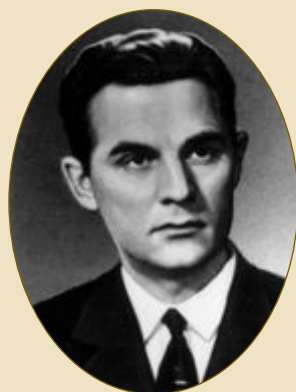


· БЕЛОЗЕРСКИЙ · ТОДД · СЕНГЕР · ОЧОА ·

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

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

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



Т. 7, № 1
2011

· СМИТ · ГИЛБЕРТ · БЕРГ · ЭНГЕЛЬГАРДТ ·

2011, Т. 7, № 1

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

Научно-практический журнал

Основан в 2005 году

Главный редактор

Р.Г. Василев

Редакционная коллегия

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

Редакционный совет

В.А. Быков (Москва), В.Г. Дебабов (Москва), С.Х. Дегтярев (Новосибирск),
В.В. Зверев (Москва), В.Т. Иванов (Москва), Л.В. Калакуцкий (Пушино),
М.П. Кирпичников (Москва), О.И. Киселев (Санкт-Петербург), А.И. Мирошников (Москва),
Т.В. Овчинникова (Москва), О.Н. Озолинь (Пушино), А.Н. Панин (Москва),
В.О. Попов (Москва), К.Г. Скрябин (Москва), Р.М. Хаитов (Москва),
В.И. Швець (Москва), Н.К. Янковский (Москва)

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

Зав. редакцией О.В. Воробьева

Адрес: 119071 Москва, Ленинский пр-т, 33

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.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: raifvasilov@biorosinfo.ru

Издается при поддержке

Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

ISSN 1996-4741

© Информационно-аналитический центр
медико-социальных проблем, 2011.

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

К читателям. *Р.Г. Василев* 4

Оригинальные статьи

Каталитическая активность ферментов, применяемых в иммуноанализе — оценка с помощью рН-чувствительного полевого транзистора.
Ю.В. Плеханова, А.Н. Решетилов 5

Новая метил-зависимая сайт-специфическая эндонуклеаза KroI узнает и расщепляет последовательность ДНК 5'-G⁺C(5mC)GGC-3'.
В.А. Чернухин, Е.В. Килева, Ю.Э. Томилова, А.А. Болтенгаген, В.С. Дедков, Н.А. Михненко, Д.А. Гончар, Л.Н. Голикова, С.Х. Дегтярев 14

Изменение активности пероксидаз и генерации супероксидного радикала, пероксида водорода в апопластном компартменте проростков пшеницы в процессе деэтиоляции.
М.В. Томилин, Л.Н. Олюнина, В.С. Сухов, А.А. Брилкина, А.П. Веселов 21

Обзоры

Биологические ресурсные центры: современное состояние в России и мире, проблемы организации, перспективы развития.
Л.В. Калакуцкий, С.М. Озерская 28

Термохимическая конверсия, газификация и сжижение лигноцеллюлозной биомассы.
В.В. Мясоедова 41

Сырьевое обеспечение производства товаров на основе морских биотехнологий.
А.В. Агеев 49

Перспективы применения *Bacillus coagulans* в ветеринарии и зоотехнии.
В.Н. Афонюшкин, Т.В. Плотникова, А.Е. Денисенко 61

Страницы истории

Юбилейные и знаменательные даты 2011 года 65

Хроника

События первой половины 2011 года 70

Информация

Предстоящие мероприятия 2011 года 74

Правила для авторов 78

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. *R.G. Vasilov* 4

Original articles

Catalytic activity of enzymes used in immunoassay – evaluation by pH-sensitive field-effect transistor.
Yu.V. Plekhanova, A.N. Reshetilov 5

A new methyl-directed site-specific endonuclease KroI recognizes and cuts DNA sequence 5'-G⁺C(5mC)GGC-3'.
V.A. Chernukhin, E.V. Kileva, Ju.E. Tomilova, A.A. Boltengagen, V.S. Dedkov, N.A. Mikhnenkova, D.A. Gonchar, L.N. Golikova, S.Kh. Degtyarev 14

Changes in peroxidase activity, superoxide radical and peroxide hydrogen generation in the wheat seedlings apoplastic compartment during the de-etiolation.
M.V. Tomilin, L.N. Olyunina, V.S. Suhov, A.A. Brilkina, A.P. Veselov 21

Reviews

Biological resource centres: current status in Russia and the world, problems of organization, development prospects.
L.V. Kalakutsky, S.M. Ozerskaya 28

Thermochemical conversion, gasification and liquefaction of lignocellulosic biomass.
V.V. Myasoedova 41

Feedstock supply to manufacture products based on marine biotechnology.
A.V. Ageev 49

Prospects of application of *Bacillus coagulans* in the veterinary and zootechnics.
V.N. Afonyushkin, T.V. Plotnikova, A.E. Denisenko 61

Pages of history

Anniversary and significant dates 2011 65

The chronicle

Events of the first half-year 2011 70

The information

Forthcoming actions 2011 74

Rules for authors 78

К читателям

В первом номере 7-го тома нашего журнала помещен ряд содержательных, интересных работ. Профессор А.Н. Решетиллов с соавт. из Пушкино представил данные о методических возможностях биосенсоров для определения каталитической активности ферментов, используемых в иммуноанализе.

Постоянные авторы журнала из Новосибирска (СибЭнзим) сообщают о своих новых находках в области изучения рестриктаз. На этот раз их работа посвящена новой метил-зависимой сайт-специфической эндонуклеазе KfoI.

Группа сотрудников Нижегородского университета приводит материалы об участии внеклеточных пероксидаз в модификации уровня про-/антиоксидантов проростков пшеницы в процессе деэтиляции.

Тема биотоплива освещается в сообщении В.В. Мясоедовой: в нем компактно и профессионально преподнесены сведения о термохимической конверсии, газификации и сжижении лигноцеллюлозной биомассы.

Крайне важный вопрос поднимается в аналитическом исследовании Л.В. Калакуцкого и С.М. Озерской — о потенциальных возможностях создания современных биоресурсных центров в нашей стране, что является фундаментом для формирования биотехнологических производств по мировым стандартам.

Актуальная проблема развития отечественной морской биотехнологии обсуждается в обзорной статье А.В. Агеева.

В кратком обзоре В.Н. Афонюшкина с соавт. (Новосибирск) сообщается о перспективах применения *Bacillus coagulans* в ветеринарии и зоотехнии.

По традиции в первом номере каждого тома приводится список знаменательных и юбилейных дат — публикуется соответствующая подборка и на 2011 год.

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

КАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ В ИММУНОАНАЛИЗЕ – ОЦЕНКА С ПОМОЩЬЮ рН-ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ПОЛЕВОГО ТРАНЗИСТОРА

Ю.В. ПЛЕХАНОВА, А.Н. РЕШЕТИЛОВ*

УРАН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино

Проведена сравнительная оценка активности ферментов, наиболее часто используемых в качестве меток в иммуноферментном анализе: глюкозооксидазы, уреазы, пероксидазы хрена. Активность фермента измеряли с помощью электрохимического потенциометрического преобразователя сигнала — рН-чувствительного полевого транзистора. Оценку активности ферментов осуществили в свободном и связанном состояниях. Установили диапазоны концентраций ферментов, которые можно определить с помощью полевого транзистора. Пероксидаза хрена зарекомендовала себя как наиболее подходящий фермент для иммуносенсоров потенциометрического типа: минимальные определяемые концентрации в гомогенных условиях и в иммобилизованном состоянии составили 3×10^{-5} ед./мл ($6,2 \times 10^{-13}$ М) и 1×10^{-4} ед./мм² (0,09 нг/мм²), соответственно. Исследовали разные типы мембран с точки зрения их проницаемости для субстратов ферментов и установили тип мембран, наиболее подходящий для создания потенциометрических биосенсоров на основе рН-чувствительного полевого транзистора.

Ключевые слова: пероксидаза хрена, глюкозооксидаза, уреазы, рН-чувствительный полевой транзистор.

Развитие промышленности, медицины, сельского хозяйства и других отраслей производства требует разработки надежных методов качественного и количественного анализа присутствия различных веществ в образцах воды, почвы, крови и других физиологических жидкостях, продуктах питания и т.д. [2, 19]. Большинство анализов сегодня выполняется в крупных стационарных лабораториях из-за необходимости определенного оборудования и высококвалифицированного технического персонала. Как правило, ценность таких методов повышается, если имеется возможность выполнять анализ непосредственно на месте отбора образцов. Вследствие этого широкое применение получают биосенсоры, обладающие малыми размерами, быстротой получения результатов и надежностью [4, 20]. Области применения таких биосенсоров — клиническая диагностика, анализ пищи и биопроцессов, мониторинг окружающей среды. Биосенсорная техника характеризуется высокой чувствительностью и специфич-

ностью анализа, упрощенными методиками подготовки и измерения образцов. Биосенсоры позволяют определять широкий спектр соединений в сложных образцах (кровь, плазма, моча или пища) с минимальной предобработкой анализируемого материала [13, 18]. Особое значение приобретают биосенсоры, в основе которых лежит высокочувствительный и специфичный иммуноферментный анализ (ИФА) [14, 17]. Суть его состоит в использовании ферментов в качестве метки антител или антигенов и измерении ферментативной активности как своеобразного усилителя анализируемой реакции. Высокая чувствительность ИФА, позволяющего определять до 10^{-11} – 10^{-12} М анализируемого вещества в исследуемой жидкости, объясняется высокой активностью ферментов. При выборе фермента учитываются такие факторы, как специфичность, каталитическая активность фермента, доступность, стабильность и т.д. Кроме того, выбор ферментной метки определяется системой регистрации активности фермента. Особый интерес вызывают потенциометрические сенсоры. Такие сенсоры сохраняют все преимущества твердофазного ИФА и дают возможность существенно упростить и ускорить процедуру анализа [5, 9, 25]. Кроме того, потенциометрические сенсоры позволяют осуществлять анализ в мутных средах, что проблематично, например, с помощью оптических сенсоров. Известны модели иммунобиосенсоров потенциометрического типа, основанные на рН-чувствительных транзисторах (ПТ) и светоадре-

© 2011 г. Решетиллов А.Н.

* **Автор для переписки:**

Решетиллов Анатолий Николаевич, д.х.н., профессор, заведующий лабораторией биосенсоров УРАН Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН 142290 Московская обл., г. Пущино, проспект Науки, 5
Тел.: (9467) 73-16-66
Факс: (495) 956-33-70
E-mail: anatol@ibpm.pushchino.ru

суемых сенсорах, в которых применяются ферментные метки, катализирующие образование электрохимически активного продукта, сопровождающееся ΔpH [8, 10, 21, 24]. Ферменты, используемые в качестве меток в иммуносенсорном анализе на основе ПТ, должны обеспечивать максимальное изменение pH в ходе реакции и максимальную начальную скорость реакции, что необходимо для уменьшения времени анализа. Наиболее распространенными ферментными метками для биосенсоров являются глюкозооксидаза (ГО) и уреазы [6, 7, 12, 23]. Вместе с тем известно, что окисление некоторых субстратов пероксидазы хрена (ПХ) может также приводить к генерации значительных сдвигов pH [15]. В этой связи представляется важным оценить относительную эффективность ферментных меток различных типов, включая ПХ.

В настоящее время наиболее распространены твердофазные методы иммуноферментного анализа, в которых антиген или антитело находится в иммобилизованном состоянии. Такие методы позволяют существенно упростить проведение анализа и уменьшить фоновый сигнал. Поэтому важным оказывается выбор носителя для иммобилизации иммунокомпонентов. При работе с полевым транзистором необходимо, чтобы используемый носитель не затруднял прохождение электронов из среды реакции непосредственно к затворной области транзистора и начальная скорость реакции была бы максимальной.

Целью настоящей работы являлось экспериментальное изучение активности уреазы, глюкозооксидазы и пероксидазы хрена, используемых в качестве ферментных меток в иммуноанализе, с помощью pH -чувствительного полевого транзистора. Оценку активности каждого фермента производили в гомогенных условиях и в иммобилизованном состоянии на разных типах мембран. Основным критерием оценки эффективности метки являлся сдвиг pH в ходе реакции и начальная скорость переработки субстрата.

Материалы и методы

В работе использовали следующие ферменты: глюкозооксидазу (КФ 1.1.3.4) из *Aspergillus niger* (активность 150 ед./мг), пероксидазу (КФ 1.11.1.7) хрена (активность 1100 ед./мг), уреазу (КФ 3.5.1.5) из *Canavalia ensiformis* (Jack bean) (активность 5 ед./мг) (все из ICN, США). В качестве субстратов ферментов применяли о-фенилендиамин и аскорбиновую кислоту (Sigma, США); пероксид водорода, мочевины и глюкозу (Химреактив, Россия).

В работе использовали хроматографическую стеклобумагу GF/A (Whatman, Великобритания), капроновую мембрану PALL (Pall, размер пор 0,45 мкм) и следующие типы нитроцеллюлозных мембран: Hybond-N, Hybond-N+, Hybond-C (Amersham, Великобритания, размер пор 0,45 мкм); Millipore (Sigma, США, размер пор 0,22 мкм); Владипор (Полимерсинтез, размер пор 0,45 мкм), Biodyne A, Biodyne C, Ultrabind (Pall-Gelman, США, размер пор 0,45 мкм); MFS (Advantec, США, размер пор 0,45 мкм), BIO-RAD (Bio-Rad, США, размер пор 0,45 мкм), S&S (Schleicher & Schuell, Aldrich, США, размер пор 0,2 мкм).

Измерительная система. В качестве измерительной системы использовали pH -чувствительные полевые транзисторы, изготовленные на основе кремниевых пластин с двухслойным затворным диэлектриком $SiO_2-Ta_2O_5$ в НПО «Позитрон», г. Санкт-Петербург. pH -чувствительность транзисторов составляла не менее 50–55 мВ/ pH . Регистрацию сигналов производили в режиме фиксированного потенциала смещения [16, 22].

Измерения проводили в стеклянной кювете объемом 2 мл при постоянном перемешивании в 0,1 М фосфатном буфере, pH 6,4.

Оценка мембран по скорости диффузии через них вещества. Фрагменты мембран помещали на затворную область транзистора, регистрировали базовый уровень сигнала, добавляли 10 мкл 0,1 М HCl (конечная концентрация в кювете 0,5 мМ) и регистрировали параметр $t_{90\%}$ (время достижения сигналом 90% от стационарного значения) и скорость изменения сигнала, коррелирующие со скоростью диффузии протонов в данном материале.

Иммобилизация ферментов. На фрагменты мембран диаметром 6 мм (площадь мембраны 28,26 мм²) наносили 50 мкл раствора фермента и 10 минут подсушивали на воздухе. Затем мембрану с сорбированным ферментом промывали раствором буфера и помещали на затворную область ПТ для проведения измерений.

Оценка активности ферментов с помощью ПТ. Регистрацию сигналов производили в режиме фиксированного потенциала смещения. Детекция активности ПХ основывалась на изменении pH при пероксидазном окислении о-фенилендиамина в присутствии аскорбиновой кислоты и пероксида водорода; детекция активности ГО — на изменении pH в результате окисления глюкозы; детекция активности уреазы — на изменении pH в результате трансформации мочевины. Регистрируемым параметром являлась начальная скорость изменения

рН затворной зоны транзистора. Концентрации всех субстратов варьировались.

Измерение активности ПХ в гомогенном состоянии. В кювету вносили 2 мл раствора пероксидазы хрена, затем добавляли 10 мкл аскорбиновой кислоты и 10 мкл о-фенилендиамина, регистрировали базовый уровень сигнала. Реакцию инициировали добавлением 10 мкл пероксида водорода [15, с модификациями]. Изменение сигнала регистрировали.

Измерение активности ГО и уреазы в гомогенном состоянии. В кювету вносили 2 мл раствора фермента (глюкозооксидаза или уреазы), регистрировали базовый уровень сигнала. Вносили 20 мкл субстрата фермента (глюкоза или мочевины, соответственно) и регистрировали изменение сигнала.

Регистрация активности ферментов в иммобилизованном состоянии. Мембрану с иммобилизованным ферментом помещали на затвор транзистора. Далее поступали так же, как при измерении активности ферментов в гомогенном состоянии (описано выше).

Результаты и обсуждение

Выбор оптимальных концентраций субстратов для ферментов. Для получения максимальных сигналов сенсора необходимо было оптимизировать концентрации субстратов используемых ферментов. Уреазы разлагает мочевины до NH_3 и CO_2 . Эти два продукта изменяют рН в противоположных направлениях, но образование NH_4OH влияет на рН более сильно, чем образование угольной кислоты H_2CO_3 ; в результате рН на поверхности затвора возрастает. Биокаталитическое окисление глюкозы под действием глюкозооксидазы до глюконовой кислоты с сопутствующим образованием H_2O_2 освобождает протоны в раствор электролита, приводя к увеличению кислотности (подкислению) поверхности затвора. Были построены зависимости сигналов полевого транзистора от концентрации глюкозы и мочевины при использовании фиксированной концентрации глюкозооксидазы и уреазы в кювете, соответственно.

На рисунке 1 показана калибровочная зависимость сигналов транзистора при концентрации глюкозооксидазы, равной 280 ед./мл (10^{-5} М, или 1,86 мг/мл), от концентрации глюкозы в растворе. Похожая зависимость сигналов транзистора от концентрации мочевины получена при содержании уреазы в кювете — 2,4 ед./мл (10^{-6} М, или 0,48 мг/мл). Концентрация субстрата, при которой скорость данной ферментативной реакции равна половине максимальной, составила для глюкозооксидазы

— 0,9 мМ, для уреазы — 4 мМ. Константы Михаэлиса для этих реакций составили для глюкозооксидазы — 2,8 мМ, для уреазы — 2,5 мМ.

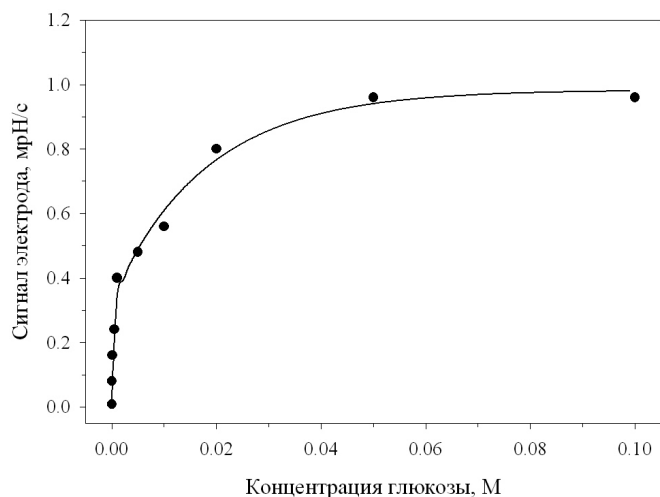


Рис. 1. Зависимость сигналов полевого транзистора от концентрации глюкозы в растворе. Концентрация глюкозооксидазы в кювете составляла 280 ед./мл

Получены подобные зависимости сигналов сенсоров на основе иммобилизованной на мембране Hубond уреазы и глюкозооксидазы от концентрации мочевины и глюкозы, соответственно. Концентрация уреазы на мембране составляла 0,5 мкг/мм² ($2,5 \times 10^{-3}$ ед./мм²), концентрация глюкозооксидазы составляла 0,2 мкг/мм² (0,03 ед./мм²). Концентрация субстрата, при которой скорость данной ферментативной реакции равна половине максимальной, составила для уреазы 3 мМ, для глюкозооксидазы — 2 мМ. При высоких концентрациях субстрата скорость реакции максимальна, становится постоянной и не зависящей от концентрации субстрата. В этом случае реакция целиком определяется концентрацией фермента. Поэтому в дальнейших экспериментах использовали следующие концентрации субстратов: 10^{-2} М мочевины, 5×10^{-2} М глюкозы.

Пероксидаза катализирует двухсубстратные реакции с участием пероксида водорода (реже органических гидроперекисей). Фермент обладает широкой специфичностью по второму субстрату и способен окислять замещенные фенолы, анилины, о-фенилендиамины, о-дианизидин, люминол, п-аминобензойную кислоту и целый ряд других органических и неорганических соединений [1]. Окисление субстратов может вызывать изменение рН как в кислотную, так и в щелочную области, в зависимости от субстрата. Известно, что комбинирование нескольких субстратов может вести

к увеличению пероксидазной активности [11]. Ранее было проведено изучение эффективности некоторых субстратов ряда анилинов и фенолов для рН-детекции пероксидазной активности [3]. Наибольшие значения начальных скоростей смещения рН наблюдали для анилинов и фенолов с электронодонорными заместителями, для которых характерны высокие скорости пероксидазного окисления.

Низкая общая скорость пероксидазного окисления делает невозможным использование ряда субстратов для определения ПХ на основе смещения рН. Однако лимитирующее влияние кинетического фактора можно преодолеть при использовании пероксидазных субстратов-усилителей. Наибольшие величины откликов ПТ наблюдались для систем люминол — п-иодфенол и о-фенилендиамин (ОФД) — аскорбиновая кислота [3]. Начальная скорость пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты невысока, что не позволяет использовать ее как единственный субстрат для определения ПХ с помощью рН-чувствительного ПТ.

Скорость этого процесса при участии ОФД, используемого в качестве электронного медиатора, существенно повышается и сопровождается значительным сдвигом рН в щелочную область. Этот эффект был применен для регистрации пероксидазной активности с использованием ПТ в качестве преобразователя сенсора с трехкомпонентной субстратной смесью, содержащей о-фенилендиамин, аскорбиновую кислоту и пероксид водорода.

На рисунке 2 показана зависимость сигналов полевого транзистора от концентрации ОФД и аскорбиновой кислоты при фиксированной концентрации пероксида водорода (10^{-3} М), содержание пероксидазы хрена в кювете составляло 0,4 ед./мл (10^{-8} М или 0,4 мкг/мл). На рисунке 3 показана зависимость сигналов транзистора от концентрации пероксида водорода при фиксированных концентрациях ОФД (10^{-3} М) и аскорбиновой кислоты (10^{-3} М).

Подобные зависимости были получены для иммобилизованной на мембране Нубонд пероксидазы хрена ($0,03$ нг/мм² — $3,3 \times 10^{-5}$ ед./мм²). Для всех субстратных компонентов как для фермента в растворе, так и для иммобилизованного фермента увеличение концентраций субстратов в диапазоне 10^{-4} — 10^{-3} М ведет к возрастанию сигнала сенсора. Для диапазона 10^{-3} — 10^{-2} М увеличение концентраций аскорбиновой кислоты и ОФД приводит к снижению сигнала. В то же время увеличение концентраций H_2O_2 в этом диапазоне коррелирует с дальнейшим увеличением сигнала сенсора.

