди организаторов этого мероприятия. В конгрессе приняли участие около 170 компаний из 21 страны, из них 60% фирм приходится на Россию. Присутствовали эксперты из РФ, Европы, США. С докладами выступили заместитель директора департамента Министерства сельского хозяйства РФ Н.Т. Сорокин, председатель подкомитета по возобновляемым источникам энергии Государственной Думы ФС РФ В.Б. Иванов. Гость Конгресса глава Агентства по энергоснабжению Правительства Украины Е.И. Сухин сообщил о состоянии производства биоэтанола в их стране. Были обсуждены ключевые проблемы, касающиеся юридических, экономических, организационных, технологических аспектов производства биоэтанола. В центре внимания были вопросы государственной поддержки производства биоэтанола, что особенно важно для стимулирования данного направления в РФ.

**23–26 апреля 2007 года** в Москве прошел VIII Международный форум «Высокие технологии XXI века». По традиции в его рамках проводится конференция и выставка в Экспоцентре на Красной Пресне. Мероприятие осуществляется под патронатом Правительства г. Москвы и Торгово-промышленной палаты РФ. На Форуме проводился конкурс «Высокие технологии в реализации приоритетных национальных проектов». Работали специализированные разделы «Нанотехнологии» и «Композиционные материалы и сплавы».

**24–25 мая 2007 года** в Пущино состоялась I Всероссийская научно-практическая конференция «Питательные среды и методы культивирования клеток для биологии, медицины и биоиндустрии: фундаментальные и прикладные аспекты». Данное мероприятие включало в себя два пленарных заседания, два симпозиума, семинар. Была организована выставка оборудования, приборов и продукции биотехнологических компаний. Состоялась презентация «55 лет НПО «Питательные среды» ФГУП «НПО «Микроген», которую провел заместитель директора профессор М.М. Меджидов

(Махачкала). Одним из центральных событий конференции стал конкурс молодых ученых, проведенный в два этапа и выявивший наиболее достойных победителей.

### Круглый стол «Законодательное обеспечение развития химико-фармацевтической и биотехнологической промышленности»

**7 июня 2007 года** в Москве в Государственной Думе ФС РФ состоялся круглый стол «Законодательное обеспечение развития химико-фармацевтической и биотехнологической промышленности». Он был организован Комитетом Государственной Думы по промышленности, строительству и наукоемким технологиям. С докладами выступили представители законодательной и исполнительной власти, ученые, производственники. Состоялось всестороннее обсуждение всех состояний и перспектив развития отечественной фармацевтической и биотехнологической промышленности.

Было констатировано, что в настоящее время потребность Российской Федерации в лекарствах закрывается за счет собственного производства и импорта. В 2006 году объем фармацевтического рынка России составил около 300 млрд. руб. (в розничных ценах), из них доля отечественного производства — менее 25%. В натуральном выражении на российские лекарственные средства приходится 70% рынка. Из общего объема фармацевтического рынка по итогам 2006 г. аптечный рынок составил 62,5%, госпитальный рынок — 14,0%, программа ДЛО — 23,4%.

В фармацевтической промышленности действуют около 600 предприятий (из них более 90% относятся к негосударственной форме собственности), на которых трудятся 65 тысяч человек. На долю 10 ведущих отечественных производителей приходится более 50% фармацевтической продукции.

Производство лекарств в стране обеспечивает 0,7% общего объема промышленного производства, доля продукции отрасли в ВВП составляет 0,5%.

Недостаточное внимание государства к отрасли, ориентация здравоохранения на импорт лекарственных средств, высокие административные барьеры при регистрации и постановке на производство новой продукции, слабость научной базы, отсутствие гармонизированных с европейскими требованиями нормативно-технической

\* Материал подготовлен О.В. Воробьевой.

документации на разработку, испытания и производство лекарственных средств, несовершенство законодательной базы в сфере обращения лекарств и медицинских изделий делают производство многих видов отечественной фармацевтической продукции неконкурентоспособным по отношению к зарубежному. Ситуация в российской фарминдустрии остается крайне сложной, нарастающая зависимость от импорта лекарственных средств превходит допустимые пределы.

Основы законодательного обеспечения сферы разработки, производства и реализации медицинской продукции заложены в ряде федеральных законов («Основы законодательства РФ об охране здоровья граждан», «О лекарственных средствах», «О лицензировании отдельных видов деятельности», «О наркотических средствах» и др.). Однако все эти законодательные акты требуют дальнейшего совершенствования в соответствии с задачами развития отрасли.