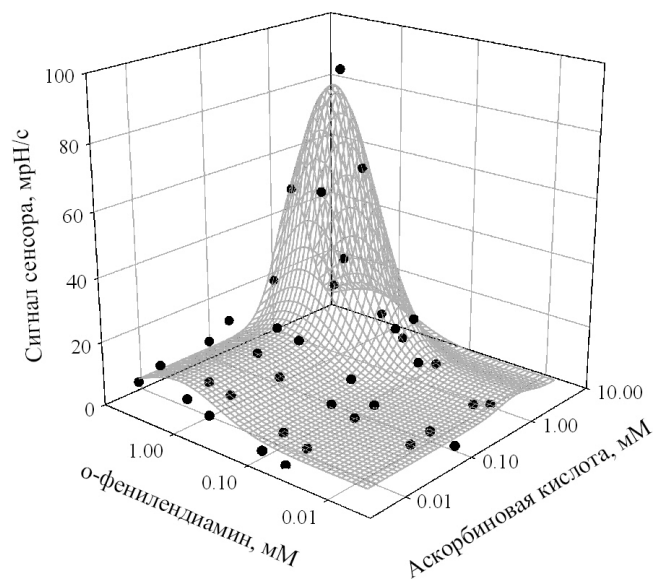


Рис. 2. Зависимость сигналов транзистора от концентрации о-фенилендиамина и аскорбиновой кислоты в растворе. Концентрация пероксида водорода — 10^{-3} М. Содержание пероксидазы хрена в кювете составляло 0,4 ед./мл

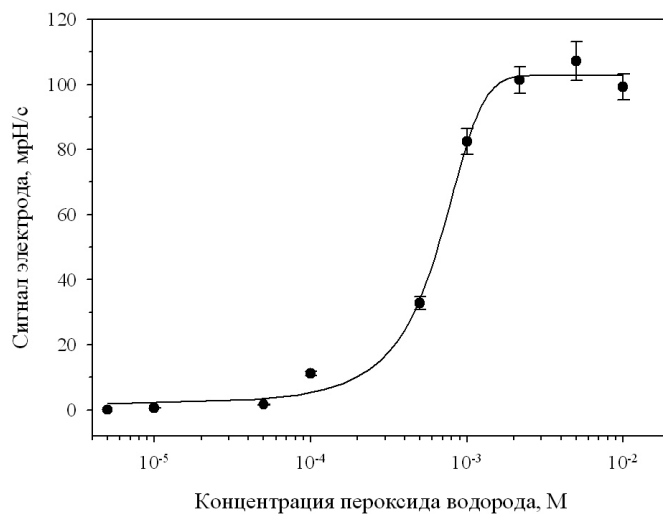


Рис. 3. Зависимость сигналов транзистора от концентрации пероксида водорода. Содержание ОФД и аскорбиновой кислоты составляло по 10^{-3} М. Концентрация пероксидазы хрена в кювете — 0,4 ед./мл

Полученные зависимости позволяют определить оптимальную субстратную смесь для детекции фермента пероксидаза хрена в дальнейших исследованиях: ОФД — 1 мМ, аскорбиновая кислота — 1 мМ; пероксид водорода 3—5 мМ.

Оценка активности ферментов в гомогенном состоянии. Концентрацию ферментов варьировали в диапазоне 10^{-14} — 10^{-4} М. Использовали выбранные

выше оптимальные концентрации субстратов для получения максимальных сигналов сенсора. В таблице 1 показаны основные характеристики, полученные для ферментов. Области линейности, уравнения регрессии и соответствующие коэффициенты вариации вычислены с помощью программы Microsoft Office Excel 2003.

Оценка диффузионной проницаемости разных типов матриц с помощью ПТ. Физико-химические параметры мембран: размер пор, структура, ионообменные

и, в частности, протон-связывающие свойства — влияют на скорость диффузии продуктов окисления субстратов иммобилизованной пероксидазой. В свою очередь, скорость диффузии определяет время сенсорного измерения. Таким образом, крайне важной является сравнительная характеристика диффузионной проницаемости различных мембран.

Время ответа транзистора без мембраны на введение соляной кислоты не превышало нескольких секунд

Таблица 1

Некоторые характеристики ферментов в растворе, полученные с помощью рН-чувствительного полевого транзистора

Характеристики ферментов	Пероксидаза хрена	Уреаза	Глюкозооксидаза
Линейный диапазон концентраций, ед./мл (М)	$4 \times 10^{-5} - 0,05$ ($8,3 \times 10^{-13} - 1 \times 10^{-9}$)	0,3–2,4 ($1,25 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-6}$)	30–1400 ($1 \times 10^{-6} - 5 \times 10^{-5}$)
Уравнение регрессии	$y = 0,763x + 0,0027$	$y = 0,0143x + 0,0016$	$y = 1 \times 10^{-6}x + 0,0011$
Коэффициент корреляции	0,99	0,96	0,99
Коэффициент чувствительности	1,01 (рН/с)/(ед./мл)	0,02 (рН/с)/(ед./мл)	$3,23 \times 10^{-6}$ (мрН/с)/(ед./мл)
Минимальный предел обнаружения, ед./мл (М)	3×10^{-5} ($6,2 \times 10^{-13}$)	0,12 (5×10^{-8})	14 (5×10^{-7})

(скорость изменения сигнала составляла 16,7 мВ/с). На рисунке 4 изображены характерные виды сигналов чистого транзистора и транзистора с некоторыми мембранами на введение кислоты в кювету.

Установленные в результате этих экспериментов величины $t_{90\%}$ и максимальной скорости изменения тока (V_0) для девяти типов мембран приведены в таблице 2.

По возрастанию диффузионной проницаемости (снижению $t_{90\%}$) мембраны располагаются в следующий ряд: Hybond-N – Hybond-N+ – PALL – BIO-RAD – GF/A – S&S – Hybond C – Владипор – MFS – Millipore.

Максимальное значение сигнала при использовании мембраны типа Millipore достигалось довольно быстро (время достижения 90% максимального ответа равно 87 с). Мембрана типа Hybond оказалась более «медленной». Время от введения вещества

до начала развития ответа было довольно большим (по сравнению с мембраной типа Millipore), а 90% максимального значения сигнала достигалось более чем через 260 с после введения кислоты. Эти результаты свидетельствуют о том, что при регистрации сигналов с помощью рН-чувствительного полевого транзистора более предпочтительно использование нитроцеллюлозных мембран типа Millipore, MFS, Владипор; они характеризуются наименьшим временем $t_{90\%}$ и обеспечивают быструю диффузию протонов к затворной области транзистора и таким образом высокую начальную скорость ответа. Указанные факторы важны для уменьшения времени анализа, а также для снижения ошибок при измерении начальной скорости ферментативной реакции, регистрируемая величина которой может быть ограничена медленной диффузией продуктов реакции через мембрану.

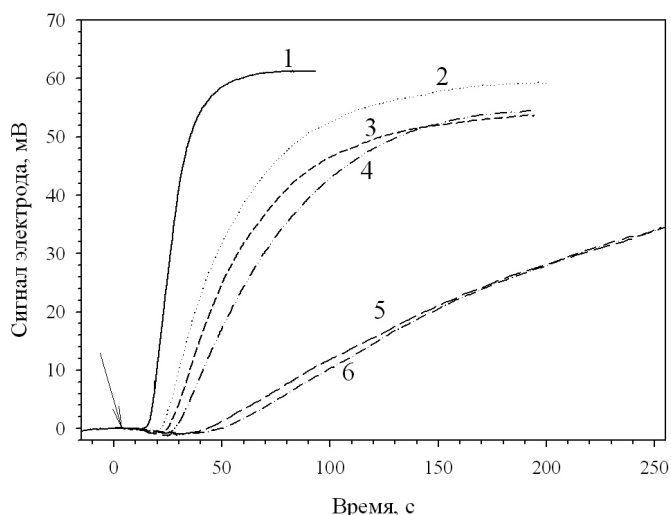


Рис. 4. Виды сигналов полевого транзистора с различными типами мембран (1 – сигнал ПТ без мембраны; 2 – Millipore; 3 – MFS; 4 – Hybond C; 5 – Hybond N; 6 – Hybond)

Оценка активности ферментов в иммобилизованном состоянии. В гетерогенных условиях фермент концентрируется около затворной области транзистора, а не во всем объеме кюветы, ферментная реакция идет в малом пространстве между преобразователем и мембраной; в результате чувствительность анализа улучшается.

В таблице 3 показаны некоторые характеристики трех ферментов, иммобилизованных на двух типах мембран – самой «быстрой» Millipore и самой «медленной» Hybond. Области линейности, уравнения регрессии и соответствующие коэффициенты вариации вычислены с помощью программы Microsoft Office Excel 2003.

Из полученных данных следует, что при оценке активности ферментов с помощью полевого транзистора

пероксидаза хрена зарекомендовала себя наилучшим образом. Минимальные определяемые концентрации составили для ПХ – 3×10^{-5} ед./мл в гомогенных условиях и в иммобилизованном состоянии 1×10^{-4} ед./мм² на мембране Millipore и $1,5 \times 10^{-4}$ ед./мм² на мембране Hybond, соответственно. В то же время подобные характеристики для уреазы составили 0,12 ед./мл, 5×10^{-4} ед./мм² (Millipore) и 7×10^{-4} ед./мм² (Hybond), а для глюкозооксидазы (ГОД) 14 ед./мл и 0,04 ед./мм² (Millipore, Hybond), соответственно), что и позволяет рекомендовать ее в качестве ферментной метки для потенциометрического иммуноанализа.

Сравнили свойства 2 мембран Millipore и Hybond с иммобилизованными ферментами. Начальная скорость сигнала при иммобилизации пероксидазы (2×10^{-3} ед./мм²) на мембрану Millipore составила 0,14 рН/с, на мембрану Hybond – 0,10 рН/с.

Подобные соотношения сигналов получены и для остальных ферментов. Начальная скорость реакции в случае уреазы (5×10^{-3} ед./мм²) для мембраны типа Millipore составляла 0,06 рН/с, для мембраны типа Hybond 0,04 рН/с. Начальная скорость реакции в случае ГОД ($2,5$ ед.г/мм²) для мембраны типа Millipore составляла 2 мрН/с, для мембраны типа Hybond 1,7 мрН/с.

Таким образом, мембраны с иммобилизованным ферментом обладают теми же свойствами, что и без фермента; иммобилизация фермента не изменяет кинетику развития сигнала. Мембрана типа Millipore более проницаема для вводимого вещества и обладает более быстрыми временами развития сигнала, что дает возможность рекомендовать ее при работе с рН-чувствительным ПТ.

Таблица 2

Диффузионные свойства мембран

Показатели	Millipore	MFS	Владипор	Hybond C	S&S	GF/A	BIO-RAD	PALL	Hybond-N+	Hybond-N
$t_{90\%}$, с	87	98	100	112	170	>200	230	250	>260	>260
V_0 , мВ/с	1,35	0,96	1,10	0,77	0,62	0,27	0,30	0,46	0,19	0,19

Некоторые характеристики ферментов, иммобилизованных на двух типах мембран, полученные с помощью рН-чувствительного полевого транзистора

Фермент	Характеристика	Тип мембраны	
		Millipore	Hybond
Пероксидаза хрена	Линейный диапазон концентраций, ед./мм ² (нг/мм ²)	$1,5 \times 10^{-4} - 24 \times 10^{-4}$ (0,14–2,18)	$1,5 \times 10^{-4} - 50 \times 10^{-4}$ (0,14–4,55)
	Уравнение регрессии	$y = 19,55x + 0,0039$	$y = 20,709x - 0,0011$
	Коэффициент корреляции	0,99	0,99
	Чувствительность, (рН/с)/(ед./мм ²)	29,198	34,680
	Минимальный предел обнаружения, ед./мм ² (нг/мм ²)	1×10^{-4} (0,09)	$1,5 \times 10^{-4}$ (0,14)
Уреаза	Линейный диапазон концентраций, ед./мм ² (мкг/мм ²)	$7 \times 10^{-4} - 53 \times 10^{-4}$ (0,14–1,06)	$7 \times 10^{-4} - 53 \times 10^{-4}$ (0,14–1,06)
	Уравнение регрессии	$y = 6,9903x - 0,002$	$y = 0,9124x - 0,0002$
	Коэффициент корреляции	0,97	0,97
	Чувствительность, (рН/с)/(ед./мм ²)	6,888	2,427
	Минимальный предел обнаружения, ед./мм ² (мкг/мм ²)	5×10^{-4} (0,10)	7×10^{-4} (0,14)
Глюкозооксидаза	Линейный диапазон концентраций, ед./мм ² (мкг/мм ²)	0,3–2,5 (2–16,7)	0,08–1,2 (0,5–8)
	Уравнение регрессии	$y = 0,0004x + 0,0011$	$y = 0,0007x + 0,0005$
	Коэффициент корреляции	0,99	0,99
	Чувствительность, (мрН/с)/(ед./мм ²)	0,005	0,003
	Минимальный предел обнаружения, ед./мм ² (мкг/мм ²)	0,04 (0,27)	0,04 (0,27)

Заключение

С помощью потенциометрического преобразователя сигнала биосенсора выполнен сравнительный анализ 3 ферментов, наиболее часто используемых в иммуоферментном анализе. Определены минимальные определяемые концентрации ферментов в гомогенных и гетерогенных условиях. Установлено, что для фермента пероксидазы хрена с помощью рН-чувствительного полевого транзистора возможно определение значительно более низких концентраций, чем для ферментов уреазы и

глюкозооксидазы, как в гомогенных условиях, так и при сорбции фермента на мембрану. Выполнен сравнительный анализ ряда мембран. Более быстрые ответы сенсора получены при использовании нитроцеллюлозной мембраны Millipore для всех ферментов. Таким образом, при создании иммуосенсоров на основе рН-чувствительных полевых транзисторов можно рекомендовать нитроцеллюлозные мембраны типа Millipore и ферменты пероксидазу хрена и уреазу как обеспечивающие наибольшее смещение рН в ходе реакции и максимальную начальную скорость окисления субстрата.

Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК 16.740.11.0020, ГК 14.740.11.0370) и гранта РФФИ №10-07-00712-а.

Литература

- Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. — М.: Высш.шк. — 1991. — 288 с.
- Тертон М., Бангхем Д.Р., Колкотт К.А. Новые методы иммуноанализа: Пер. с англ. — М.: Мир. — 1991. — 280 с.
- Хомутов С.М., Решетиллов А.Н., Гаврилова Е.М., Егоров А.М. Изучение эффективности некоторых субстратов для рН-детекции пероксидазной активности // Журнал аналитической химии. — 1995. — Т. 50. — № 6. — С. 659–662.
- Bartic C., Borghs G. Organic thin-film transistors as transducers for (bio)analytical applications // Anal. Bioanal. Chem. — 2006. — Vol. 384. — N 2. — P. 354–365.
- Berggren C., Johansson G. Capacitance measurements of antibody-antigen interactions in a flow system // Anal. Chem. — 1997. — Vol. 69. — P. 3651–3657.
- Colapicchioni C., Barbaro A., Porcelli F., Giannini I. Immunoenzymatic Assay Using CHEMFET Devices // Sensors and Actuators B. — 1991. — Vol. 4. — P. 245–250.
- Dill K., Bearden D.W. Detection of human asialo-alpha(1)-acid glycoprotein using a heterosandwich immunoassay in conjunction with the light addressable potentiometric sensor // Glycoconj J. — 1996. Vol. 13. — N 4. — P. 637–641.
- Gehring A.G., Patterson D.L., Tu S.I. Use of a light-addressable potentiometric sensor for the detection of Escherichia coli O157: H7 // Anal. Biochem. — 1998. — Vol. 258. — P. 293–298.
- Ghindilis A.L., Skorobogat'ko O.V., GavriloVA V.P., Yaropolov A.I. A new approach to the construction of potentiometric immunosensors // Biosens. Bioelectron. — 1992. — Vol. 7. — P. 301–304.
- Ghindilis A.L., Atanasov P., Wilkins M., Wilkins E. Immunosensors: electrochemical sensing and other engineering approaches // Biosens. Bioelectron. — 1998. — Vol. 13. — N 1. — P. 113–131.
- Goodwin, D.C., Grover, T.A., Aust, S.D. Roles of efficient substrates in enhancement of peroxidase-catalyzed oxidations // Biochemistry. — 1997. — Vol. 36. — N 1. — P. 139–147.
- Hu W.G., Thompson H.G., Alvi A.Z., Nagata L.P., Suresh M.R., Fulton R.E. Development of immunofiltration assay by light addressable potentiometric sensor with genetically biotinylated recombinant antibody for rapid identification of Venezuelan equine encephalitis virus // J. Immunol. Methods. — 2004. — Vol. 289. — N 1–2. — P. 27–35.
- Ivnitski D., Abdel-Hamid I., Atanasov P., Wilkins E. Biosensors for detection of pathogenic bacteria // Biosens. Bioelectron. — 1999. — Vol. 14. — P. 599–624.
- Jiang X., Li D., Xu X., Ying Y., Li Y., Ye Z., Wang J. Immunosensors for detection of pesticide residues // Biosens. Bioelectron. — 2008 — Vol. 23. — N 11. — P. 1577–1587.
- Khomutov S.M., Reshetilov A.N., Egorov A.M., GavriloVA E.M. Study of the efficiency of some substrates in the pH detection of peroxidase activity // J. Anal. Chem. — 1995. — Vol. 50. — N 6. — P. 599–602.
- Kuan S.S., Guilbault G.G. Ion-selective electrodes and biosensors based on ISEs / In Biosensors: fundamentals and applications. Turner A.P.F., Karube I., Wilson G.S. — Oxford University Press, New York, 1987.
- Marquette C.A., Blum L.J. State of the art and recent advances in immunoanalytical systems // Biosens. Bioelectron. — 2006. — Vol. 21. — N 8. — P. 1424–1433.
- Mehrvar M., Abdi M. Recent developments, characteristics, and potential applications of electrochemical biosensors // Anal. Sci. — 2004. — Vol. 20. — N 8. — P. 1113–1126.
- MeulenberG E.P., Mulder W.H., Stoks P.G. Immunoassay for Pesticides // Environmental Science and Technology. — 1995. — Vol. 29. — N 3. — P. 553–561.
- Palchetti I., Mascini M. Nucleic acid biosensors for environmental pollution monitoring // Analyst. — 2008. — Vol. 133. — N 7. — P. 846–854.
- Plekhanova Yu.V., Reshetilov A.N., Yazynina E.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. A New Assay Format for Electrochemical Immunosensors: Polyelectrolyte-Based Separation on Membrane Carriers Combined with Detection of Peroxidase Activity by pH-Sensitive Field-Effect Transistor // Biosens. Bioelectron. — 2003. — Vol. 19. — P. 109–114.
- Reshetilov A., Medvinsky A., Elyseyva T., Shakhbazian V., Tsyganov M., Boronin A., Ivanitsky G. pH track of expanding bacterial populations // FEMS Microbiol. Lett. — 1992. — Vol. 94. — N 1. — P. 59–62.
- Selvanayagam Z.E., Neuzil P., Gopalakrishnakone P., Sridhar U., Singh M., Ho L.C. An ISFET-based immunosensor for the detection of β -Bungarotoxin // Biosens. Bioelectron. — 2002. — Vol. 17. — N 9. — P. 821–826.
- Starodub N.F., Dzantiev B.B., Starodub V.M., Zherdev A.V. Immunosensor for the determination of the herbicide simazine based on an ion-selective field-effect transistor // Anal. Chim. Acta. — 2000. — Vol. 424. — P. 37–43.
- Wang J., Tian B., Rogers K.R. Thick-film electrochemical immunosensor based on stripping potentiometric detection of a metal ion label // Anal. Chem. — 1998. — Vol. 70. — P. 1682–1685.

Список сокращений:

ГОД — глюкозооксидаза,

ИФА — иммуноферментный анализ,

ОФД — офенилендиамин,

ПТ — рН-чувствительный полевой транзистор,

ПХ — пероксидаза хрена.

CATALYTIC ACTIVITY OF ENZYMES USED IN IMMUNOASSAY – EVALUATION BY pH-SENSITIVE FIELD-EFFECT TRANSISTOR

Yu.V. PLEKHANOVA, A.N. RESHETILOV

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

A comparative evaluation of activities of often utilized in immunoassay enzymes-labels (glucose oxidase, urease and horseradish peroxidase) was carried out. The enzyme activity was measured by an electrochemical potentiometric transducer – pH-sensitive field-effect transistor. Assessment of enzymes activities carried out in the solutions and immobilized states. The ranges of enzymes concentration which can be determined by pH-sensitive field-effect transistor were established. Horseradish peroxidase has established itself as the most suitable enzyme for the potentiometric immunosensors type (minimum detectable concentration in homogeneous conditions was 3×10^{-5} U/ml (6.2×10^{-13} M) and in the immobilized state was 1×10^{-4} U/mm² (0.09 ng/mm²). The substrate permeabilities of different types of membranes were analyzed and the most suitable membrane for creation of potentiometric biosensors was determined.

Keywords: horseradish peroxidase, glucose oxidase, urease, pH-sensitive field-effect transistor.

НОВАЯ МЕТИЛ-ЗАВИСИМАЯ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА KfoI УЗНАЕТ И РАСЩЕПЛЯЕТ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ДНК 5'-G[^]C(5mC)GGC-3'

В.А. ЧЕРНУХИН*, Е.В. КИЛЕВА, Ю.Э. ТОМИЛОВА, А.А. БОЛТЕНГАГЕН, В.С. ДЕДКОВ, Н.А. МИХНЕНКОВА, Д.А. ГОНЧАР, Л.Н. ГОЛИКОВА, С.Х. ДЕГТЯРЕВ

НПО «СибЭнзим», Новосибирск

Выделена новая метил-зависимая сайт-специфическая эндонуклеаза KfoI из *Kocuria rosea* 307, узнающая и расщепляющая метилированную последовательность ДНК 5'-G[^]C(5mC)GGC-3'/3'-CGG(5mC)C[^]G-5' и не гидролизующая неметилированную ДНК. Новый фермент расщепляет обе цепи ДНК в последовательности узнавания в случае метилирования одного или двух центральных остатков цитозина. KfoI является первой сайт-специфической метил-зависимой эндонуклеазой, узнающей невырожденную шестинуклеотидную последовательность. Благодаря своей способности расщеплять только метилированную ДНК фермент KfoI может найти практическое применение в молекулярно-биологических работах, в частности, для определения статуса метилирования ДНК эукариот.

Ключевые слова: метилзависимые сайт-специфические эндонуклеазы, метилированная ДНК.

Наиболее изученными сайт-специфическими эндонуклеазами являются эндонуклеазы рестрикции типа II (рестриктазы), которые, как правило, являются частью бактериальной системы рестрикции-модификации, содержащей еще ДНК-метилтрансферазу. Рестриктаза расщепляет чужую ДНК по определенному сайту, а ДНК-метилтрансфераза метилирует эту же последовательность в бактериальной ДНК, предотвращая таким образом ее гидролиз собственной эндонуклеазой рестрикции.

К рестриктазам близки по свойствам метилзависимые сайт-специфические эндонуклеазы, которые гидролизуют только метилированную ДНК. Первыми были обнаружены и описаны ферменты, узнающие и расщепляющие последовательность ДНК 5'-G(m6A)TC-3' [8]. Эндонуклеазы, расщепляющие 5-метилцитозин-содержащие последовательности ДНК, описаны сравнительно недавно [2–5]. Эти ферменты узнают определенные последовательности ДНК, содержащие 5-метилцитозин, не требуют кофакторов помимо ионов Mg²⁺, гидролизуют субстрат полностью и в тех же усло-

виях, что и эндонуклеазы рестрикции [10]. Вследствие этого, данные ферменты были названы метилзависимыми сайт-специфическими ДНК эндонуклеазами. К таким ферментам относится эндонуклеаза GlaI, которая узнает и расщепляет нуклеотидную последовательность 5'-Pu(5mC)[^]GPu-3'/3'-PuG[^](5mC)Pu-5' [2]. Описаны также сайт-специфические эндонуклеазы BIsI [3], BiS1 [5], и GluI [4], которые способны узнавать и расщеплять C5-метилированную нуклеотидную последовательность 5'-GCNGC-3'.

В данной работе представлена новая метилзависимая сайт-специфическая эндонуклеаза KfoI, узнающая и расщепляющая последовательность ДНК 5'-G[^]CCGGC-3'/3'-CGGCC[^]G-5', в которой метилированы один или два центральных цитозина.

Материалы и методы

Реактивы. В работе использовали следующие реактивы и компоненты питательных сред: Tris («Promega», США); акриламид, бис-акриламид, KH₂PO₄, NaHCO₃, ампициллин («Helicon», Россия); ЭДТА («Fluka AG», Швейцария), агароза («Hybaid-AGS», Германия), тритон X-100 («ICN», США), лизоцим («Serva», Германия), фенилметилсульфонилфторид (PMSF) («Sigma», США), фосфоцеллюлоза P-11 («Whatman», Великобритания), гепаринсефароза («BioRad», США), триптон, дрожжевой экстракт

© 2011 г. Чернухин В.А., Килева Е.В., Томилова Ю.Э., Болтенгаген А.А., Дедков В.С., Михненко Н.А., Гончар Д.А., Голикова Л.Н., Дегтярев С.Х.

* Автор для переписки:

Чернухин Валерий Алексеевич,
630117 Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 2/12
E-mail: valera@sibenzyme.ru

(«Organotechnie», Франция), ферменты и препараты ДНК (НПО «СибЭнзим»). Остальные реагенты — отечественного производства квалификации х.ч. Для проведения реакции гидролиза эндонуклеазой KgoI использовали SE-буфер «G» («СибЭнзим», Россия) следующего состава: 10 мМ Трис-НСl, рН 7,6; 10 мМ MgCl₂; 50 мМ NaCl; 1 мМ дитиотрейтол.

Выращивание штамма-продуцента. Выращивание штамма проводили в ферментере 1601-013 (LKB, Швеция) при температуре 30 °С в 10 л питательной среды, содержащей 1% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 0,5% NaCl и 0,05% MgCl₂, при рН 7,5 с аэрацией 10 л/мин. и перемешиванием 200 об/мин. При достижении культурой поздней логарифмической стадии роста клетки осаждали с помощью центрифугирования при 5000 об./мин. при 4 °С. В результате получали 100 г биомассы, которую хранили при -20 °С.

Выделение фермента. Все процедуры выделения фермента проводили при температуре 4 °С. 20 г замороженной биомассы суспендировали в 80 мл буфера А (10 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 0,1 мМ ЭДТА, 7 мМ β-меркаптоэтанол), содержащего 0,05 М NaCl, 0,3 мг/мл лизоцим, 0,1 мМ RMSF, и инкубировали в течение 1 ч при постоянном перемешивании. Далее клетки разрушали ультразвуком и центрифугировали в течение 30 мин. в роторе JA-20 на центрифуге «Beckman» J2-21 при 15000 об./мин.

Супернатант наносили на колонку с фосфоцеллюлозой P-11 объемом 40 мл, предварительно уравновешенную буфером А, содержащим 0,05 М NaCl. Белок элюировали линейным градиентом NaCl (0,05–1,0 М) в буфере А объемом 400 мл, собирая фракции по 10 мл. Фракции, содержащие эндонуклеазу, объединяли и наносили на колонку с гидроксипатитом объемом 4 мл, предварительно уравновешенную буфером В (0,01 М K₂HPO₄, рН 7,2, 0,1 мМ ЭДТА, 7 мМ β-меркаптоэтанол).

Колонку промывали 10 мл буфера В и проводили элюцию линейным градиентом K₂HPO₄ (0,01–0,2 М), собирая фракции объемом по 4 мл. Активные фракции объединяли и наносили на колонку с гепаринсефарозой объемом 4 мл. Элюцию проводили линейным градиентом NaCl (0,05–0,5 М) в буфере А объемом 120 мл, собирая фракции по 3 мл.

Активные фракции объединяли и диализовали против 20 объемов концентрирующего буфера (10 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 0,1 мМ ЭДТА, 7 мМ β-меркаптоэтанол, 0,05 М NaCl, 50% глицерин). Препарат хранили при -20 °С.

Конструирование плазмид. Плазида рМНраII-1 была получена путем клонирования ПЦР-фрагмента геномной ДНК *Haemophilus parainfluenzae*, длиной 1156 п.о., содержащего ген ДНК-метилтрансферазы М.НраII, в вектор рМТL22 по сайтам эндонуклеаз рестрикции PstI (перед стартовым кодоном) и XbaI (после стоп-кодона).

Для получения ПЦР-фрагмента использовали следующие праймеры:

- М.НраII_{up} (Pst): 5'-agagatacagactgcagtttatgaaagatgtg-3';
- М.НраII_{low} (XbaI): 5'-gccataatctagaccggcgtagagctcactccac-3'.

Второй праймер содержит последовательность 5'-GCCGGC-3' рядом с сайтом узнавания рестриктазы XbaI. В плазмиде рМНраII-1 присутствуют три сайта 5'-GCCGGC-3'.

Плазида рММспI-1 была получена путем клонирования ПЦР-фрагмента геномной ДНК *Moraxella species*, длиной 1341 п.о., содержащего ген М.МспI, в вектор рМТL22 по сайтам эндонуклеаз рестрикции BamHI (перед стартовым кодоном) и PstI (после стоп-кодона).

Для получения ПЦР-фрагмента использовали следующие праймеры:

- М.МспI_{up} (BamHI): 5'-agatttggatcccaaatgaaacc tgaatattg-3';
- М.МспI_{low} (PstI): 5'-gtcggactgcaggccggctaactg aatttcgtatatga-3'.

Второй праймер содержит последовательность 5'-GCCGGC-3' рядом с сайтом узнавания рестриктазы PstI. В плазмиде рММспI-1 присутствуют два сайта 5'-GCCGGC-3'.

Гидролиз плазмидной и фаговой ДНК эндонуклеазой KgoI и электрофорез продуктов гидролиза. Гидролиз ДНК проводили при 37 °С в течение 2 часов в 20 мкл реакционной смеси, содержащей буфер следующего состава: 10 мМ Трис-НСl (рН 8,5 при 25 °С); 20 мМ NaCl, 3 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотрейтол и ДНК в количестве 0,5 мкг. Для разделения продуктов гидролиза плазмидной ДНК применяли электрофорез в 1% агарозном геле в буфере ТАЕ. В качестве маркера молекулярных масс ДНК в электрофореграммах использовали 1 kb ДНК-маркеры (от 250 п.о. до 10000 п.о.) («СибЭнзим», Россия).

Определение позиции гидролиза ДНК на олигонуклеотидных дуплексах. Позиции гидролиза ДНК сайт-специфической эндонуклеазой KgoI были установлены путем сравнения длин фрагментов, образующихся при расщеплении ³²P-меченных синтетических олигону-

клеотидных дуплексов эндонуклеазами KroI и MroNI. В качестве маркера длин фрагментов использовали продукты частичного расщепления этих же дуплексов экзонуклеазой III из *E. coli*. Расщепление ДНК проводили в оптимальных условиях в течение 1 часа. Фрагменты ДНК, образующиеся в результате расщепления олиго-

нуклеотидных дуплексов, разделяли электрофорезом в денатурирующем 20% ПААГ с 7 М мочевиной.

В работе использовались олигонуклеотидные дуплексы, полученные гибридизацией из следующих синтетических олигонуклеотидов, синтезированных в НПО «Сибэнзим» (Россия):

17	5'-CCATAGGATGCCTCTATGGCCGGCCACGGACCGTATC-3'
18	5'-GATACGGTCCGTGGCCGGCCATAGAGGCATCCTATGG-3'
19	5'-CCA55'-AGGATGCCTCTATGGC(5mC)GGCCACGGACCGTATC-3'
20	5'-GATACGGTCCGTGGC(5mC)GGCCATAGAGGCATCCTATGG-3'
21	5'-GCTAG TTGGA AGGCC GGCGA AGAAT GATG-3'
22	5'-CATC ATTCTTCGCC GGCCT TCCAA CTAGC-3'
23	5'-GCTAG TTGGA AGGC(5mC) GGCGA AGAAT GATG-3'
24	5'-CATC ATTCTTCGC(5mC) GGCCT TCCAA CTAGC-3'

Результаты и обсуждение

Микробиологическое описание штамма-продуцента. Бактериальный штамм-продуцент фермента KroI был выделен из образца почвы. Штамм *Kocuria rosea* 307 характеризуется следующими признаками. Клетки кокковидные, размером 1–2 мкм в диаметре. Спор не образуют. Грамположительные. Obligatно аэробные. Каталазоположительные. Растут при температуре от 10 до 40 °С, при рН от 6 до 9.

На основании анализа морфологических и биохимических свойств по определителю [1], а также с помощью анализа первичной структуры фрагмента гена 16S РНК [9] штамм идентифицировали как вид бактерии *Kocuria rosea* (старое видовое название *Micrococcus roseus*).

Получение препарата фермента. Фермент выделяли из клеточного экстракта путем последовательных хроматографических процедур, как описано в разделе «Материалы и методы». Выход фермента составил 1,5 мл препарата с концентрацией 1000 ед./мл.

Определение субстратной специфичности KroI. В качестве субстратов для определения специфичности нового фермента использовали метилированные и неметилированные ДНК фагов λ (предварительно расщепленную рестриктазой AspA2I по единственному сайту узнавания, для облегчения визуализации на электрофореграмме продуктов гидролиза эндонуклеазами MroNI и KroI) и T7, а также ДНК плазмиды pBR322. Отдельно с помощью метилазы M.SssI проводили метилирование всех 5'-CG-3'-динуклеотидов в ДНК фага λ и плазмиде pBR322, а затем гидролизовали такую метилированную ДНК ферментом KroI. В качестве контроля использовали

гидролиз субстратов эндонуклеазой рестрикции MroNI (неоизомер NaeI), которая расщепляет немодифицированную последовательность 5'-G[^]CCGGC-3'. При анализе специфичности проверяли также способность KroI расщеплять ДНК фага λ , в которой с помощью M.CviPI предварительно были метилированы цитозины во всех динуклеотидах 5'-GC-3'.

На рисунке 1 представлена электрофореграмма продуктов расщепления ДНК фагов λ и T7, а также плазмиды pBR322 эндонуклеазой KroI.

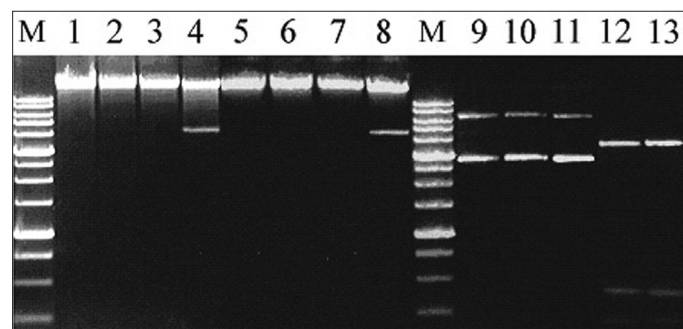


Рис.1. Электрофореграмма продуктов расщепления субстратных ДНК эндонуклеазами KroI и MroNI. Дорожки: 1 – ДНК фага λ , обработанная рестриктазой AspA2I (λ /AspA2I); 2 – ДНК λ /AspA2I + M.SssI; 3 – ДНК λ /AspA2I + M.CviPI; 4 – ДНК λ /AspA2I + MroNI; 5 – ДНК λ /AspA2I + M.SssI + MroNI; 6 – ДНК λ /AspA2I + KroI; 7 – ДНК λ /AspA2I + M.CviPI + KroI; 8 – ДНК λ /AspA2I + M.SssI + KroI; 9 – ДНК pBR322; 10 – ДНК pBR322 + M.SssI; 11 – ДНК pBR322 + KroI; 12 – ДНК pBR322 + MroNI; 13 – ДНК pBR322 + M.SssI + KroI; M – 1 kb маркеры молекулярной массы ДНК.

Как видно на рисунке 1, KroI не расщепляет неметилированную ДНК фага λ (дор. 6), ДНК фага λ , метилированную по последовательности 5'-GC-3' метилазой M.CviPI (дор. 7), и неметилированную ДНК плазмиды pBR322 (дор. 11). Однако после обработки ДНК фага λ и плазмиды pBR322 метилазой SssI, метилирующей последовательность 5'-CG-3', эндонуклеаза KroI расщепляет такую метилированную ДНК (дор. 8 и 13). Картина расщепления ДНК λ /AspA2I рестриктазой MroNI (дор. 4) совпадает с картиной гидролиза эндонуклеазой KroI ДНК λ /AspA2I, метилированной ферментом SssI (дор. 8). Аналогично картина гидролиза плазмиды pBR322 рестриктазой MroNI (дор. 12) совпадает с картиной гидролиза эндонуклеазой KroI ДНК pBR322, метилированной SssI (дор. 13).

Совпадение картин гидролиза метилированной и неметилированной ДНК эндонуклеазами KroI и MroNI, соответственно, подтверждают, что эти два фермента узнают одну и ту же последовательность ДНК 5'-GCCGGC-3'/3'-CGGCCG-5', однако MroNI расщепляет эту последовательность только если она не метилирована, а KroI, наоборот, только если она метилирована, то есть, сайтом узнавания KroI является последовательность 5'-GC(5mC)GGC-3'/3'-CGG(5mC)CG-5'. При этом не наблюдается гидролиза последовательности 5'-G(5mC)CGG(5mC)-3'/3'-(5mC)GGC(5mC)G-5', в которой центральные цитозины неметилированы (дор. 7).

Для подтверждения сайта узнавания и определения активности фермента KroI мы сконструировали плазмиду pMHPaII-1 (см. «Материалы и методы»), которая содержит метилазу M.HpaII. Метилаза M.HpaII метилирует сайт 5'-CCGG-3' с образованием 5'-C(5mC)GG-3'/3'-GG(5mC)C-5', вследствие чего все три сайта 5'-GCCGGC-3', имеющиеся в плазмиде pMHPaII-1 (один находится внутри гена метилазы M.HpaII, а еще два — в составе вектора), метилированы по центральным цитозинам.

Кроме того, мы сконструировали плазмиду pMMspI-1 (см. «Материалы и методы»), которая содержит метилазу M.MspI. Метилаза M.MspI также модифицирует сайт CCGG, однако метилированию подвергаются крайние цитозины с образованием последовательности 5'-(5mC)CGG-3'/3'-GGC(5mC)-5', вследствие чего в плазмиде pMMspI-1 присутствуют два сайта 5'-G(5mC)CGGC-3'/3'-CGGC(5mC)G-5'.

Результаты обработки ДНК плазмид pMHPaII-1 и pMMspI-1, предварительно линейризованных эндонуклеазой рестрикции DriI, приведены на рисунке 2. Видно,

что ДНК pMHPaII-1/DriI расщепляется эндонуклеазой KroI с образованием трех фрагментов. Данная картина

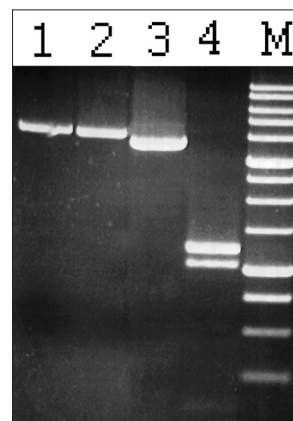


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов гидролиза ДНК плазмид pMHPaII-1 и pMMspI-1 эндонуклеазой KroI. Дорожки: 1 — ДНК pMMspI-1/DriI; 2 — ДНК pMMspI-1/DriI + KroI; 3 — ДНК pMHPaII-1/DriI; 4 — ДНК pMHPaII-1/DriI + KroI; M — 1 kb маркеры молекулярной массы ДНК

расщепления соответствует теоретически рассчитанной картине гидролиза ДНК этой плазмиды по сайту узнавания 5'-GCCGGC-3' (должны образовываться фрагменты длиной 1250, 1215, 1060 и 101 п.о.). Из рисунка 2 также следует, что ДНК pMMspI-1/DriI не расщепляется эндонуклеазой KroI (дор. 2), хотя в этой плазмиде содержатся два сайта 5'-G(5mC)CGGC-3'/3'-CGGC(5mC)G-5'.

Таким образом, метил-зависимая сайт-специфическая эндонуклеаза KroI не способна расщеплять метилированную последовательность ДНК 5'-G(5mC)CGGC-3'/3'-CGGC(5mC)G-5', однако расщепляет последовательность GC(5mC)GGC-3'/3'-CGG(5mC)CG-5'.

Из полученных результатов можно сделать вывод, что метилирование центральных остатков цитозина в последовательности 5'-GCCGGC-3'/3'-CGGCCG-5' является необходимым условием для проявления активности KroI.

Определение активности фермента. Для определения активности фермента KroI использовалась плазида pMHPaII-1. За одну единицу активности сайт-специфической эндонуклеазы KroI мы принимали такое минимальное количество фермента, при котором происходит полный гидролиз 1 мкг ДНК плазмиды pMHPaII-1, предварительно линейризованной рестриктазой DriI, в 50 мкл реакционной смеси в оптимальных условиях: при 37 °C. На рисунке 3 приведена электро-

фореграмма агарозного геля после нанесения ДНК плазмиды ρ MHpaII-1/DriI, обработанной 0,5, 1 и 2 мкл препарата KroI (дор. 2, 3 и 4, соответственно). Из данных на рисунке 3 следует, что активность фермента составляет 1 ед./мкл.

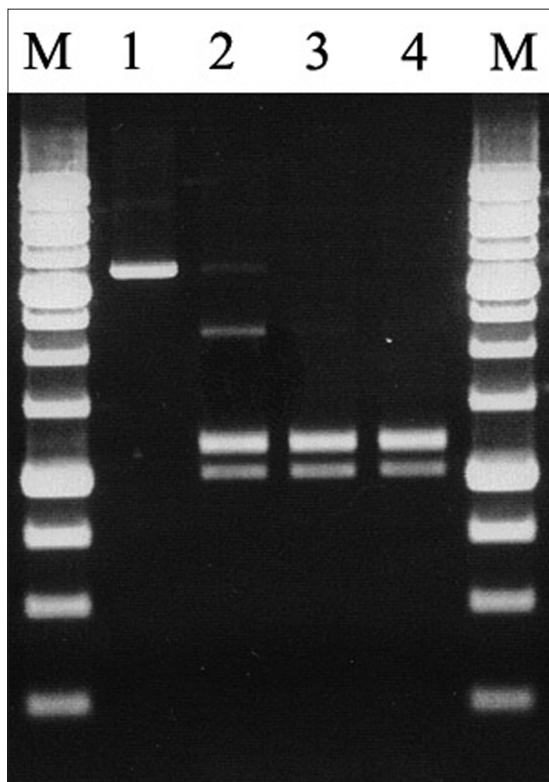


Рис. 3. Определение активности препарата KfoI. Дорожки: 1 – ДНК ρ MHpaII-1/DriI; 2 – ДНК ρ MHpaII-1/DriI + 0,5 мкл препарата фермента KfoI; 3 – ДНК ρ MHpaII-1/DriI + 1 мкл препарата фермента KfoI; 4 – ДНК ρ MHpaII-1/DriI + 2 мкл препарата фермента KfoI; М – 1 kb маркеры молекулярной массы ДНК

Определение позиции гидролиза ДНК эндонуклеазой KfoI. Для подтверждения правильности установленной последовательности узнавания KfoI и определения позиции расщепления ДНК мы проводили гидролиз синтетических олигонуклеотидных дуплексов, образованных из олигонуклеотидов 17, 18, 19, 20 (первичную структуру см. «Материалы и методы»).

Олигонуклеотиды 17 и 19 комплементарны олигонуклеотидам 18 и 20. Дуплексы 17/18 и 19/20 имеют сходную последовательность и отличаются друг от друга только наличием или отсутствием 5-метилцитозина в последовательности 5'-GCCGGC-3'/3'-CGGCCG-5'.

Определение места гидролиза ДНК KfoI осуществляли путем сравнения длин фрагментов, образуемых при расщеплении эндонуклеазой рестрикции MroNI

неметилированного олигонуклеотидного дуплекса, образованного из олигонуклеотидов 17 и 18, и гидролиза эндонуклеазой KfoI метилированного дуплекса, образованного из олигонуклеотидов 19 и 20. В качестве маркера длин фрагментов использовали продукты частичного расщепления этих же дуплексов экзонуклеазой EhoIII из *E. coli*.