Признавая, что обеспечение населения и учреждений здравоохранения невозможно без создания современной фарминдустрии, способной реагировать на запросы общества в обычное время, в период эпидемий, чрезвычайных ситуаций и в особый период, участники круглого стола обсудили и поддержали предложения по развитию отечественной фармацевтической промышленности, выработанные межведомственной рабочей группой, созданной в соответствии с решением совещания у Первого заместителя Председателя Правительства Российской Федерации Д.А. Медведева 22 марта 2007 года.

Участники круглого стола дали следующие рекомендации.

#### *1. Правительству Российской Федерации:*

1.1. Разработать и принять комплекс мер по развитию медицинской промышленности Российской Федерации на 2008–2014 гг., предусмотрев, в частности:

- разработку федеральной целевой программы развития медицинской промышленности на 2009–2014 гг.;
- разработку ведомственных программ организации производства стратегически важных видов фармацевтической продукции по полному циклу (от субстанций до готовых лекарственных форм);
- разработку технических регламентов о безопасности лекарственных и диагностических средств;
- утверждение порядка и сроков внедрения стандартов GMP;
- устранение избыточных административных барьеров при регистрации медицинской продукции, лицензировании ее производства и сертификации;

- меры по повышению конкурентоспособности отечественной фармацевтической продукции;
- меры по повышению инвестиционной привлекательности отрасли, технологического переоснащения предприятий.

1.2. Рассмотреть вопрос о целесообразности создания федерального органа исполнительной власти, определяющего техническую политику в медицинской промышленности и осуществляющего координацию работ в области разработки и производства медицинской продукции.

1.3. Разработать и внести в Государственную Думу проект федерального закона «О внесении изменений в Федеральный закон «О лекарственных средствах», в котором предусмотреть:

- совершенствование механизма допуска лекарственных и диагностических средств к медицинскому применению в Российской Федерации, снятие избыточных административных барьеров;
- повышение ответственности субъектов обращения лекарственных средств за качество, эффективность и безопасность лекарственных средств;
- исключение дублирования норм Закона Российской Федерации «О ветеринарии» и Федерального закона «О лекарственных средствах».

1.4. Поручить представителям государства в органах управления ОАО «Российская венчурная компания» уделять приоритетное внимание финансированию проектов по разработке новых высокоэффективных наукоемких лекарственных средств и технологий их производства.

*2. Министерству промышленности и энергетики Российской Федерации и Министерству здравоохранения и социального развития Российской Федерации:*

2.1. Создать межведомственный координационный совет для выработки решений, направленных на государственное содействие развитию отечественной медицинской промышленности.

2.2. Совместно с Минэкономразвития России и Минфином России разработать и представить в Правительство Российской Федерации комплексный план мероприятий по повышению инвестиционной привлекательности медицинской промышленности Российской Федерации.

2.3. Совместно с Министерством образования и науки Российской Федерации разработать систему мер по совершенствованию подготовки кадров для медицинской промышленности.



2.4. Определить приоритетные инвестиционные проекты развития производств медицинской продукции на основе наукоемких, высоких технологий, обеспечивающих выпуск медицинской продукции, конкурентноспособной на внутреннем и внешнем рынках, и обеспечить их реализацию.

2.5. Разработать порядок перехода отечественных производителей лекарственных средств на организацию производства в соответствии с GMP.

3. Комитету Государственной Думы по промышленности, строительству и наукоемким технологиям:

В целях совершенствования законодательного регулирования, направленного на стимулирование производства современных эффективных наукоемких лекарственных средств создать с Комитетом Государственной Думы по охране здоровья и Комитетом Государственной Думы по науке и образованию рабочую группу для координации законопроектной деятельности в области регулирования фармацевтической промышленности.

26–28 июня 2007 года в Кирове прошла Международная конференция «Биотехнология как научно-практический приоритет развития Кировской области». Присутствовали специалисты из Кировской области, а также других регионов России. Были гости из США. Состоялись два пленарных заседания, симпозиум и три круглых стола, на которых были обсуждены вопросы медицинской и сельскохозяйственной биотехнологии, подготовки кадров, международного сотрудничества. Участникам были представлены приоритетные региональные, федеральные и международные проекты Кировской области по биоиндустрии и агrobiотехнологии.

## НОВОСТИ НАУКИ И ПРАКТИКИ

### Расшифровка генома Дж. Уотсона

Компании 454 Life Sciences и BSM Human Genome Sequencing Center расшифровали геном Джеймса Уотсона, первооткрывателя структуры молекулы ДНК (совместно с покойным Френсисом Криком) и вручили ему DVD-диск с записью этой информации. Компания 454 Life Sciences проводила секвенирование с помощью полимеразной цепной реакции, а Центр по секвенированию генома человека BSM отвечал за контроль качества работы и выявление в полученном массиве информации генов с известной функцией, ответственных за различные патологические состояния.