На рисунке 4 приведен радиоавтограф разделения продуктов расщепления радиоактивно меченных дуплексов 17*/18 (знаком «*» указан меченый олигонуклеотид) и 19*/20 в 20% ПААГ, с 7 М мочевиной. Как видно на этом рисунке, фрагменты ДНК, образованные гидролизом MroNI и KfoI соответствующих дуплексов, имеют одинаковую длину, что говорит об идентичности позиций гидролиза узнаваемой последовательности у этих ферментов.

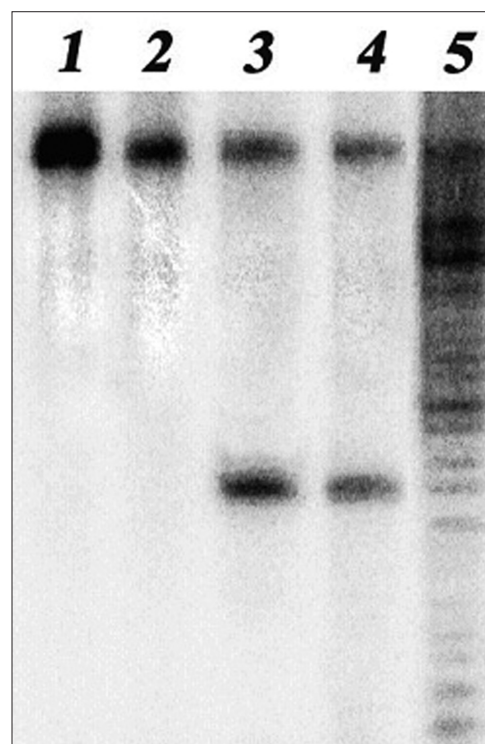


Рис. 4. Определение позиции расщепления ДНК эндонуклеазой KfoI. Дорожки: 1 – дуплекс 17*/18; 2 – дуплекс 19*/20; 3 – дуплекс 18*/17, обработанный рестриктазой MroNI; 4 – дуплекс 19*/20, обработанный KfoI; 5 – дуплекс 19*/20, обработанный экзонуклеазой EhoIII

На основе полученных результатов можно сделать вывод, что в палиндромной последовательности 5'-GC(5mC)GGC-3' эндонуклеаза KfoI расщепляет ДНК перед первым остатком цитозина с образованием четырехнуклеотидных 5'-выступающих концов аналогично рестриктазе MroNI.

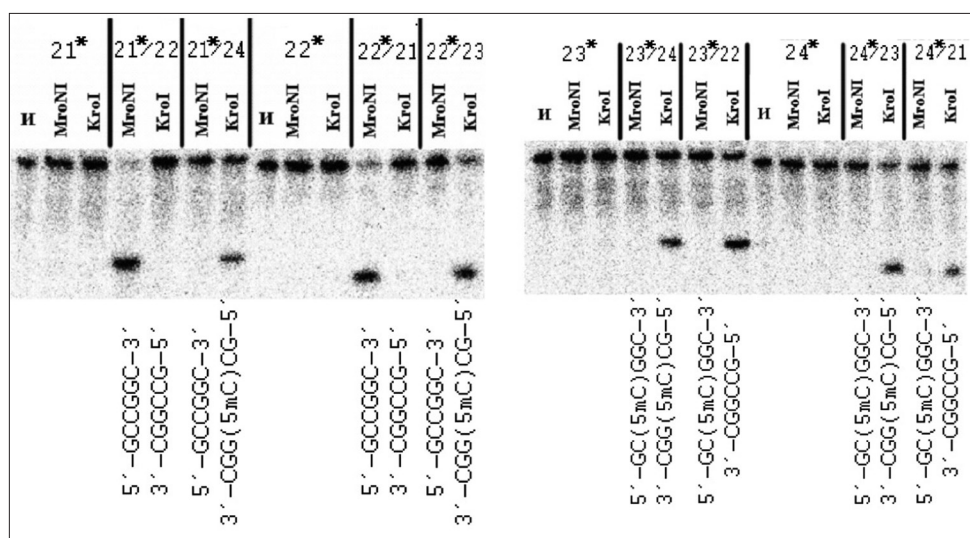


Рис. 5. Радиоавтограф продуктов гидролиза олигонуклеотидов ферментами MroNI и KfoI. Наверху над дорожками приведены номера используемых олигонуклеотидных дуплексов. Символом «*» обозначен меченый олигонуклеотид, буквой «И» обозначен исходный меченый олигонуклеотид или олигонуклеотидный дуплекс

Расщепление олигонуклеотидов ферментами MroNI и KfoI. Мы также проверили способность ферментов MroNI и KfoI расщеплять различные олигонуклеотиды и олигонуклеотидные дуплексы, содержащие метилированные цитозины. В качестве субстратов мы использовали олигонуклеотиды 21, 22, 23, 24, а также олигонуклеотидные дуплексы, образованные ими (см. структуру в «Материалах и методах»).

На рисунке 5 изображен радиоавтограф разделения электрофорезом в 20% ПААГ с 7 М мочевиной продуктов расщепления радиоактивно меченных неметилированных, полуметилированных и полностью метилированных олигонуклеотидных дуплексов, а также отдельных олигонуклеотидов.

Как продемонстрировано на рисунке 5, ферменты MroNI и KfoI не расщепляют одноцепочечные олигонуклеотиды, содержащие последовательность 5'-GCCGGC-3' и 5'-GC(5mC)GGC-3'. При этом неметилированные дуплексы 21*/22 и 22*/21 расщепляются рестриктазой MroNI, но не расщепляются эндонуклеазой KfoI.

Из данных, приведенных на рисунке 5, также следует, что KfoI расщепляет не только дуплексы, в которых в сайте узнавания метилированы оба центральных цитозина (дуплексы 23*/24 24*/23), но и полуметилированный субстрат (то есть содержащий последовательность 5'-GC(5mC)GGC-3'/3'-CGGCCG-5' с одной метильной группой). На полуметилированном субстрате KfoI расщепляет как неметилированную цепь (дуплекс 22*/23, 21*/24), так и метилированную цепь (дуплекс

23*/22, 24*/21). В то же время рестриктаза MroNI не расщепляет олигонуклеотидные дуплексы с полуметилированным сайтом, что соответствует общим свойствам эндонуклеаз рестрикции.

Таким образом, эндонуклеаза KfoI узнает и эффективно расщепляет обе цепи последовательности 5'-G[^]CCGGC-3'/3'-CGGCCG[^]-5' при наличии в ней 5-метилцитозина в третьем положении в одной или обеих цепях ДНК. Следовательно, новый фермент может использоваться для выявления сайтов 5'-GCCGGC-3'/3'-CGGCCG-5', метилированных ДНК-метилтрансферазой HpaII, причем та же последовательность, модифицированная M.MspI, будет устойчива к действию KfoI.

KfoI является первой описанной метил-зависимой сайт-специфической эндонуклеазой, узнающей невырожденную шестинуклеотидную последовательность. Примечательно, что узнаваемая последовательность (за исключением статуса метилирования) и место гидролиза ДНК ферментом KfoI совпадают с сайтом узнавания фермента MroNI. Более того, оба этих фермента были выделены из разных штаммов бактерий, но одного и того же вида *Micrococcus roseus* (новое название — *Kocuria rosea*).

Ранее была описана подобная пара ферментов. Метил-зависимая сайт-специфическая эндонуклеаза DpnI имеет сайт узнавания 5'-G(m6A)TC-3'/3'-CT(m6A)G-5', тогда как рестриктаза DpnII узнает неметилированную последовательность 5'-GATC-3'/3'-CTAG-5'. Однако, в отличие от пары MroNI-KfoI, DpnI

расщепляет ДНК с образованием тупых концов, тогда как DpnII образует 5'-выступающие четырехнуклеотидные липкие концы [7]. Таким образом, нами подтверждено существование пар бактерий, относящихся к одному и тому же виду и продуцирующих эндонуклеазы с одинаковой последовательностью узнавания, но с разным статусом метилирования.

Эндонуклеаза KroI может быть полезна для выявления и анализа метилированных участков ДНК. В частности, пара KroI/MroNI(NaI) может применяться в эпигенетических работах аналогично паре ферментов HpaII и MspI, уже давно используемых в таких экспериментах [6].

Литература

1. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта и др.: (9-е издание в 2 томах): Пер. с англ. под ред. акад. РАН Г.А. Заварзина. — М., 1997.
2. 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. Новая эндонуклеаза рестрикции Glal узнает метилированную последовательность 5'-GCCG-3' // Биотехнология. — 2006. — № 4. — С. 31–35.
3. Чернухин В.А., Томилова Ю.Э., Чмуж Е.В., Соколова О.О., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Сайт-специфическая эндонуклеаза BIsI узнает последовательности ДНК 5'-G(5mC)NGC-3' и расщепляет ее с образованием 3'-выступающих концов // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2007. — Т. 3. — № 1. — С. 28–33.
4. Чернухин В.А., Чмуж Е.В., Томилова Ю.Э., Наякшина Т.Н., Гончар Д.А., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Новая сайт-специфическая эндонуклеаза GluI узнает метилированную последовательность ДНК 5'-G(5mC)NG(5mC)-3'/3'-(5mC)GN(5mC)G-5' // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2007. — Т. 3. — № 2. — С. 13–17.
5. Чмуж Е.В., Каширина Ю.Г., Томилова Ю.Э., Мезенцева Н.В., Дедков В.С., Гончар Д.А., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х. Новая эндонуклеаза рестрикции BIsI из *Bacillus subtilis* T30 узнает метилированную последовательность ДНК 5'-G(5mC)NGC-3' // Биотехнология. — 2005. — № 3. — С. 22–26.
6. Bird A.P., Southern E.M. Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA methylation: The methylation pattern in ribosomal DNA from *Xenopus laevis* // J. Mol. Biol. — 1978. — Vol. 118 — P. 27–47.
7. Campa A.G., Springhorn S.S., Kale P., Lacks S.A. Proteins encoded by the DpnI restriction gene cassette. Hyperproduction and characterization of the DpnI endonuclease // Biol. Chem. — 1988. — Vol. 63. — P. 14696–14702. (ТАК?!)
9. Lacks S. and Greenberg B.J. A deoxyribonuclease of *Diplococcus pneumoniae* specific for methylated DNA // Biol. Chem. — 1975. — Vol. 250. — P. 4060–4066.
10. Madden T.L., Tatusov R.L. and Zhang J. Applications of network BLAST server // Meth. Enzymol. — 1996. — Vol. 266. — P. 131–141.
11. Pingoud A., and Jeltch A. Structure and function of type II restriction endonucleases // Nucleic Acid Res. — 2001. — Vol. 29. — P. 3705–3727.

Список сокращений:

5mC — 5-метилцитозин,
 M. — ДНК-метилтрансфераза,
 п.о. — пар оснований в ДНК,
 ед. — единица активности,
 RMSF — фенилметилсульфонилфторид,
 EcoIII — экзонуклеаза III из *E. coli*,
 ПААГ — полиакриламидный гель.

A NEW METHYL-DIRECTED SITE-SPECIFIC ENDONUCLEASE KroI RECOGNIZES AND CUTS DNA SEQUENCE 5'-G[^]C(5mC)GGC-3'

V.A. CHERNUKHIN, E.V. KILEVA, Ju.E. TOMILOVA, A.A. BOLTENGAGEN, V.S. DEDKOV, N.A. MIKHENKOVA, D.A. GONCHAR, L.N. GOLIKOVA, S.Kh. DEGTYAREV

SibEnzyme Ltd., Novosibirsk

We have discovered and purified a new methyl-directed site-specific DNA endonuclease KroI from bacterial strain *Kocuria rosea* 307. KroI recognizes and cuts DNA sequence 5'-G[^]C(5mC)GGC-3'/3'-CGG(5mC)C[^]G-5' and doesn't cleave unmethylated DNA. A new enzyme cleaves both strands of the recognition sequence if one or two central cytosines are methylated. KroI is a first methyl-directed site-specific DNA endonuclease that recognizes the non-degenerate hexanucleotide sequence. Due to its ability to cleave only modified DNA KroI may find a practical application in genetic engineering experiments as well as in determination of DNA methylation status.

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

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗ И ГЕНЕРАЦИИ СУПЕРОКСИДНОГО РАДИКАЛА, ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА В АПОПЛАСТНОМ КОМПАРТМЕНТЕ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ В ПРОЦЕССЕ ДЕЭТИОЛЯЦИИ

М.В. ТОМИЛИН*, Л.Н. ОЛЮНИНА, В.С. СУХОВ, А.А. БРИЛКИНА, А.П. ВЕСЕЛОВ

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород

В работе была исследована динамика накопления супероксидного радикала и пероксида водорода, уровень антиоксидантов и гемсодержащих белков, а также пероксидазная (донор электрона — бензидин, гваякол, аскорбат) и оксидазная (с субстратами — НАД(Ф)Н, ИУК) активности пероксидазной ферментной системы в апопласте побегов и корней проростков яровой пшеницы в процессе деэтиоляции. Выявлено, что в формировании ответа на смену светового режима в побегах определяющую роль играет сдвиг баланса про-/антиоксидантной функции в сторону оксидантной активности пероксидазы, что, по-видимому, вызывает накопление супероксидного радикала и пероксида водорода в апопласте побегов (окислительный взрыв). В корнях индуцируется ответ другого типа, который связан со снижением пероксидазной и оксидазной активности пероксидаз и сопровождается увеличением содержания пероксида водорода и уменьшением концентрации супероксидного радикала в апопластном компартменте деэтиолированных проростков.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, внеклеточная пероксидаза, активные формы кислорода (АФК), свет, регуляция.

Введение

Известно, что влияние света на обмен веществ опосредовано через систему фоторецепторов, и их возбуждение может вызывать целый каскад реакций, инициирующих изменение активности регулируемых светом генов (соответственно, количества фермента). В работах О.В. Осипенковой [12] показано, что на ранних этапах деэтиоляции проростков, в условиях резкой смены светового режима экспрессируются ядерные гены стрессовых белков, в частности ELIP, которые играют важную роль в защитных реакциях растений в ответ на действие стрессоров. Биотические и абиотические стрессоры индуцируют накопление активных форм кислорода (АФК), вызывая активацию специфических ферментов, в частности пероксидаз (ПО) клеточных стенок. Механизмы образования АФК экстраклеточными пероксидазами обобщены в работах [18, 24].

Пероксидаза (КФ 1.11.1.7) — гемсодержащий гликопротеин, гистохимически выявлена в различных компартментах клетки в виде растворимой фракции и в

форме, связанной с клеточной стенкой и с мембранами. Отличительной чертой всех ПО является их полифункциональность, участие в таких биохимических реакциях, как оксидазная, пероксидазная и оксигеназная окисление субстратов [1, 16]. В частности, внеклеточные ПО, утилизируя АФК, вносят важный вклад в архитектуру клеточных стенок, участвуя в изменении их композиции, в образовании лигнина, который играет ключевую роль в повышении прочности данной клеточной структуры [3, 11]. При этом механизмы регуляции окислительно-восстановительных реакций растительными ПО во внеклеточном пространстве остаются в настоящее время недостаточно изученными. В связи с этим целью данной работы являлось исследование участия внеклеточных ПО в модификации уровня про-/антиоксидантов проростков пшеницы в процессе деэтиоляции.

Материалы и методы

Растительный материал. В опытах были использованы проростки яровой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта «Московская 35» (водная культура), выращенные в темноте при постоянной температуре (25–26 °С). Шестидневные этиолированные проростки помещали под люминесцентные лампы (10000 лк), расположенные на расстоянии 20 см от проростков; продолжительность экспозиции составляла 5, 10, 15

© 2011 г. Томилин М.В., Олюнина Л.Н., Сухов В.С., Брилкина А.А., Веселов А.П.

* **Автор для переписки:**

Томилин М.В.

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород

мин.; в качестве контроля использовали растения, не экспонированные на свету.

Экстракция и определение гемсодержащего белка (ГСБ) в апопласт-омывающем растворе (АОР). Для экстракции внеклеточных пероксидаз навеску (1 г тканей побегов или корней исследуемых проростков) помещали в шприц, заливали 3 мл свежеприготовленной дистиллированной воды и дважды по 1 мин. подвергали вакуумной инфльтрации. Период релаксации составлял 2 мин. [13].

В соответствии с активностью глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы, содержание данного фермента в АОР к цитоплазматическому составляло меньше чем 1% [9]. Концентрирование пероксидазного белка осуществляли высаливанием $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (70–95% насыщения). Определение концентрации ГСБ проводили спектрофотометрическим методом при 403 нм [22] (спектрофотометр UV-1700 Shimadzu, Япония); (со спектральным показателем чистоты $\text{RZ}=0,6$).

Определение степени гликозилирования ГСБ апопласта. Для определения степени гликозилирования проводили частичный гидролиз белка в 3 н НСl в течение 7 ч при постоянной температуре (90 °С) [6]. Углеводный компонент регистрировали спектрофотометрически при 490 нм по реакции с 4,4'-диаминодифенилом (5 мМ) [5].

Определение активности пероксидазы. Активность исследуемых ферментов в АОР побегов и корней проростков пшеницы оценивали спектрофотометрически в момент линейного протекания реакции. Активность бензидин-ПО (БПО) определяли при 590 нм, гваякол-ПО (ГПО) при 470 нм [2], аскорбат-ПО (АПО) при 265 нм [5]. Состав реакционной смеси: 0,5 мл АОР, 1,5 мл 0,2 М ацетатного буфера (рН 5,4), 0,5 мл 0,015% H_2O_2 и 0,5 мл 5 мМ 4,4'-диаминодифенила ($\epsilon_{590}=39 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$) или 0,5 мл 0,05% гваякола ($\epsilon_{470}=26,6 \times 10^3 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$) или 0,5 мл 2,5 мМ аскорбата ($\epsilon_{265}=7 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$). НАД(Ф)Н-ПО активность регистрировали по уменьшению поглощения при 340 нм. В кювету вносили 0,5 мл АОР, 1 мл 0,2 М ацетатного буфера (рН 5,4), 0,5 мл 16 мМ MnCl_2 , 0,5 мл 1,6 мМ о-кумаровой кислоты и 0,5 мл 0,3 мМ НАДН ($\epsilon_{340}=4,23 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$) или 0,5 мл 0,3 мМ НАДФН ($\epsilon_{340}=6,22 \times 10^3 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$) [19]. Активность ИУК-ПО определяли при 254 нм [21]. Состав реакционной смеси: 0,5 мл АОР, 1 мл 0,2 М ацетатного буфера (рН 5,4), 0,5 мл 16 мМ MnCl_2 , 0,5 мл 0,1 мМ р-кумаровой кислоты и 0,5 мл 0,6 мМ ИУК ($\epsilon_{254}=18,7 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$). Активность исследуемых ферментов выражали в ммоль субстрата/мин на 1 мг ГСБ.

Определение содержания гидропероксидных группировок, супероксид-анион-радикала и антиоксидантов в АОР. Содержание гидропероксидов (R-OOH) оценивали по реакции с роданистым аммонием [10]. Белок АОР осаждали 50% ТХУ (конечная концентрация 7%). После центрифугирования объем надосадочной жидкости доводили до 10 мл этанолом. К равным объемам добавляли 0,2 мл концентрированной НСl и 0,012 мл 5% соли Мора в 3% НСl. Для развития окрашивания в пробы вносили 0,5 мл 20% роданистого аммония. Оценку R-OOH производили через 10 мин. спектрофотометрически против контроля (этанол) при 480 нм. Содержание гидропероксидных группировок выражали в ммоль/мг белка. Количество супероксид-анион-радикала (O_2^-) определяли спектрофотометрически при 490 нм с использованием адреналина — акцептора электронов [17]. К 2 мл АОР приливали 0,5 мл 0,1 мМ (рН 7,0) адреналина, который в присутствии супероксида превращается в адrenoхром ($\epsilon_{490}=4,02 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$).

Уровень антиоксидантов оценивали по методике А.И. Ермакова и др. [7] с нашими модификациями. Состав реакционной смеси: 2,2 мл дистиллированной воды, 0,4 мл АОР, 0,1 мл 25 мМ о-фенантролина и 0,3 мл 123 мкМ FeCl_3 . Оптическую плотность измеряли при 505 нм после 10 мин. экспозиции проб в темноте. Количество антиоксидантов выражали в мг на 1 мл АОР.

Количество белка определяли по методу Лоури.

Все опыты проводили в трех биологических повторностях. На рисунках представлены средние арифметические значения и их среднеквадратичные отклонения.

Результаты и обсуждение

В наших исследованиях кратковременное действие света (5–15 мин.) на этиолированные проростки индуцировало изменения уровня ГСБ в апопласте побегов и корней (рис 1а). Уже через 5 мин. после воздействия свет обратимо повышал уровень белка в АОР корней, а через 15 мин. уменьшал содержание ГСБ в апопласте надземных органов опытных проростков в 1,5 раза. Поскольку известно, что растительные ПО являются секретлируемыми ферментами [25], то обнаруженные изменения во внеклеточном компартменте могут быть связаны с модификацией процессов экзо- и эндоцитоза низкомолекулярных белков. При этом характер таких модификаций может различаться в побегах и корнях исследуемых проростков пшеницы.

ПО имеют ковалентно связанные с белком углеводные фрагменты, которые повышают их способность связываться с субклеточными структурами клеток [14].

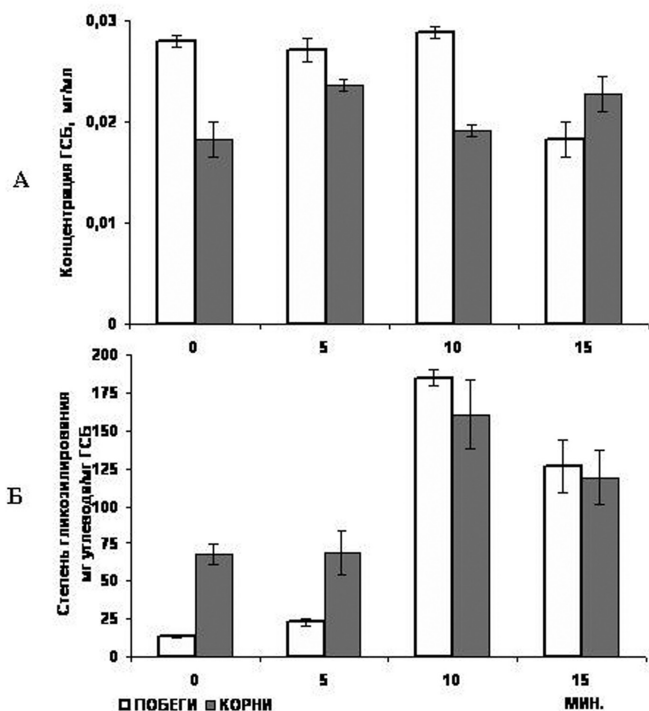


Рис. 1. Изменение степени гликозилирования (А) и уровня гемсодержащего белка (Б) апопласт-омывающего раствора в побегах и корнях в процессе деэтиоляции проростков пшеницы

Такое взаимодействие может представлять собой один из вариантов регулирования пула ГСБ апопласта деэтиолированных проростков.

Как следует из рисунка 1б, свет вызывает кратковременное повышение степени гликозилирования ГСБ в АОР побегов и корней проростков. Максимальное светоиндуцированное накопление углеводных компонентов в структуре ГСБ было зафиксировано при 10-минутном воздействии: в АОР побегов в 13,4 раза, в апопласте корней — соответственно в 2,4 раза. Следует отметить, что в побегах проростков пшеницы увеличение степени гликозилирования ГСБ при 10 мин. сопровождалось последующим снижением количества белков такого типа (15 мин.); в корнях сопряженные изменения «углеводный компонент — уровень ГСБ» носили противоположный характер. В целом, для реакции растений на свет ха-

рактерно быстрое повышение углеводного компонента ГСБ в апопласте, что, вероятно, может способствовать повышению стабильности экстраклеточных пероксидаз проростков в данных условиях [15].

Пероксидаза специфична к субстратам различной природы. Для взаимодействия фермента с молекулой субстрата последняя должна иметь две структурные особенности: специфическую химическую связь, которую фермент атакует, и функциональную группу, ориентирующую молекулу субстрата в активном центре фермента. Субстраты классических пероксидаз растений принято дифференцировать на 3 группы. К первой относят двухэлектронные доноры, для которых главным является связывание вблизи или проникновение внутрь активного центра. Вторая группа — одноэлектронные ароматические субстраты, которые связываются вблизи активного центра. Третья группа — это субстраты, окисляющиеся по цепи переноса электронов (АВТС, ИУК, НАД(Ф)Н и др.). На этом основании можно заключить, что фермент имеет две различные функции (оксидазную и пероксидазную), что позволяет предполагать в каталитическом действии пероксидазы участие двух независимых активных центров, пространственно разделенных, хотя и близко расположенных друг от друга на молекуле фермента [4].

На основании результатов, представленных в таблице 1, можно предположить, что основной пул внеклеточной пероксидазной активности сосредоточен в корнях проростков пшеницы, причем уровень как оксидазной, так и пероксидазной активности в 4–5 раз выше, чем в побегах. Следует отметить, что изучаемые органы, вероятно, отличаются и по локализации в апопласте отдельных форм ПО. Так, в надземных органах выявлен повышенный уровень ГПО и АПО активности, а НАДФН-ПО и ИУК-ПО активности, которые связаны с высокой скоростью генерации АФК, были характерны для корней проростков пшеницы. Можно считать, что в апопласте исследуемых органов проростков, возможно, имеет место специфическая направленность и соответственно реализация окислительно-восстановительных реакций.

Таблица 1

Уровень активности пероксидазной ферментной системы в апопласт-омывающем растворе побегов и корней проростков пшеницы

Исследуемый орган	Активность пероксидазы, ммоль/мг ГСБ·мин.					
	БПО	ГПО	АПО	НАДН-ПО	НАДФ-ПО	ИУК-ПО
Побеги	0,422±0,131	0,259×10 ⁻³ ±0,089×10 ⁻³	1,176±0,153	5,836±0,249	0,009±0,002	3,081±0,673
Корни	8,722±0,091	0,078×10 ⁻³ ±0,029×10 ⁻³	0,768±0,019	1,081±0,156	0,015±0,001	39,534±0,754

В последнее время в литературе активно обсуждается роль пероксидазы не только в утилизации перекиси водорода, но и в ее образовании, а также в образовании супероксид-анион-радикала [20]. Установлены новые механизмы функционирования пероксидазы, во многом связанные с изучением «гидроксильного» каталитического цикла с участием «соединения III» и генерацией АФК.

Как следует из результатов, представленных на рисунке 2, в процессе деэтиоляции (в побегах и корнях проростков пшеницы) происходили разнонаправленные изменения активности внеклеточной пероксидазы. В корнях уже через 5 мин. после воздействия свет стимулировал антиоксидантную (БПО, ГПО, АПО) активность ПО в 1,4–1,8 раза (рис. 2в) и снижал прооксидантную (НАД(Ф)Н-ПО, ИУК-ПО) (рис. 2г). При этом в побегах активность апопластной ПО (кроме активности БПО) (рис. 2а) и оксидазная активность фермента (рис. 2б) были снижены. Увеличение продолжительности экспонирования проростков на свету (15-минутная деэтиоляция) в АОР надземных органов индуцировало снижение пероксидазной (всех исследуемых форм), однако оксидазная функция ПО была повышена; в частности, зафиксировано повышение активности ИУК-ПО в 1,7 раза. В корнях опытных

проростков после 15-минутной деэтиоляции внеклеточная пероксидазная активность (кроме активности ГПО и НАДН-ПО) была снижена. То есть, в исследуемых органах проростков пшеницы свет избирательно модифицировал ПО: в корнях он вызывал быстрое нарастание и в дальнейшем сохранение повышенной антиоксидантной (пероксидазной активности, в частности ГПО), а в побегах — стимулировал прооксидантную (оксидажную функцию ПО). Следовательно, можно предположить, что в апопласте побегов и корней проростков пшеницы свет будет специфически модифицировать уровень АФК, вызывая тонкую регуляцию пероксидазной ферментной системы внеклеточного компартмента.

Полученные результаты (рис. 3, 4) отражают изменения уровня АФК и антиоксидантов в АОР деэтиолированных проростков. Свет в АОР побегов и корней проростков через 5 мин. после воздействия вызывал уменьшение уровня O_2^- и через 10 мин. уменьшал содержание антиоксидантов; при этом уровень R-ООН плавно повышался. Уменьшение (антиоксидантов) и повышение (R-ООН) в процессе деэтиоляции в большей степени было выражено при 10-минутном экспонировании проростков на свету (в 1,5 раза).

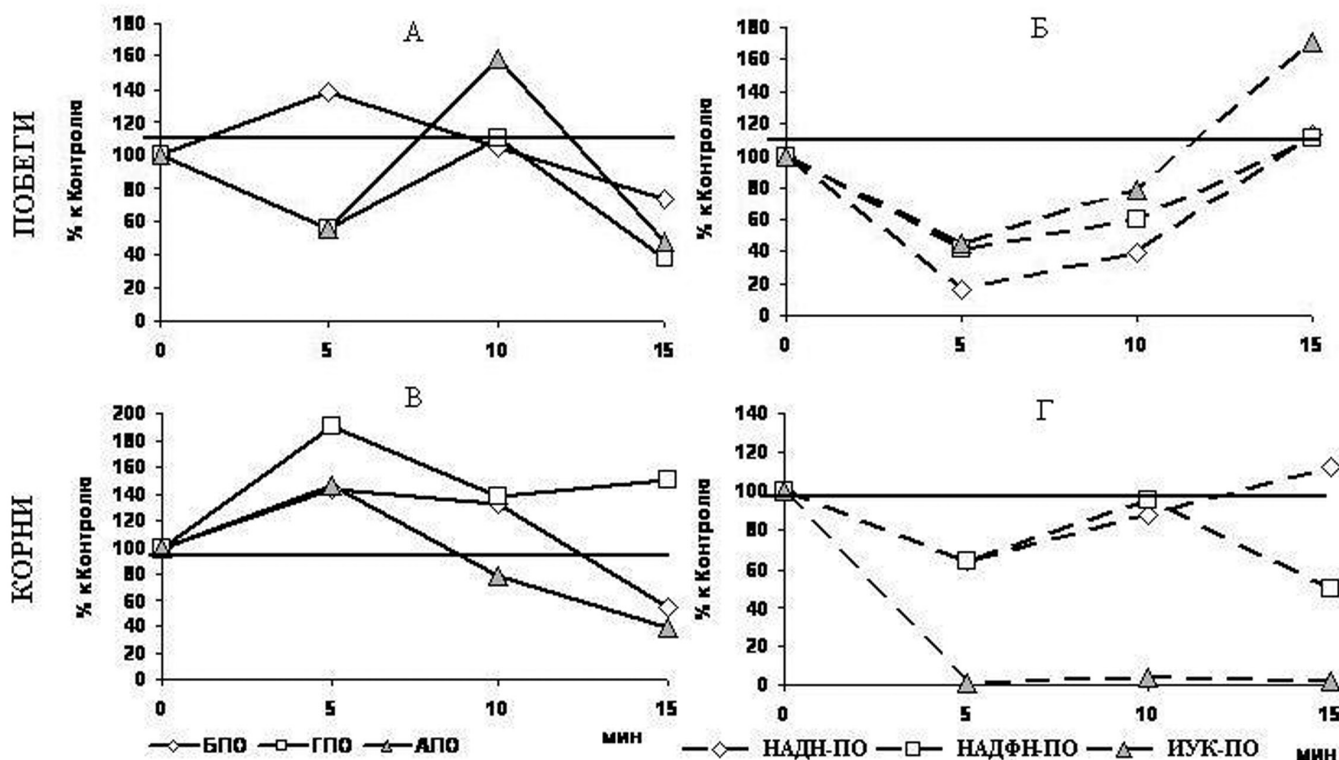


Рис. 2. Изменение антиоксидантной (А, В) и прооксидантной (Б, Г) активности пероксидазной ферментной системы в апопласте побегов и корней в процессе деэтиоляции проростков пшеницы

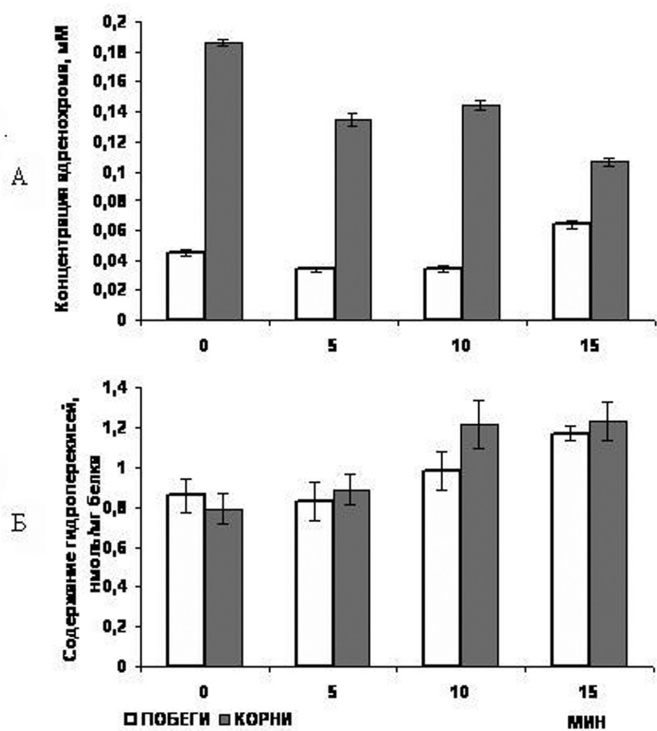


Рис. 3. Динамика генерации уровня супероксид-анион-радикала (А), гидропероксидных группировок (Б) в апопласте побегов и корней в процессе деэтиоляции проростков пшеницы

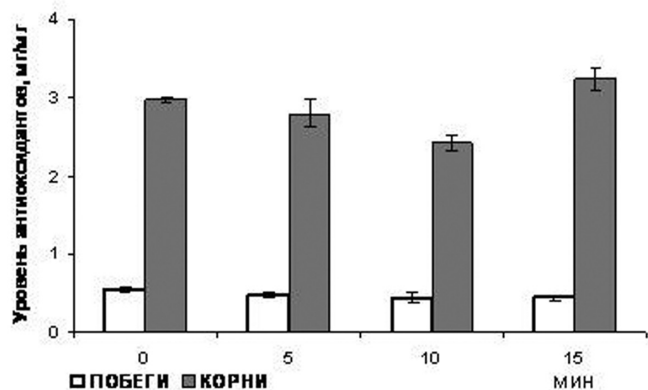


Рис. 4. Влияние света на содержание антиоксидантов в апопласте побегов и корней проростков пшеницы

Интересно отметить, что при 15-минутном световом воздействии уровни O_2^- и антиоксидантов в АОР побегов и корней проростков пшеницы изменялись по-разному. В надземных органах было отмечено увеличение в 1,4 раза O_2^- на фоне низкой антиоксидантной активности, в корнях — снижение содержания O_2^- в 1,8 раза и повышение антиоксидантов в 1,3 раза, соответственно. Надо полагать, свет, оказывая непосредственное влияние на надземные органы проростков, индуцировал в апопласте побегов накопление O_2^- и R-ООН (окислительный

взрыв); реакция корней в этих условиях, по-видимому, не может быть отнесена к стрессорной.

Сравнение динамики АФК и светозависимых изменений в активности пероксидаз АОР отдельных органов проростков пшеницы позволяют сделать вывод, что в побегах определяющую роль в реакции на свет играло смещение баланса пероксидазной системы в сторону прооксидантной активности. Как показывают результаты корреляционного анализа, быстрая первичная реакция падения АФК в апопласте побегов в процессе деэтиоляции связана преимущественно с увеличением антиоксидантной активности БПО (корреляция между активностью БПО и концентрацией R-ООН и O_2^- составляет -0,85 и -0,86, соответственно). В ответ на 15-минутную световую экспозицию возрастание O_2^- , R-ООН было обусловлено увеличением скорости окисления НАД(Ф)Н, ИУК. Наибольший коэффициент корреляции отмечен для ИУК-ПО (корреляция между активностью ИУК-ПО и концентрацией R-ООН и O_2^- составляет 0,87 и 0,96, соответственно). В корнях содержание O_2^- в процессе деэтиоляции, по-видимому, связано с активностями НАДФН- и ИУК-ПО ($r=0,88$ для обоих ферментов), вследствие чего снижение их активности является, по-видимому, одним из механизмов падения уровня АФК на свету. В накоплении R-ООН в апопласте корней важную роль играло, вероятно, уменьшение активности АПО ($r=-0,75$).

Таким образом, как следует из вышеприведенных результатов, изменения в пероксидазной ферментной системе вносят существенный вклад в регуляцию уровня АФК и пероксидазный отклик — это часть защитного механизма при действии на растения не только биотических, но и абиотических факторов внешней среды.

Ряд авторов [16] высказывает мнение, что растительные пероксидазы надо отнести к одной из групп маркеров стресса. Мы полагаем, что более информативным показателем являются изменения в пероксидазной ферментной системе, в частности, смещение баланса про-/антиоксидантной активности в сторону оксидантной функции ПО. Важна также оценка именно экстраклеточной пероксидазной активности, поскольку последняя суммирует модификации в структуре ферментативного белка плазматической мембраны, клеточной стенки. Все перечисленные параметры изменяются в процессе адаптации растений к факторам внешней среды. Например, в наших исследованиях были зафиксированы светозависимые изменения количества ГСБ, степени гликозилирования и соответственно полярности таких белков, что предполагает, в свою очередь, изменения их

связи с субклеточными структурами. Как итог — были выявлены неоднозначные изменения в пероксидазных системах побегов и корней деэтиолированных проростков пшеницы. Реакция растений на свет, как известно, опосредуется через систему фоторецепторов надземных органов, возбуждение которых может вызвать изменения в окислительно-восстановительном режиме и соответственно активности окислительно-восстановительных ферментов. Кроме того, нельзя исключить возможность прямого воздействия света на различные изоформы пероксидазного белка. ГСБ обладают способностью поглощать свет с длиной волны 403 нм, что не отрицает фотомеханизм изменения его каталитической активности. Действительно, ряду авторов удалось зафиксировать активацию некоторых металлоферментов, в частности, супероксиддисмутазы низкоэнергетическим красным лазером [8]. Однако в целом, вопрос о механизмах специфической активации отдельных изоформ фермента в побегах и корнях, так же, как об их участии в регуляции метаболизма АФК при изменении освещённости, остаётся пока открытым.

Заключение

Таким образом, показано, что в формировании ответа на смену светового режима в побегах определяющую роль играет сдвиг баланса про-/антиоксидантной функции в сторону оксидантной активности пероксидазы. Это, по-видимому, вызывает накопление супероксидного радикала и пероксида водорода в апопласте побегов (окислительный взрыв). В корнях индуцируется ответ другого типа, который связан со снижением пероксидазной, а также оксидазной активности пероксидаз. Данный процесс сопровождается увеличением содержания пероксида водорода и уменьшением концентрации супероксидного радикала в апопластном компартменте деэтиолированных проростков.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (ГК № 14.740.11.0732 от 12.10.2010).

Литература

1. Андреева В.А. Фермент пероксидаза. — М.: Наука, 1988. — 127 с.
2. Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандобина Л.М. Большой практикум по физиологии растений. — М.: Высшая школа, 1975. — 327 с.

3. Газарян И.Г. Биотехнология пероксидаз растений и грибов / Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. Т. 36. — М.: ВИНТИ, 1992. — С. 4–54.
4. Газарян И.Г., Хушпультян Д.М., Тишков В.И. Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений // Успехи биол. химии. — 2006. — Т. 46. — С. 303–322.
5. Досон Р., Элиот Д., Элиот У., Джонс К. Справочник биохимика. — М.: Мир, 1991. — 544 с.
6. Дэвени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды и белки. — М.: Мир, 1976. — 366 с.
7. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П., Перуанский Ю.В., Луковникова Г.А., Иконникова М.И. Методы биохимического исследования растений. — Л.: Агропромиздат, 1987. — С. 44–45.
8. Клебанов Г.И., Полтанов Е.А., Владимиров Ю.А. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения красного диапазона на активность супероксиддисмутазы макрофагов // Биофизика. — 2003. — Т. 48. — № 3. — С. 462–473.
9. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. — М.: Высшая школа, 1971. — 352 с.
10. Курганова Л.Н., Веселов А.П., Гончарова Т.А., Синицына Ю.В. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная система защиты в хлоропластах гороха при тепловом шоке // Физиол. раст. — 1997. — Т. 77. — № 5. — С. 725–730.
11. Максимов И.В., Черепанова Е.А. Про-/Антиоксидантная система и устойчивость растений к патогенам // Успехи соврем. биол. — 2006. — Т. 126. — № 3. — С. 250–261.
12. Осипенкова О.В. Роль ретроградных пластидных сигналов в экспрессии ядерных генов стрессовых белков ELIP1 и ELIP2 у *Arabidopsis thaliana*. Автореф. дисс. канд. биол. — М., 2009. — 26 с.
13. Паду Э.Х. Свойства пероксидазы и фениламмиак-лиазы при образовании и лигнификации клеточных стенок стебля пшеницы // Физиол. раст. — 1995. — Т. 42. — № 3. — С. 408–415.
14. Рогожин В.В. Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов. — СПб.: ГИОРД, 2004. — 240 с.
15. Рогожин В.В., Верхотуров В.В., Рогожина Т.В. Пероксидаза: строение и механизм действия. — Иркутск: ИГТУ, 2004. — 199 с.
16. Савич И.М. Пероксидазы — стрессовые белки растений // Успехи соврем. биол. — 1989. — Т. 107. — № 3. — С. 406–417.
17. Barber M.J., Kay C.J. Superoxide production during reduction of molecular oxygen by assimilatory nitrate reductase // Arch. Biochem. Biophys. — 1996. — Vol. 326. — P. 227–232.
18. Escribano J., Gandia-Herrero F., Caballero N., Pedreno M. A. Subcellular localization and isoenzyme pattern of peroxidase and polyphenol oxidase in beet root (*Beta vulgaris* L.) // J. Agric. Food Chem. — 2002. — Vol. 50. — P. 6123–6129.

19. *Fecht-Christoffers M.M., Fuehrs H., Braun Hans-Peter, Horst W.J.* The role of hydrogen peroxide-producing and hydrogen peroxide-consuming peroxidases in the leaf apoplast of cowpea in manganese tolerance // *Plant Physiol.* – 2006. – Vol. 140. – P. 1451–1463.
20. *Gibson D.M. Liu E.V.* Substrate specification of peroxidase isozymes in the developing pea seedling // *Ann. Bot.* – 1978. – Vol. 42. – P. 1075–1083.
21. *Loukili A., Limam F., Ayadi A., Boyer N., Ouelhazi L.* Purification and characterization of a neutral peroxidase induced by rubbing tomato internodes // *Physiol. Plant.* – 1999. – Vol.105. – P. 24–31.
22. *Ogawa S., Shira Y., Morishima I.* Calcium binding by horseradish peroxidase C and the heme environmental structure // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1979. – Vol. 90. – N. 2. – P. 674–678.
23. *Passardi F., Penel C., Dunand C.* Performing paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall // *Trends in Plant Science.* – 2004. – Vol. 9. – P. 534–540.
24. *Pogany M., Harrach B.D., Hafez Y.M., Barna B., Kiraly Z., Paldi E.* Role of reactive oxygen species in abiotic and biotic stresses in plants // *Acta phytopathol. et entomol. hung.* – 2006. – Vol. 41. – P. 23–35.
25. *Schloss P., Walter C., Mader M.* Basic peroxidases in isolated vacuoles of *Nicotiana tabacum* L. // *Planta.* – 1987. – Vol. 170. – P. 225–235.

CHANGES IN PEROXIDASE ACTIVITY, SUPEROXIDE RADICAL AND PEROXIDE HYDROGEN GENERATION IN THE WHEAT SEEDLINGS APOPLASTIC COMPARTMENT DURING THE DE-ETIOLATION

M.V. TOMILIN, L.N. OLYUNINA, V.S. SUHOV, A.A. BRILKINA, A.P. VESELOV

N.I. Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod

In the work dynamics of superoxide radical and peroxide hydrogen accumulation, antioxidants level, heme-containing proteins support, peroxidase (by benzidine, guaiacol, ascorbate oxidation) and oxidase (by NAD(F)H, IAA oxidation) activity peroxidase enzymatic system in the wheat seedlings shoot and root apoplast during the de-etiolation was investigated. The changes in pro-/antioxidant function balance of peroxidase activity in the direction of oxidant activity and as a result and peroxide hydrogen accumulation in the seedlings apoplast (oxidative burst) have been revealed play the main role in the forming of response on light conditions change. The other type of response connected with decrease in peroxidase and oxidase activity of peroxidase and superoxide radical production as well as revealed in the de-etiolated seedlings roots apoplastic compartment.