В геноме 79-летнего ученого обнаружен ряд отклонений, в частности, известная мутация, вызывающая рак кожи. Уотсон приветствовал работу этих фирм и намерен передать полученную информацию для открытой публикации в Интернете, в базе данных GenBank. Обе компании сделали подарок в честь признания его вклада в молекулярную генетику. Работа по расшифровке генома Дж. Уотсона заняла 2 месяца и обошлась в 1 млн. долларов. Для сравнения: для первой расшифровки генома *Homo sapiens* потребовалось 13 лет (1990–2003 гг.), в ней участвовали государственные и частные научные центры; на эти исследования было истрачено 400 млн. долларов.

Сообщение Science Daily. См. информацию: <http://lenta.ru/news/2007/06/01/watson/index.htm>

## ПУБЛИКАЦИИ

*Fox C. Cell to cells: the global race to capture and control the stem cell. — W.W. Norton & Co Inc., 2007. — 512 p.*

В книге рассказывается о состоянии проблемы стволовых клеток в мире, о конкурентных отношениях между лабораториями и компаниями, занимающимися этими исследованиями. Освещен также вопрос о борьбе разных общественных позиций и об ограничениях со стороны федерального законодательства в США.

*Wellons H.B., Ewing E.S. Biotechnology and the law. — American Bar Association, 2007. — 921 p.*

Книга предназначена для юристов, занимающихся вопросами создания, маркетинга и поддержки бизнеса в сфере биотехнологии. Акцент сделан на практическую сторону дела. Подчеркивается, что правоприменительная работа в области биотехнологии имеет свои специфические особенности, нередко не укладывающиеся в традиционные юридические нормы, хорошо отработанные в обычном бизнесе.

## ПРЕДСТОЯЩИЕ МЕРОПРИЯТИЯ 2007 ГОДА

**16–19 сентября 2007 года** в Барселоне (Испания) состоится XIII Европейский конгресс по биотехнологии. Конгресс проводится под эгидой Европейской федерации биотехнологов (ЕФБ) начиная с 1978 г. Президент Конгресса – вице-президент ЕФБ, профессор Бриан Ф.С. Кларк (Дания). В оргкомитете – президент ЕФБ профессор Марк ван Монтегю (Бельгия), вице-президент ЕФБ, профессор Чарли Брайс (Великобритания), профессор Францеск Годия (Испания), доктор Федерико Майор Сарагоса (Испания) и др. Центральная тема Конгресса, вынесенная в название – «Symbiosis. Science, Industry & Society». Среди других обсуждаемых проблем: промышленная биотехнология, здоровье и медицина, зеленая биотехнология, функциональная геномика и системная биология. Справки на сайте: [www.ec13eu](http://www.ec13eu).

**29 октября – 2 ноября 2007 года** в Пушкино Московской области организуется 11-я Международная Пушкинская школа-конференция молодых ученых

«Биология – наука XXI века». Мероприятие проводится Пушкинским научным центром РАН, Советом молодых ученых ПНЦ РАН, Институтом биофизики РАН, Администрацией г. Пушкино, Пушкинским государственным университетом. Основные направления: молекулярная биология; общая и функциональная биохимия; биофизика клетки, органов и систем; физиология животных и биомедицина; математические проблемы биологии; прикладная биотехнология; социокультурная ниша биологии; биология и экология микроорганизмов; почвоведение и биогеохимия; экология животных и растений. Контакты: 142290 Пушкино Московской области, Институтский пр., 2, ИБК РАН. E-mail: [orgcom@biology21.ru](mailto:orgcom@biology21.ru).

**5–8 ноября 2007 года** в Амстердаме пройдет конференция World Ethanol 2007. На ней планируется проанализировать достижения в области производства этанола за последние 10 лет, включая аспекты биотоплива. Справки на сайте: <http://www.agra-net.com/>.

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 рубрикаций, 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.

## ВНИМАНИЮ ЧИТАТЕЛЕЙ

### Замеченные опечатки

В номере 1 тома 3 за 2007 год в статье Назиповой Н.Н. и др. «Математическое моделирование метаболизма живой растущей клетки методом баланса стационарных метаболических потоков» замечены следующие опечатки:

1. На стр. 8 правильное написание формулы следующее: 
$$\sum_{i=1}^n S_{ij}v_i = F_j, j = 1, 2, \dots, m,$$

2. На стр. 9 (внизу) блок из трех формул правильно выглядит так:

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

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

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

3. На стр. 10 (вверху) первый абзац следует читать следующим образом:

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.

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

ISSN 1996-4741



9 771996 474779 >

Подписано к печати 30.06.07  
Формат 60/90<sup>1</sup>/<sub>8</sub>. Бумага офсетная № 1.  
Печать офсетная. Гарнитура Академия.  
Печ. л. 5,0. Тираж 1000 экз.



## 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.

Основой организационной деятельности 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*