Keywords: *Triticum aestivum*, extracellular peroxidase, reactive oxygen species (ROS), light, regulation.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕСУРСНЫЕ ЦЕНТРЫ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ В РОССИИ И МИРЕ, ПРОБЛЕМЫ ОРГАНИЗАЦИИ, ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

Л.В. КАЛАКУЦКИЙ*, С.М. ОЗЕРСКАЯ

УРАН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино

В обзоре рассматривается современное состояние организации биологических ресурсных центров в мире и обсуждаются перспективы развития таких центров в Российской Федерации в свете рекомендаций Организации по экономическому сотрудничеству и развитию.

Ключевые слова: биологические ресурсные центры, коллекции культур, биотехнология, биоразнообразие, биобезопасность, биоэкономика.

Введение

Развитие науки и технологий требует расширения не только спектра познанного микробного биоразнообразия, но и области его практического использования, часть которых пока непредсказуема. Коллекции культур (КК) являются важными инструментами как первого, так и второго процессов, и потому оправданными выглядят усилия всех развитых в научно-техническом отношении стран по их укреплению и расширению.

В последние годы деятельность коллекций претерпевает значительные изменения: появляются новые виды биологических ресурсов (гены, библиотеки кДНК и др.); лавинообразно растет объем биологического материала, подлежащего депонированию в коллекциях; развиваются технологии обработки информации, связанной с депонированным биологическим материалом; создаются новые методологические подходы к идентификации и систематике организмов. В связи с появлением новых источников биологической опасности возрастает значение коллекций как гарантов безопасного использования биологического материала. Страхующая дальнейшее развитие страны функция коллекций заключается и в том, что доступ к подобному материалу в зарубежных коллекциях в любой момент может встретиться с затруднениями.

Исторически большая часть коллекций, поддерживающая основные фонды микроорганизмов в РФ, формировалась в бывшем СССР [7, 8, 9], их деятельность продолжает нести заметный отпечаток соответствующего времени. Для последнего были характерны такие черты, как декларируемое намерение «поддерживать непрерывный фронт» научных исследований и разработок в стране; надежды на преимущества централизованного планирования, координации и финансирования исследований и разработок; относительная изолированность от мировых тенденций рыночного, технологического и экономического развития; отсутствие серьезного интереса к правам любой негосударственной собственности и т.д. Все это сопровождалось наличием достаточно высоких ведомственных барьеров, призванных направить коллекционирование микроорганизмов учреждениями ведомств в первую очередь для использования в сферах их ответственностей (например, микробиологической промышленности, сельского хозяйства, медицины, обороны, образования и т.д.). Несколько особняком стояли коллекции академий и университетов, формировавшие свои фонды нередко с преимущественным учетом результатов своих собственных изысканий в области микробного разнообразия, генетики, экологии, биомедицины и др. Отсутствовали коллекции с правами самостоятельного юридического лица, а также коллекции, ориентированные полностью или частично на внебюджетную финансовую поддержку. Не существовало каких-либо надведомственных обязывающих профессиональных правил или стандартов, на которые могли бы ориентироваться все коллекции — за исключением правил санитарных, ветеринарных и фитосанитарных.

© 2011 г. Калакуцкий Л.В., Озерская С.М.

* **Автор для переписки:**

Калакуцкий Лев Владимирович

член-корреспондент РАН

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов

им. Г.К. Скрыбина РАН

142290 Московская область, г. Пущино, проспект Науки, 5

Первая попытка в нашей стране официально учесть зарубежный профессиональный опыт в области коллекционирования была сделана в начале 80-х годах XX века после ратификации Будапештского договора о взаимном признании депонирования в связи с патентной процедурой, после чего три коллекции из числа существовавших в СССР были обязаны начать выполнять функции МОД – ВКМ, ВКПМ и коллекция ВНИИ Антибиотиков. В то же время, согласно Правилам депонирования микроорганизмов (1990), национальная система депонирования вынуждена была опираться на несколько десятков коллекций, специализировавшихся в поддержании различных категорий биологических объектов (все обретшие независимость государства на территории бывшего СССР немедленно создали национальные коллекции — в первую очередь, с учетом нужд депонирования). Коллекции до начала 1990-х гг. выдавали культуры, за исключением депонированных, по запросам учреждений внутри страны, как правило, бесплатно, не вступая с последними в какие-либо правовые отношения, касающиеся дальнейших передач и/или характера использования культур.

За истекшие 15–20 лет произошел ряд событий, непосредственно затрагивающих области деятельности коллекций культур. На порядки величин выросли цифры, характеризующие обитающее на Земле био- (соответственно и гено-) разнообразие микроорганизмов; высокими темпами растет интерес к его дальнейшему изучению, возможному использованию, физическому обладанию новыми его представителями, их поддержанию *ex situ*. Последнему способствовало и провозглашение принципа национального суверенитета в отношении генетических ресурсов Конвенцией о биоразнообразии (ратифицированной РФ в 1995 г.). С учетом этого принципа разрабатываются и уточняются международные правовые механизмы доступа к генетическим ресурсам (Кодекс MOAICC [15]), (Боннское руководство [12]), трансграничным перемещениям ГМО (Картахенский протокол), оформлению депонирования (Практический Кодекс по депонированию, ВОИС [25]). Опубликованы также концепция ОЭСР, касающаяся биологических ресурсных центров (БРЦ) [10, 21–23, 26], Руководства ОЭСР для биологических ресурсных центров с учетом наилучшей практики (*best practice*) [10, 17], новое издание Руководства для коллекций культур Всемирной федерации коллекций культур и другие важные для деятельности коллекций материалы [26].

С другой стороны, в те же годы в самой РФ произошли радикальные изменения систем управления

и форм собственности, особенно в таких отраслях, как промышленность (включая биотехнологическую) и сельское хозяйство. Декларированы намерения РФ интегрироваться в мировую систему экономических и правовых отношений (вступить в ВТО и ОЭСР). В связи со всем этим характер «социального заказа» (и/или его распределения по сферам общественно необходимой деятельности), адресуемого коллекциям, может потребовать переосмысления. Изменяется и спектр пользователей как культурами микроорганизмов, так и услугами коллекций (ранее его составляли исключительно госбюджетные организации).

Концепция биологических ресурсных центров ОЭСР

В соответствии со Статьей 1 Конвенции, подписанной в Париже 14 декабря 1960 г., и вступившей в силу 30 сентября 1961 г., Организация по Экономическому Сотрудничеству и Развитию (ОЭСР) проводит согласованную политику в стремлении к достижению наивысшего жизнеспособного экономического роста, занятости и повышающегося уровня жизни в государствах-членах ОЭСР, поддерживая финансовую стабильность, и, таким образом, вносит свой вклад в развитие мировой экономики и мировой торговли на многосторонней, справедливой основе в соответствии с международными обязательствами.

Первые государства-члены ОЭСР — это Австрия, Бельгия, Канада, Дания, Франция, Германия, Греция, Исландия, Ирландия, Италия, Люксембург, Нидерланды, Норвегия, Португалия, Испания, Швеция, Швейцария, Турция, Великобритания и США. Следующие страны стали членами ОЭСР впоследствии — Япония (28 апреля 1964 г.), Финляндия (28 января 1969 г.), Австралия (7 июня 1971 г.), Новая Зеландия (29 мая 1973 г.), Мексика (18 мая 1994 г.), Чешская Республика (21 декабря 1995 г.), Венгрия (7 мая 1996 г.), Польша (22 ноября 1996 г.), Корея (12 декабря 1996 г.) и Словацкая Республика (14 декабря 2000 г.). В работе ОЭСР принимает участие Комиссия Европейского Союза (Статья 13 Соглашения ОЭСР).

В настоящее время ОЭСР — это достаточно обширная и могучая в различных отношениях организация, которая объединяет свыше 30, в основном, достаточно высокоразвитых стран. Россия с 1995 года является наблюдателем в этой организации и принимает участие в некоторых формах деятельности, которые осуществляет ОЭСР.

По мнению ОЭСР, адекватным ответом на новые требования развития биотехнологии [6] является концепция биологических ресурсных центров. Известно определение БРЦ [5], принятое в соответствии с этой концепцией.

БРЦ представляют собой важнейший элемент инфраструктуры, обеспечивающий развитие биотехнологии. БРЦ — это организации, предоставляющие услуги по хранению живых клеток, геномов и биоинформации, имеющей отношение к наследственности и функционированию биологических систем. В состав БРЦ входят коллекции культивируемых организмов, их воспроизводимых частей (геномов, плазмид, вирусов, образцов ДНК), жизнеспособных, но пока не культивируемых организмов, клеток и тканей, а также базы данных о поддерживаемых ресурсах.

БРЦ сохраняют коллекции биологического материала и связанной с ним информации [18] с целью облегчить доступ к сохраняемым *ex situ* биологическим ресурсам и гарантировать, что они останутся доступными для использования в процессе устойчивого развития.

Коллекции биологических (генетических) ресурсов — это объекты, действующие в соответствии с национальным законодательством, инструкциями и правилами [5], которые были созданы для осуществления различных ключевых функций, включающих в себя такие, как:

- сохранение и предоставление биологических ресурсов для развития научных, производственных, сельскохозяйственных, экологических, медицинских и биотехнологических процессов;
- использование этих биологических ресурсов, в том числе и коммерческое;
- сохранение биологического разнообразия;
- проведение научно-исследовательских работ по идентификации и изучению генетических ресурсов;
- создание резервного генофонда для поддержания исчезающих и восстановления исчезнувших видов;
- депонирование биологических ресурсов с целью защиты интеллектуальной собственности;
- предоставление информации, необходимой для формирования общественного мнения и государственной политики в отношении генетических ресурсов.

БРЦ, сформированные на основе наиболее авторитетных национальных коллекций [6], могут и должны способствовать развитию биотехнологии, биомедицины, сельского хозяйства и защите окружающей среды путем предоставления аутентичного биологического материала, необходимого как для исследований и разработок, так

и непосредственного промышленного использования. Расширяющаяся информационная база коллекций является незаменимым источником сведений для принятия управляющих решений в сферах оборота генетических ресурсов, устойчивого и безопасного использования организмов, их содержащих (в том числе полученных с использованием генетической инженерии, а также патогенных для человека, животных и растений).

БРЦ — это организация, предоставляющая услуги по хранению не только живых клеток, но и геномов, биоинформации, имеющей отношение к наследственности и функционированию биологических систем. Все эти виды деятельности, по мнению ОЭСР, должны быть объединены в биологических ресурсных центрах как мировой, так и европейской систем.

Условия организации БРЦ

Одним из главных условий организации БРЦ является доказательство наличия стратегии его длительного устойчивого существования, гарантий владельца и/или вышестоящей организации сохранения биологическим ресурсным центром функций сбора, поддержания и предоставления биологического материала в перспективе. Если есть такие гарантии и если есть доказательство длительного устойчивого существования, то вопрос аккредитации биологических ресурсных центров не рассматривается.

Именно это положение имеет особое значение для России. По инициативе Министерства промышленности и науки РФ проводилось анкетирование российских коллекций микроорганизмов в 2003 году. Полученные результаты показали, что в России свыше 100 микробных коллекций, являющихся лабораториями, отделами учреждений — институтов и других более крупных образований, которые, в свою очередь, принадлежат к ведомствам. Эти ведомства и эти учреждения в свое время и создали данные коллекции. Таким образом, отсюда следует, что гарантии сохранения функций и доказательство устойчивого существования коллекций должны давать те, кто создал эти организации. Сами эти организации дать гарантию своего существования в наших условиях не в состоянии.

Для формирования системы БРЦ правительствам стран, принявших Концепцию ОЭСР, рекомендуется разработать систему аккредитации БРЦ [6], избирательно подходить к укреплению уже существующих *ex situ* коллекций и способствовать созданию коллекций новых видов ресурсов, обеспечению БРЦ современными информационными технологиями.

Мотивы организации БРЦ

Главные мотивы создания БРЦ следующие [4]:

1. *Максимально полное удовлетворение растущего спроса науки, промышленности и образования на биологические и генетические ресурсы.*

2. *Формирование в нарастающем объеме и качестве. Управление ресурсами.*

3. *Обеспечение высокого качества выдаваемого материала и информации.* Качество выдаваемого материала и информации трактуется ОЭСР таким образом. Если объект попадает в коллекцию и имеет какие-либо характеристики, то выйти из коллекции он обязан с качествами и характеристиками более высокими. Это положение касается как характеристики объекта, так и уровня и качества информации, которая связывается с этим объектом, будь-то микроорганизм, клетка или какой-нибудь генный комплекс.

4. *Соблюдение единых стандартов в сфере передачи и приема информации, обеспечение интероперабельности узлов сети БРЦ.* Введение единых стандартов в сфере передачи и приема информации, обеспечение интероперабельности узлов сети БРЦ — это важный вопрос, которым до ОЭСР занималась Всемирная федерация коллекций культур (WFCC). Для того чтобы исключить дублирование и повышение качества информации, процессы должны быть интероперабельны, то есть должна иметься возможность доступа к каталогам различных коллекций и таким образом осуществляться обмен и передача данных о поддерживаемых в коллекциях объектах.

5. *Соблюдение единых требований по биобезопасности.* Введению единых требований по биобезопасности уделяется в последнее время повышенное внимание. В большей степени это касается микробиологических коллекций. Необходимо отметить, что по данному вопросу существуют различия в нашей стране и в мире. В России сложилась такая система, когда так называемые опасные и особо опасные возбудители имеются только в определенных коллекциях. В ОЭСР немного другой подход. Поскольку эти объекты принимаются, хранятся, передаются из БРЦ различным пользователям, то потенциально здесь некоторая опасность существует и на предотвращение нежелательных последствий тратятся всевозрастающие усилия.

6. *Создание БРЦ — новый и важный этап в эволюции инфраструктуры, обеспечивающей развитие биотехнологии.* БРЦ — это не какой-то чрезвычайно новый способ использования биологических объектов. По мнению ОЭСР — это эволюция инфраструктуры,

ее ключевой элемент, который поддерживает развитие биотехнологии.

Обобщая, можно сказать, что цель учреждения сети БРЦ в странах ОЭСР — создание новой генерации коллекций культур, работающих на более высоком уровне и способных удовлетворить растущие запросы пользователей (акцентируется биотехнология во всех ее аспектах) [24]. Во всех известных случаях за основу принимаются существующие коллекции культур или их объединения (даже входящих в состав различных учреждений). При этом исходят из представления, что это может содействовать как интересам государства, так и пользователей и самих коллекций. Государственное (в чьем бы лице оно ни воплощалось!) участие в трансформации коллекции культур → БРЦ является критически важным как минимум в следующих элементах.

I. Обеспечение стабильности существования коллекций культур. Что касается стабильности, то вопрос этот ясен в принципе: нет стабильности — не стоит беспокоиться о создании БРЦ, ибо «нестабильные БРЦ» могут быть лишь чисто номинальными образованиями, не имеющими перспектив развития. Характерно в этом отношении, что Европейская сеть БРЦ — благодаря специальной программе поддержки ЕС — уже функционирует (и включает в себя страны не только Западной, но и Восточной Европы), в то время как Глобальная сеть лишь приступает к развертыванию пилотного проекта.

II. Обеспечение лицензирования/аккредитации в процессе трансформации коллекций культур → БРЦ. Процедуры аккредитации/лицензирования существенны при любом пути формирования БРЦ, в том числе и по ведомственному принципу. Очевидно, что (за исключением специальных случаев, в которых конфиденциальность информации высока) эффективность лицензирования/аккредитации прямо зависит от уровня и ротируемости независимых экспертов, которые могут быть вовлечены в эти процессы, а также прозрачности последних. Отдельные позитивные элементы могут быть извлечены из российской практики как внутриведомственного (лицензирование образовательных и научных учреждений), так и межведомственного (пожарный и санитарно-эпидемиологический надзор, рецензирование грантовых проектов) лицензирования, а также систем управления качеством (в том числе с помощью аудита) в промышленности и банковском деле. Присоединение к GBRCN предполагает, однако, аудит силами выбранных этой организацией экспертов (одного — по науке и другого — по «процессу») с выездом их на место. Не прошедшие такого аудита коллекции культур не могут быть приняты в GBRCN, следовательно, и обладать

статусом БРЦ в понимании ОЭСР. Готовясь к упомянутому развитию событий, такие страны, как, например, Китай и Куба, приступили к осуществлению подготовительных совместных проектов силами своих коллекций культур с непосредственным участием приглашенных специалистов действующих европейских БРЦ. Если исходить из желательности формирования GBRCN-совместимых БРЦ, то вопросы создания механизма(-ов) аккредитации/лицензирования последних (в начале на национальном уровне) следует отнести к числу ожидающих срочного решения. Этот механизм желательно создать и начать испытывать безотлагательно, внося коррективы, исходя из накапливающегося опыта. Создавать его следует в рамках (или при) Министерстве образования и науки РФ, с последующим использованием позитивных элементов опыта другими заинтересованными ведомствами. В качестве экспертов министерством могут быть привлечены специалисты из РАН, РАМН, РАСХН и других профессиональных организаций. Уже этот этап, однако, потребует от МОН некоей политической воли, а также сил и средств. Готовность механизма лицензирования/аккредитации предполагает готовность некоторого количества коллекций культур соответствующие процедуры проходить и искомому уровню качества соответствовать. Очевидная проблема здесь носит характер «порочного круга»: уровень качества недостаточен — в том числе по причинам недостаточного финансирования; шансы получить дополнительное финансирование прямо связаны с предъявляемым качеством. По-видимому, было бы целесообразно обдумать некоторую программу переходного периода и дать шансы большему числу коллекций культур повысить качество. Это можно было бы сделать в программе конкурса по развитию инфраструктуры (или центров коллективного пользования), но с таким расчетом, чтобы участвующие в конкурсе коллекции культур конкурировали бы между собой или близкими по целям структурами.

III. Обеспечение безопасности. В своей текущей деятельности коллекции культур, желающие стать БРЦ, частично автономны, а частично очень связаны с существующей регулятивной средой.

Ничто теоретически не мешает коллекциям культур «примерять на себя» правила GLP, GMP или стандарты ISO, включаться в базы и сети WDCM, GBIF и т.д. С другой стороны, они не могут игнорировать действующие в Российской Федерации неудовлетворительные списки категоризации микроорганизмов по группам потенциальной опасности или контактировать с национальными компетентными или информационными

органами (в рамках КБР) за отсутствием в стране таковых. Слабо разработано законодательство о собственности на генетические (биологические) ресурсы, в результате чего коллекции культур не уверены в том, чьей собственностью и по какому мандату они управляют; буксует введение общепринятой практики использования соглашений о передаче биологического материала и т.д.

Маловероятно, что соответствующая регулятивная среда изменится к лучшему «сама собой». В интересах коллекций культур целесообразно было бы создать некий представляющий их интересы орган, который мог бы заняться конкретным (в том числе юридическим) анализом ситуации, выявлением особенно слабых мест в действующей системе регулятивов и разработкой рекомендаций по их последовательному устранению. В этом случае рабочие контакты со всеми ветвями государственной власти были бы особенно существенны.

БРЦ: руководства, степень готовности

Разработаны или разрабатываются пакеты документов, носящих характер руководств или стандартов. В настоящее время подготовлено общее руководство для всех БРЦ [20]. Закончена разработка и Руководства для биологических ресурсных центров, специализирующихся на микроорганизмах [16]. Что касается клеток животных, человека и растений, то руководства для этих БРЦ усиленно разрабатываются и, возможно, что в течение года, максимум трех лет, они будут завершены и вступят в действие. Опубликован сборник основных руководств по организации и деятельности БРЦ [17]. Понятно, что вся программа организации БРЦ пока нацелена на микроорганизмы и клетки. Это не значит, что в дальнейшем эти принципы и подходы не могут быть распространены на другие объекты, имеющие прикладное значение.

Требования, предъявляемые к коллекции, претендующей на получение статуса БРЦ [6], изложены в руководящих принципах ОЭСР (Guidance for the operation of biological resource centers [18]) и состоят из общих требований, предъявляемых ко всем БРЦ, и специализированных, отражающих специфику работы с конкретным видом материала (микроорганизмы, культуры клеток растений или животных и т.д.).

Общие требования включают в себя:

- гарантии устойчивого функционирования в течение длительного времени (с указанием источников финансирования);
- наличие квалифицированного персонала;

- обязательства по выполнению своих функций (в строгом соответствии с национальной нормативно-правовой базой): прием и хранение первичного образца, поддержание образцов (пересев, проверка идентичности) и др.;

- обязательства по ведению документооборота;
- ведение компьютерной базы данных с описанием депонированного биологического материала и его происхождения, доступной через Интернет;
- обязательства по использованию стандартных сред и реагентов для поддержания коллекций;
- обеспечение контроля качества биологического материала, проверки его на безопасность (или проверки соответствия декларированному уровню биологической опасности) и др.

БРЦ: примеры действующих (лицензированных) БРЦ в странах ОЭСР

Известно, что в мире их уже довольно много. В качестве примеров коллекций, которые уже аккредитованы и работают как БРЦ можно указать АТСС – Американскую Коллекцию Типовых Культур, DMSZ – Немецкую Коллекцию Микроорганизмов и Культур клеток, JCM – Японскую Коллекцию Микроорганизмов, которые представляют собой самостоятельные учреждения.

В отличие от них ВССМ – Бельгийские Координированные Коллекции Микроорганизмов – существуют в разных учреждениях: в университетах и институтах, которые объединены с помощью некой надстройки, которая и выступает как единое целое под названием «Бельгийские координированные коллекции». Это довольно интересный пример, показывающий несколько иной путь решения вопросов создания БРЦ, удовлетворяющих высоким уровням требований стандартов, и в то же время не требующий объединения различных коллекций, принадлежащих разным ведомствам, в одно учреждение, в одно юридическое лицо [11].

Напротив, Американский центр АТСС представляет собой единую частную, некоммерческую организацию, основанную в 1914 г. Центр расположен в г. Манассасе (штат Вирджиния), его здание занимает площадь более 10000 м², в нем имеются 200 холодильников. Коллекция содержит более 4000 клеточных линий человека, животных, растений и 1200 гибридом. В геномной коллекции хранятся 8 млн. клонируемых генов. Микробная коллекция располагает более 18000 линий бактерий (900 родов). В ней хранятся 2000 виру-

сов животных и 1000 вирусов растений. Центр обладает обширной коллекцией из более 49000 линий дрожжей и грибов (1500 родов) и 2000 линий простейших. АТСС ведет активную деятельность как внутри страны, так и в международном масштабе.

Все известные биологические ресурсные центры действуют в составе EBRCN – Сети европейских биологических ресурсных центров, EMbaRC – Консорциума европейских микробных ресурсов и GBRCN – Глобальной сети биологических ресурсных центров.

Биоресурсные центры инициируют решение вопросов в виде проектов, не только внутренних, но и проектов документов международного характера, на начальных этапах своего функционирования носящих добровольный характер. Хорошо известен Кодекс MOSAICC (Micro-Organisms Sustainable use and Access regulation International Code of Conduct) [15]. Он разработан авторитетным бельгийским биоресурсным центром и близко соответствует как букве и духу Конвенции о биоразнообразии, так и, в особенности, «Боннским руководящим принципам по обеспечению доступа к генетическим ресурсам и использования на справедливой и равноправной основе выгод от их применения» [12].

Что касается России, то пока остается открытым вопрос о необходимости и возможности организации БРЦ [1, 3]. Не решен и вопрос о том, сколько их должно быть и как они могут быть созданы:

- путем трансформации существующих коллекций при значительном улучшении качества,
- путем агломерации существующих коллекций,
- путем создания надстройки над существующими коллекциями по примеру бельгийских координированных коллекций,
- путем создания с нуля.

Информация о российских коллекциях культур

В России зарегистрировано около 100 коллекций культур микроорганизмов, принадлежащих учреждениям (10 ведомств) (<http://www.sevin.ru/collections/microorganisms.html>) [14]. Основные направления их деятельности следующие:

1. Пополнение фонда:
 - биоразведка и совершенствование таксономических процедур;
 - депонирование (патентуемых штаммов, типовых штаммов новых видов, итогов совместных разработок);
 - обмен (в том числе с зарубежными коллекциями).

2. Сохранение фонда.
3. Информационное сопровождение разработок. Каталоги и базы данных. Сетевые взаимодействия.
4. Выдача культур по заявкам пользователей.

Коллекции сильно различаются по объему и профилю своей текущей работы и уровню стабильности своего существования. Вызывает беспокойство периодическое бесследное исчезновение некоторых из них, в то время как создаваемые вновь вынуждены начинать свою деятельность с «чистого листа». Это отнюдь не способствует миссии коллекций, связанной с передачей опыта и знаний от поколения к поколению исследователей и обменом ими между субдисциплинами.

Крупные стабильно работающие коллекции культур микробов часто относят к категории «общественных» (public) коллекций. Связано это с тем, что услуги (культуры и информация), которые они предоставляют, могут быть востребованы любым сектором профессионального сообщества, вне связи с ведомственной принадлежностью запрашивающего их. Например, депонирование образцов типовых штаммов вновь описываемых видов позволяет широкому спектру исследователей, вне зависимости от их географического положения, вести работу по идентификации впервые выделяемых микроорганизмов (напротив, отсутствие типовых штаммов блокирует такие разработки). «Сохранение фонда эталонов» подразумевает не только современные технологии поддержания и характеристики широкого спектра культур (с разнообразными требованиями к среде), но и систематические ревизии фонда с учетом динамики результатов бурно протекающей революции в сферах классификации и номенклатуры микроорганизмов.

Формирование микробных коллекций в России началось в 30-е годы XX века, а пик их организации приходится на 50–60-е годы, когда были образованы в общей сложности 36 коллекций. Новая волна учреждения коллекций микроорганизмов началась в 90-е годы и продолжается до настоящего времени.

При анкетировании коллекции в начале 2000-х годов на вопрос о том, кому принадлежит коллекция, получены самые разнообразные ответы — 8 кураторов считают собственниками себя лично, 41 — лабораторию, 73 — институт и 13 — ведомство. Только две коллекции определяют свои фонды либо как «принадлежащие государству» — ВКПМ, либо как «федеральную собственность в управлении РАН» — ВКМ.

Наибольшее количество штаммов зафиксировано в объединенном фонде Министерства здравоохранения РФ, однако их оформление в виде каталогов проведено

лишь для 30% фонда. Обеспечение различных учреждений компьютерной техникой в настоящее время находится на относительно высоком уровне — 3/4 коллекций поддерживают информацию о коллекционных фондах в электронном виде. Тем не менее за последние годы были изданы (в печатном или электронном виде) каталоги только 27 коллекций из 104. Для сравнения: 9 коллекций САВРИ за последние годы выпустили 28 каталогов.

Очень важное исследование было проведено в отношении количества культивируемых штаммов в отечественных КК. По его результатам было проведено разделение на несколько категорий. К первой категории (более 7000 штаммов при наличии каталога) было отнесено всего 4 коллекции. Эти коллекции — ВКМ РАН, ВКПМ, коллекция Института «Микроб» и Музей живых культур Ростовского НИПЧИ. Все они функционируют более 40 лет и хорошо известны в России и за рубежом. В целом в их фондах хранятся около 45000 штаммов микроорганизмов, что составляет более 1/3 от совокупного числа сохраняемых коллекций культур.

Ко второй категории были отнесены 11 коллекций, имеющих каталоги и поддерживающих от 1001 до 7000 культур. Они принадлежат к шести различным ведомствам и поддерживают совокупно около 30000 штаммов. Широко известные коллекции в этой категории — это коллекции ВНИИСХМ, ВИЗРА, а также коллекция базидиальных грибов Ботанического института РАН.

Коллекции этих первых двух наиболее многочисленных по составу категорий могут рассматриваться в качестве возможной основы для организации в России биологических ресурсных центров.

Какое количество штаммов поддерживается всеми коллекциями в целом, оценить довольно трудно, поскольку не все коллекции приводят точные данные. Однако их приблизительное общее число составляет > 100000 штаммов.

Дублирование коллекций по поддержанию примерно одинаковых специализированных фондов возможно, хотя по результатам данного анкетирования говорить об этом трудно. В процессе подготовки объединенного каталога 2002 г. показано, что видовая специфичность некоторых коллекций достигает почти 100%, что говорит о безусловной значимости поддерживаемых фондов для сохранения биологического разнообразия. В любом случае дублирование по штаммам маловероятно, так как основная масса коллекций пополняет фонды за счет собственных работ по их выделению из природных источников.

Суммарный состав коллекционных фондов России охватывает практически все известные группы

микроорганизмов — бактерии (включая археи), грибы (включая дрожжи), микроскопические водоросли, простейшие, вирусы (включая фаги). Западные коллекции более активно развивают поддержание коллекций генов и генетических конструкций.

Методы поддержания штаммов в коллекциях довольно разнообразны. По данным анкетирования было выяснено, что основным, если не единственным, методом хранения поддерживаемых культур микроорганизмов в российских коллекциях все еще остается метод периодических пересевов и другие традиционные методы хранения. Это связано с простотой исполнения и дешевизной используемых методов, хотя они и не обеспечивают стабильное сохранение свойств организма. Аналогичные данные для Европейской сети коллекций культур представлены значительно более высокими показателями для криоконсервации и лиофилизации.

Наиболее употребительными методами характеристики поддерживаемых культур продолжают оставаться культурально-микроскопические и физиологические.

Молекулярно-биологические методы используются в 52 коллекциях Российской Федерации. Далее в порядке убывания следуют серологические и хемотаксономические методы, что заметно отличает российские коллекции от уровня западных. Использование современных методов характеристики культур обычно коррелирует с объемами коллекций, их направленностью, ведомственной принадлежностью и, как следствие, технической и научной оснащенностью.

Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ) стремится функционировать как общественная коллекция непатогенных микроорганизмов (сайт — www.vkm.ru), о чем свидетельствует статистика по выдаваемым и принимаемым ею культурам (рис. 1, 2).

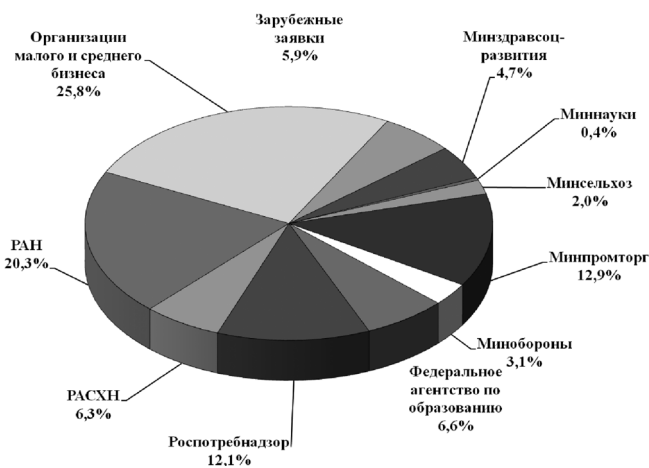


Рис. 1. Выдача культур ВКМ



Рис. 2. Депозиторы культур в ВКМ

До некоторой степени приведенная статистика отражает динамику процессов НИОКР в целом по стране. Привлекает внимание, в частности, неуклонно возрастающая активность предприятий малого и среднего бизнеса. Судить о деталях использования культур этими организациями коллекция не может, поскольку такая информация, как правило, не публикуется. Судьба коллекционных штаммов, выдаваемых в научные и образовательные учреждения, наоборот, хорошо отслеживается по открытым публикациям, где «цитируемость» штаммов «ВКМ» также возрастает. Судя по публикациям, большая часть выданных ВКМ штаммов используются либо в качестве эталонных в работах по биоразведке, либо при разработке и совершенствовании различных биотехнологических процессов. Существует и категория «потенциальных пользователей», о которой можно судить по числу «электронных визитов» на сайт ВКМ (более 3800 посещений в сутки).

Финансирование коллекций культур в РФ

Известна общая схема финансирования коллекций в России — бюджетное и внебюджетное финансирование. Внебюджетное — это плата за культуры, оплата работ по договорам и т.д. Бюджетное финансирование представляет собой некое базовое финансирование через бюджеты учреждений и ведомств. Возможно и так называемое «поощрительное финансирование», то есть финансирование по различным программам, которые представляют собой не адресную, а временную конкурсную поддержку. Суть реформы, которая в настоящее время проводится в науке, заключается в том, чтобы снизить уровень бюджетного базового финансирования и максимально увеличить это поощрительное финансирование за счет участия сотрудников различных научных учреждений в программах, грантах и т.д. При этом необходимо констатировать, что такой

способ финансирования и поддержания для коллекций не адекватен, потому что главное условие, которое было сформулировано выше, относительно гарантий непрерывного существования в течение длительного времени подобного рода поддержка не обеспечивает. Он не создает гарантий стабильности существования коллекций и сосредоточения их на основной деятельности. В то же время федеральных и региональных программ адресной поддержки коллекционной деятельности, преследующей те цели, которые были перечислены в задачах БРЦ, практически не существует.

Следствием такого положения являются естественные конкурентные процессы, в результате которых начинается перетекание сотрудников, оборудования и т.д. туда, где эти условия лучше. Коллекции в настоящее время финансируются по остаточному принципу. Положение можно было бы кардинально улучшить, развив блок федеральных и региональных программ адресной поддержки коллекций России, связав их с концепцией БРЦ, которая развивается и в странах, где по максимуму развиты системы конкурсного финансирования в том случае, если это касается научных исследований.

В результате существующего подхода к финансированию фонды российских коллекций значительно проигрывают при сравнении с фондами биологических ресурсных центров развитых стран ОЭСР. Положение это достаточно тревожное, и оно продолжает меняться к худшему, поскольку страны ОЭСР, в отличие от России, постоянно укрепляют систему БРЦ. Необходим долговременный механизм финансовой поддержки развития инфраструктуры, обогащения и сохранения фондов. При этом место конкурсного «поощрительного» финансирования занимает довольно сложная система аудита и сертификации коллекций.

В настоящее время положение таково, что подавляющая часть действующих коллекций культур в РФ входит в структуру государственных учреждений, но не является юридическими лицами. КК действуют и финансируются в рамках вертикали: ведомство → учреждение → коллекция культур.

Соответственно можно ожидать, что при нормальном ходе процесса апелляции по поводу желательности организационных изменений или недостаточности финансирования должна идти в обратном направлении: коллекция культур → учреждение → ведомство. То есть при наличном положении вещей для коллекций культур «государство» персонифицируется в образах учреждения (держателя) и ведомства.

Ведомства имеют свои задачи и свои бюджеты и совершенно не ясно, предполагают ли они и далее решать вопросы существования, оценки уровня и планов своих коллекций исключительно самостоятельно или считают желательной некоторую консолидацию усилий. В масштабе реального времени ведомства вряд ли согласятся создать некий «надведомственный фонд» для покрытия расходов гипотетического проекта по развитию сети БРЦ в РФ, хотя у такого варианта и могли бы быть известные преимущества. Помимо финансовых соображений, препятствовать такому развитию событий будет и отсутствие юридического статуса у коллекций культур, их соподчиненность учреждениям, в составе которых они функционируют. Стоит напомнить и о том, что Глобальная сеть биологических ресурсных центров (GBRCN) склонна рассматривать себя не как «клуб коллекций культур», а как организацию их собственников.

Более реалистичной в данный момент представляется попытка строительства БРЦ по ведомствам, за их счет и с оставлением им прав определять профили и общие направления деятельности принадлежащих им коллекций. В случае желания и возможностей часть последних могла бы трансформироваться в БРЦ, но при условии доступности соответствующей информации. В качестве таковой могли бы быть использованы как ныне анализируемая информация ОЭСР по БРЦ, так и другие документы международных организаций, с которыми ведомства традиционно работают (Минсельхоз России — ФАО, Минздравсоцразвития России — ВОЗ, Минприроды России — КБР и т.д.).

Способы формирования системы БРЦ в РФ

Россия — не первая страна, столкнувшаяся с подобными проблемами реорганизации коллекций культур. Ряд мероприятий по выходу из исторически сложившейся ситуации с коллекциями уже успешно апробируется в развитых в научно-техническом отношении государствах, а также активно развивающихся странах третьего мира. Речь идет, в первую очередь, о двух из них, взаимосвязанных:

- создании биологических ресурсных центров,
- организации сетевых взаимодействий между ними.

БРЦ, как правило, создаются на базе крупных коллекций культур или их агломератов. Ныне функционирующие БРЦ исходно представляли собой известные коллекции микроорганизмов, но их объем и спектр функций были расширены. Введен в действие

разработанный экспертами ряд стандартов, касающихся вопросов содержания каталогов, биобезопасности, биоинформатики и т.д. (см. руководство ОЭСР на сайте http://www.oecd.org/document/36/0,3746,en_2649_34537_38777060_1_1_1_1,00.html)[13].

Предполагаемая выгода для потребителя, обращающегося за культурами и информацией в любой БРЦ, заключается в том, что он вправе рассчитывать на биоматериал сопоставимого качества. С другой стороны, совмещение ряда взаимосвязанных функций в рамках БРЦ превращает последние в важные «центры экспертизы», вовлекая профессионалов в «управление ресурсами». Такая деятельность подразумевает, в частности, использование последних достижений передовой практики для коррекции планов, а также совершенствование и гармонизацию различных регулятивов, правил, стандартов, носящих про- (а не ретро!) активный характер.

Таблица 1

Прогнозируемые варианты действий и результатов по развитию системы БРЦ в России

Вариант действий	Комментарий к результату
1. Ничего не делать	Спокойно, но накопленное отставание будет продолжать нарастать, фонды «самоликвидироваться» или стихийно приватизироваться
2. Все существующие коллекции переименовать в БРЦ (в заявительном порядке, по ведомствам)	Лицензирование и аудиты по уровню требований ОЭСР БРЦ в ближайшем будущем не пройдут
3. Создать заново (с ограничением числа)	Дорого и хлопотно. Для коллекций важен опыт и итог предшествующей деятельности
4. Учреждения, включающие в себя коллекции, трансформировать в БРЦ «целиком»	Может потребовать жестких административных решений сомнительной популярности
5. Агрегировать существующие коллекции в ограниченное число БРЦ (по ведомствам?)	Относительно просто в рамках одного ведомства (и учреждения). Реальность межведомственной передачи фондов сомнительна
6. Агрегировать только информационные ресурсы коллекций	Проблема длительной целевой поддержки. Кто и почему готов ее оказать? Одноразовая акция не эффективна

Это важно для общества в условиях перехода к биоэкономике и интеграции в мировую инфраструктуру биотехнологии. Наконец, функционирование БРЦ теснее связывает интегральный вклад коллекций с нуждами общества в целом, позволяя выйти из опасной ситуации, при которой отдельные функции (или услуги) коллекций нужны разнообразным потребителям, а существование и стратегия их развития является их «личным делом», подчас «общественной нагрузкой».

Какова возможная тактика в отношении развития сети БРЦ в России? В таблице 1 представлены несколько вариантов действий. Легким на первый взгляд представляется только путь 1. Однако он все-таки тупиковый, не соответствующий национальным общественным интересам. Поэтому остаются пути более трудные, но по которым уже прошли многие страны.

Сертификация и критерии качества для БРЦ

ОЭСР разработаны механизмы национальной сертификации (независимого аудита третьей стороной) биологических ресурсных центров и определены общие руководящие принципы для ее проведения [18]. Следование этому руководству обязательно для всех БРЦ, которые являются частью Глобальной сети биологических ресурсных центров. Данный документ основан на «Руководстве ОЭСР по деятельности Биологических ресурсных центров» (2003), которое имеет два уровня:

1. Общие требования по деятельности биологических ресурсных центров, которые являются обязательными для всех БРЦ, являющихся членами GBRCN (Часть 1) [19].

2. Домен-специфические критерии для различных типов биологического материала и обязательные для БРЦ, которые являются членами GBRCN:

- Часть 2: руководство по деятельности Биологических ресурсных центров в области микроорганизмов [20];
- Часть 3: Руководство по деятельности Биологических ресурсных центров в области клеток животных;
- Часть 4: Руководство по деятельности Биологических ресурсных центров в области клеток человека;
- Часть 5: Руководство по деятельности Биологических ресурсных центров в области клеток растений.

Оба уровня связаны с механизмом контроля и наблюдения за деятельностью БРЦ, основанного на научной, технической и административной экспертизе.

Те коллекции биологических ресурсов, которые получают свидетельство национальной сертификации через независимый аудит со стороны третьего лица, становятся членами Глобальной сети биологических ресурсных центров.

Общие правила сертификации БРЦ

Чтобы получить статус БРЦ — члена GBRCN, коллекция (кандидат) биологических ресурсов должна пройти процесс сертификации, утвержденный национальным законодательством, либо через сертифицирующий орган, признанный правительством данного государства, либо через прозрачную процедуру сертификации, признанную правительством, либо через сертификацию непосредственно правительством.

Правительства стран-участниц ОЭСР должны гарантировать, что их соответствующее сертифицирующие органы являются независимыми, квалифицированными и не имеют никаких конфликтов интересов с БРЦ, запрашивающими свидетельство о сертификации.

Сертификация должна быть основана на соответствии авторитетным документам, отобранным национальными правительствами и входящими в руководство ОЭСР:

- Руководство ОЭСР по деятельности Биологических ресурсных центров: общие требования для всех БРЦ». Часть 1. (2003) [19].
- Дополнительных домен-специфических руководств ОЭСР по деятельности Биологических ресурсных центров. Части 2–5 (2003) — Часть 2 [20].

Дальнейшая ревизия общих и домен-специфических критериев в этих стандартах будет проводиться и одобряться управляющим советом GBRCN.

Механизмы сертификации БРЦ

Если организация обладает несколькими коллекциями различных типов, то каждая из них должна отвечать общим и домен-специфическим требованиям, чтобы вся организация получила статус БРЦ.

Процедура сертификации должна соответствовать следующим пунктам:

- сертифицирующий орган должен гарантировать, что процедура сертификации прозрачна и открыта для третьих лиц;
- процедура сертификации должна включать регулярную ревизию и быть продуктивной;

- процедура сертификации должна включать возможность обжалования решения об отказе в сертификации;

- сертификация может быть отозвана в случае, если коллекция не в состоянии выполнить необходимые требования применяемого стандарта.

Общие критерии БРЦ

Сертифицированные БРЦ должны соответствовать:

- национальным законодательствам, нормативным актам и правилам относительно приобретения, сохранения, использования, включая справедливое и равноправное разделение выгод, являющихся результатом использования генетических ресурсов, и распределения биологических ресурсов и информации о них;
- нормативным актам тех стран, куда перемещаются биологические материалы через национальные границы;
- национальным соглашениям, договорам, принципам и рекомендациям.

В сертификате БРЦ отражается высший уровень опасности, поддерживаемых в коллекции биологических объектов.

Как общее Руководство ОЭСР для всех БРЦ, так и домен-специфические документы (по микроорганизмам, клеткам животных, человека и растений, а также биобезопасности и биоинформатике) в достаточной степени характеризуют «идеальный образ» БРЦ [19, 20]. Очевидно, что в будущем по образу и подобию указанных БРЦ при желании и необходимости могут быть созданы БРЦ по любым биологическим объектам. Разработки ОЭСР могут быть взяты за основу и далее привязаны к российским реалиям в степени, не нарушающей их потенциальную интероперабельность с глобальными и европейскими сетями. Таким образом, ответ на вопрос, «куда идти?», относительно ясен [2]. Гораздо менее ясен ответ на вопрос, «каким путем(-ями) идти?».

В заключение можно сказать, что сценарий одномоментного превращения сотен существующих КК в БРЦ не представляется реальным. Скорее это будет процесс, состоящий из ряда этапов. Было бы полезно определить цели, характер, содержание и реальность выполнения каждого, затем состыковать и последовательно выполнять их.

Концепция ОЭСР может быть взята за основу для подготовки нормативно-правовых актов [6], регулирующих деятельность российских национальных коллекций генетических ресурсов.

Литература

1. Калакуцкий Л.В. Биоразнообразие и доступ к генетическим ресурсам // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2006. — Т. 2. — № 1. — С. 63–68.
2. Калакуцкий Л.В. Quo vadis? 2006.
3. Калакуцкий Л.В. Вопросы для обсуждения на первом заседании Рабочей группы по разработке концепции БРЦ в России. 24.01.2006 (рукопись).
4. Калакуцкий Л.В. Доклад на 1-м заседании Рабочей группы по разработке концепции создания БРЦ в России. 24.12.2005 г. (рукопись).
5. Калакуцкий Л.В. Доклад на МВК по биотехнологии. 19.03.2003 г. (рукопись).
6. Мошенцева В.Н. Проблемы развития российских коллекций национальных генетических ресурсов. Пояснительная записка для Рабочей группы по разработке концепции БРЦ в России. 2005 (рукопись).
7. Озерская С.М., Кочкина Г.А., Иванушкина Н.Е. Доклад на совещании 15.11.2005 (рукопись).
8. Озерская С.М., Кочкина Г.А., Иванушкина Н.Е., Запрометова К.М., Еремина С.С., Князева Е.В. Состояние коллекций микроорганизмов в России // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2006. — Т. 2. — № 3. — С. 51–81.
9. Отчет ВКМ ИБФМ РАН по государственному контракту МПН РФ. 2003 (рукопись).
10. Рецензия на сборник «Руководства ОЭСР для биологических ресурсных центров с учетом наилучшей практики. (OECD best practice guidelines for biological resource centres. OECD, 2007, 115 p.)» (рукопись).
11. Belgian Co-coordinated Collections of Micro-organisms Newsletter. Edition 18-05-2006. Article 3.
12. Bonn Guidelines on Access to Genetic Resources and Fair and Equitable Sharing of the Benefits Arising out of their Utilization. The Secretariat of the Convention on Biological Diversity. Montreal, Quebec, Canada. 2005 / Боннские руководящие принципы по доступу к генетическим ресурсам, справедливому и равноправному соучастию в выгодах, вытекающих из их использования / Пер. на рус. яз. — 25 с. (рукопись).
13. http://www.oecd.org/document/36/0,3746,en_2649_34537_38777060_1_1_1_1,00.html
14. <http://www.sevin.ru/collections/microorganisms.html>
15. MOSAICC — Micro-Organisms Sustainable use and Access regulation International Code of Conduct. BCCM. Belgium. November 2000. MOSAICC / Международный Кодекс по Регулированию Доступа и Устойчивого Использования Микроорганизмов / Пер. на рус. яз. — 27 с. (рукопись).
16. Nelawu Malanda. Strengthening the BCCM corporate identity with multi-site ISO 9001:2000 certification. Belgian co-ordinated collections of microorganisms Newsletter. Edition 18-05-2006. Article 2.
17. OECD best practice guidelines for biological resource centres. — OECD, 2007. — 115 p.
18. OECD Global forum on knowledge economy. Guidance for the operation of biological research centres (BRCs). Certification and quality criteria for BRCs.
19. OECD Global forum on knowledge economy. Guidance for the operation of biological research centres (BRCs). Part 1: General Requirements for all BRCs. 2003.
20. OECD Global forum on knowledge economy. Guidance for the operation of biological research centres (BRCs). Part 2: Micro-organism Domain. 2003.
21. OECD Global forum on knowledge economy. Guidance for the operation of biological research centres (BRCs). Certification and quality criteria for BRCs / Глобальный форум ОЭСР по экономике знаний: Биотехнология. Руководство по оперативной деятельности биологических ресурсных центров (БРЦ). Критерии сертификации и качества / Пер. на рус. яз. — 5 с. (рукопись).
22. OECD Global forum on knowledge economy. Guidance for the operation of biological research centres (BRCs). Certification and quality criteria for BRCs. Part 1: General requirements for all BRCs / Глобальный форум ОЭСР по экономике знаний: Биотехнология. Руководство по оперативной деятельности биологических ресурсных центров (БРЦ). Часть 1: Общие требования для всех БРЦ / Пер. на рус. яз. — 20 с. (рукопись).
23. OECD Global forum on knowledge economy. Guidance for the operation of biological research centres (BRCs). Certification and quality criteria for BRCs. Part 2: Micro-organism Domain / Глобальный форум ОЭСР по экономике знаний: Биотехнология. Руководство по оперативной деятельности биологических ресурсных центров (БРЦ). Часть 2: Микроорганизмы / Пер. на рус. яз. (рукопись).
24. Stackenbrandt E. Diversification and focusing: strategies of microbial culture collections // Trends in Microbiology. — 2010. — Vol. 18. — P. 283–287.
25. The Budapest Treaty: Code of Practice for IDAs. Ed.: M. Bosschaerts. BCCM. Belgium. 1998. 24 p. / Будапештский договор: Практический кодекс для международных органов по депонированию. Ред. М. Босхертс. Бельгийская координационная коллекция микроорганизмов. Бельгия. 1998. 24 с. / Пер. на рус. яз. // Микробиология. — 1999. — Т. 68. — № 3. — С. 423–430.
26. World Federation for Culture Collections Guidelines for the Establishment and Operation of Collections of Cultures of Microorganisms. 3rd Edition, February 2010. — 19 p. / Пер. на рус. яз. (рукопись).

Список сокращений:

БРЦ — биологический ресурсный центр,
ВКМ — Всероссийская коллекция микроорганизмов,
ВКПМ — Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов,
КБР — Конвенция о биологическом разнообразии,
КК — коллекция культур,
МОИС — Международная Организация Интеллектуальной Собственности,
ОЭСР — Организация по Экономическому Сотрудничеству и Развитию,
АТСС — American Type Culture Collection,
ВССМ — Belgium Co-ordinated Collections of Micro-organisms,

CABRI — Common Access to Biological Resources and Information,
DMSZ — Deutsche Sammlung von Microorganismn und Zellkulturen GmbH,
EBRCN — European Biological Resources Centres Network,
EMbaRC — European Consortium of Microbial Resources Centres,
GBIF — Global Biodiversity Information Facility,
GBRCN — Global Biological Resources Centres Network,
JCM — Japan Collection of Microorganisms,
OECD — см. ОЭСР,
WDCM — World Data Centre for Microorganisms,
WFCC — World Federation for Culture Collections.

**BIOLOGICAL RESOURCE CENTRES: CURRENT STATUS IN RUSSIA
AND THE WORLD, PROBLEMS OF ORGANIZATION,
DEVELOPMENT PROSPECTS**

L.V. KALAKUTSKY, S.M. OZERSKAYA

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

In the report examines the current state of organization of biological resource centres in the world and discusses the prospects of such centres in Russia in light of the recommendations of the OECD.

Keywords: biological resource centres, culture collections, biotechnology, biodiversity, biosafety, bioeconomics.

ТЕРМОХИМИЧЕСКАЯ КОНВЕРСИЯ, ГАЗИФИКАЦИЯ И СЖИЖЕНИЕ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНОЙ БИОМАССЫ

В.В. МЯСОЕДОВА*

ООО «Инжиниринговая компания ГРАНТЕК», Москва

Представлен обзор с использованием собственных данных по вопросам термического разложения, пиролиза и газификации биомассы.

Ключевые слова: биомасса, лигноцеллюлоза, термохимическая конверсия, биотопливо.

1. Введение

Рост цен на традиционные энергоносители на основе углеводородных ископаемых и, прежде всего, объявленные Правительством Российской Федерации планы изменения цен на природный газ и их повышение до европейского уровня к 2011 году приводят к необходимости технических и технико-экономических решений, обеспечивающих дополнительное вовлечение в топливный потенциал страны энергоносителей на основе возобновляемого лигноцеллюлозного сырья.

Россия, как известно, богата не только углеводородными ископаемыми сырьевыми, но и биоэнергетическими ресурсами: ее культурные пахотные земли включают 9% общих мировых запасов однолетних лигноцеллюлозных материалов, а леса хранят в себе 25% мировых запасов древесины (многолетние лигноцеллюлозные материалы). При этом ископаемые виды топлива доминируют в топливных балансах транспорта, производства тепла и электроэнергии. Стратегия развития энергетики в России до 2020 года (утвержденная Постановлением Правительства РФ № 1234 от 28.08.2003), в которой обозначена необходимость более активного использования торфа и различных типов отходов, включая твердые муниципальные отходы и остатки лесохимического производства/сельского хозяйства, при производстве тепла и электроэнергии, предполагает увеличение доли возобновляемых источников энергии в объеме общего энергопотребления до 7% после 2020 года. Технический

потенциал биомассы в России составляет 53 млн. т в угольном эквиваленте.

Возобновляемые источники энергии на основе лигноцеллюлозного сырья могут предоставить широкий спектр энергетических услуг в течение длительного времени. Они могут обеспечить надежные поставки тепла, электричества, энергии для транспорта без эмиссий парниковых газов и влияния на климат (в соответствии с Киотским протоколом) (рис. 1).

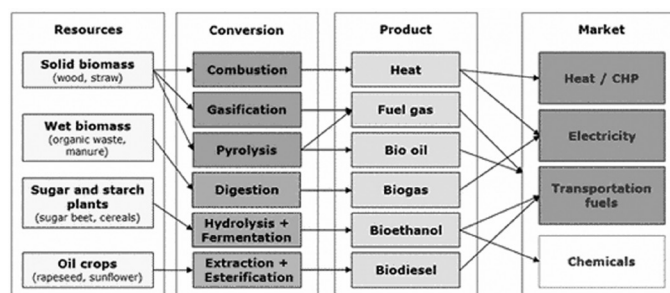


Рис. 1. Процесс конверсии биомассы в тепло- и электроэнергию, топливо и химические продукты

Как отмечено в Плане развития технологий на основе биомассы Комиссии Европейских Сообществ, на данный момент из биомассы производится 4% от общего числа необходимой энергии, а к 2020 году этот показатель возрастет до 20%. В энергетическом балансе Российской Федерации по-прежнему будут преобладать ископаемые топлива. Следует также отметить, что РФ находится на третьем месте в списке государств с максимальными выбросами CO₂ после США и КНР.

Ратификация Россией Конвенции ООН об изменении климата 1994 года (Киотский протокол) дает понять, что необходимо искать и применять новые стратегии по снижению эмиссий углекислого газа. Более того, недавно была принята Стратегия ООН развития энергетики до 2030 года, которая предполагает расши-

рение сферы применения возобновляемых источников энергии с целью увеличения их доли в энергопотреблении до 7%. По некоторым оценкам, частичный переход от ископаемых топлив к биомассе в России позволит сохранить от 10 до 20 млн. т ископаемых углеводородов и угля в год. Кроме того, будет снижена эмиссия углекислого газа в атмосферу. Использование биомассы может создать дополнительные инвестиционные стимулы для регионов путем исключения дотаций и возникновения новых рабочих мест.

В настоящее время в России существуют два основных направления производства энергии из биомассы:

- использование отходов лесохимического производства и деревопереработки для выработки тепла и электроэнергии, производства топливных пеллет и брикетов на экспорт (основная часть) и для внутреннего рынка;
- производство жидких биотоплив для транспорта — биодизеля и биоэтанола.

Располагая большими запасами растительного сырья, отходы которого можно использовать в качестве топлива, российские предприятия не могли ранее их реализовать на внутреннем рынке и на рынке Европы из-за ряда трудностей, обусловленных особенностями отходов биомассы — их низким насыпным весом (80–250 кг/м³) и высокой влажностью. Эти трудности касаются складирования, транспортирования, полноты сжигания и др. Решение указанной проблемы возможно за счет увеличения насыпного веса и теплового эффекта сгорания путем гранулирования, то есть производства топливных гранул.

Несмотря на факт развития отрасли производства топливных пеллет и оптимистические прогнозы, производство энергии из биомассы сталкивается с рядом преград, которые препятствуют ее широкому распространению (как в России, так и в странах ЕС).

Возобновляемое сырье для твердого биотоплива представляет собой целлюлозно-лигнинные смеси в составе однолетних сельскохозяйственных растений, многолетних растений — древесины (в виде щепы, кусков, стружки, опилок, порошка), а также отходы целлюлозно-бумажных промышленных производств и животного происхождения в пеллетированном или брикетированном виде. Из биомассы производится не только жидкое или газообразное топливо для транспорта, но и твердое топливо как для печей, каминов и котлов автономных жилищ, так и для ТЭЦ малой и средней мощности.

В программе Комиссии ЕС по внедрению возобновляемых источников энергии поставлена задача: в течение ближайших 10 лет в три раза увеличить производство

энергии из возобновляемых источников. Предполагается, что к 2010 году 12% энергии должно получаться за счет возобновляемого топлива, в том числе 5,5% — из твердой биомассы. При этом доля биотоплива возрастет до 74% от общего вклада возобновляемых источников энергии.

Впервые древесные гранулы были произведены в США и использованы для экономии на перевозке отходов. В Европе первооткрывателем данного направления возобновляемой энергетики считается Швеция, где в 1984–1988 гг. начали изготавливать гранулы из остатков деревообработки с последующим их применением для отопления. С начала 90-х годов в Швеции начался бум промышленного производства древесных гранул. Затем стремительное развитие получает изготовление гранул в Канаде, Австрии, Нидерландах, Финляндии, Норвегии, Франции, Италии. Например, в Германии производство гранул началось в 1998 году.

За последние годы в Западной Европе, Северной Америке и Японии резко растет производство гранулированного биотоплива. Биогранулы, в отличие от исходной биомассы, имеют относительно высокую насыпную плотность (600–700 кг/м³), низкую влажность (менее 10%), относительно высокую теплоту сгорания (в среднем 20 МДж/кг).

Согласно данным, представленным на «European Pellets Conference» (2007 г.), наибольшее количество биогранул (около 1,5 млн. тонн в год) производится в Швеции; более 1,0 млн. тонн гранул в год производится в Канаде и США. В России производится, по тем же данным, около 400 тыс. тонн биогранул в год. Россия занимает 8-е место в мире по производству гранулированного биотоплива (тогда как еще в 2004 году их производство в России практически отсутствовало).

В наших исследованиях была изучена структура пеллет с помощью Фурье-микроскопии (рис. 2, 3).

2. Основные направления деятельности в области биоэнергетики ООО «Инжиниринговая компания ГРАНТЕК»

2.1. Общие сведения

Нами разработаны и запатентованы рецептуры и технологии для производства топливных пеллет, гранул, брикетов (как на основе воспроизводимого сырья, например, опилок и других отходов лесохимической и деревообрабатывающей промышленности, отходов ЦБК, агропромышленного комплекса, так и любых углеродсодержащих соединений угля, торфа, отходов нефтепереработки) [5, 7]. Осу

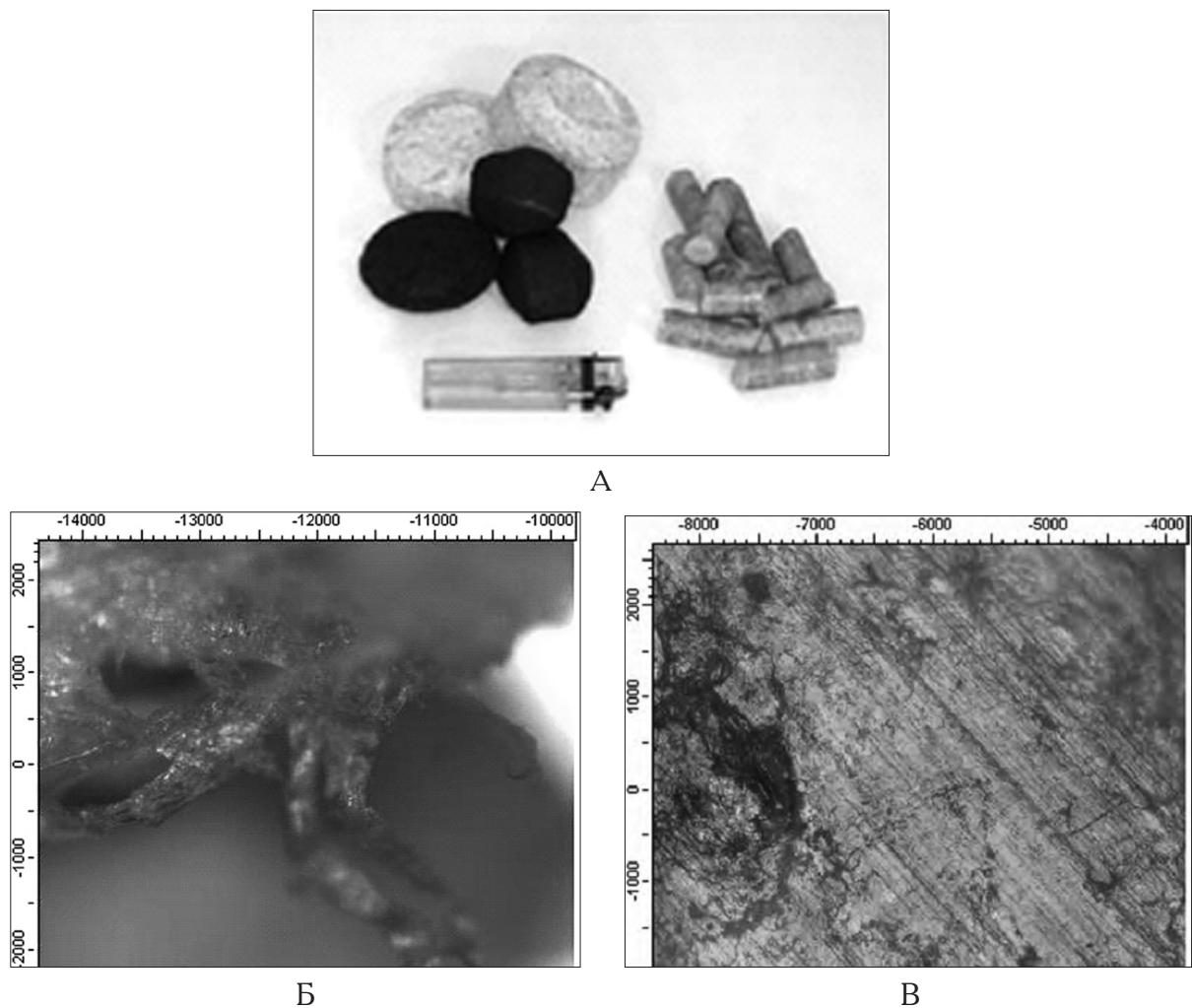


Рис. 2. Пеллеты и брикеты из биомассы и угля [5, 7].
 А – внешний вид; Б и В – микрофотографии поверхности (Б) и среза (В) топливной пеллеты (Фурье-микроскопия)

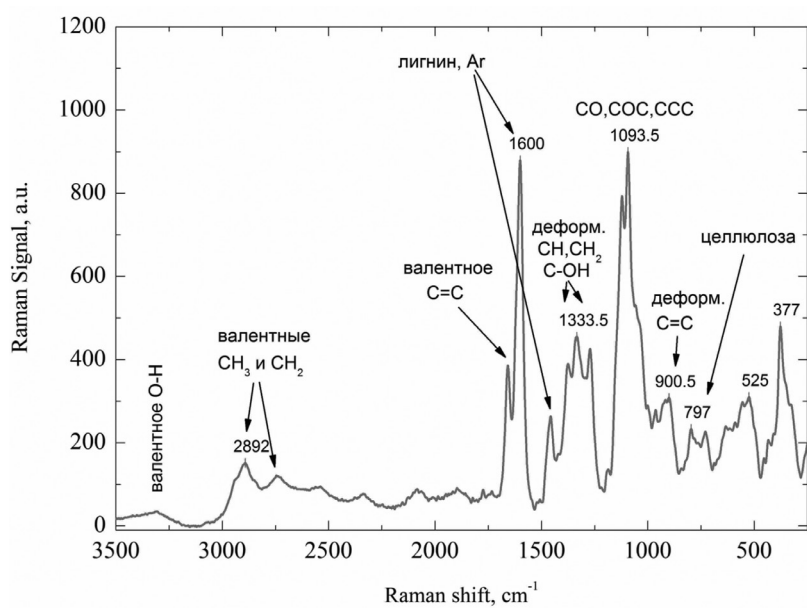


Рис. 3. Фурье-спектр пеллеты из древесного сырья

ществляется проведение опытно-промышленной апробации новых рецептур и способов производства топливных пеллет. Совместно с нашими партнерами, располагающими оборудованием для производства пеллет и брикетов, планируется продолжение работ по совершенствованию составов и проведение совместной опытно-промышленной апробации новых рецептур и способов производства топливных пеллет. Опубликовано в России и за рубежом монографии о природных биополимерах, входящих в состав биомассы [6].

2.2. Преимущества и новизна композиций для брикетированного и пеллетированного топлива [5, 7] по сравнению с традиционными.

2.2.1. Технические и экологические преимущества:

- Возобновляемое сырье (биотопливо) — как основной материал, так и связующее. Это разновидность промышленного топлива. Твердый пластификатор — связующее, в отличие от жидких связующих типа клеев, а также горячей воды и ее паров, обеспечивает совершенствование всех эксплуатационных параметров брикетов/пеллет:

- повышает значения прочности (и снижает крошимость);
- улучшает блеск поверхности и в ряде составов повышает белизну их окраски;
- способствует повышению значений плотности до 1,2 г/см³ и более;
- увеличивает продолжительность горения (горит без выделения дыма, ровно);
- повышает теплотворную способность (тепловой эффект сгорания);
- понижает энергозатраты вследствие снижения давления при прессовании и «подсушивающего эффекта» по отношению к влажности исходного сырья.

- Экологическая чистота — не выделяется в атмосферу ничего, кроме ничтожно малых количеств СО₂ (малый зольный остаток при сгорании, как и при естественном разложении древесины), и сжигание брикетов/гранул входит в естественный круговорот веществ в природе.

- Значительно повышенная теплотворная способность по сравнению с брикетами/пеллетами на основе вторичного углеродсодержащего сырья (того же самого, как и в других изобретениях и патентах, но без связующего). Теплотворная способность в 1,5 раза больше, чем у древесины, и на уровне углей. Повышение КПД брикетированного/пеллетированного топлива до 80—90% по сравнению с углем и дровами.

- Автономность: в связи с низкой пожароопасностью удобны и хранение, и транспортировка (так как брикеты/гранулы обладают высоким значением насыпной массы). Возможна автоматическая подача-загрузка в котел и автоматизация процесса получения тепловой энергии.

- Возможность трансформации получаемой энергии, например, из тепловой в электрическую. Отапливать жилье и производственные помещения брикетами/пеллетами примерно в 3,5 раза дешевле, чем электричеством.

- Многофункциональность и возможность использования для сжигания в котлах коммунально-бытового и производственного назначения, в энергетических установках тепловых и электрических станций или, например, в качестве сорбента.

2.2.2. Экономические преимущества:

- Востребованность на европейском рынке — экспортируемый товар.

- Стабильно низкая себестоимость (при стоимости пеллет в Европе 100—350 Евро).

2.2.3. Содержание проекта ООО «Инжиниринговая компания ГРАНТЕК»

Главная цель нашего предполагаемого проекта — увеличение доли использования биомассы в качестве сырья для выработки экологически чистого тепла и электроэнергии. Наиболее важными задачами проекта являются:

- проведение сравнительного анализа самых современных технологий и технических решений, находящихся в использовании, лучшего оборудования, методов и их реализуемости, опираясь на успешные прецеденты применения технологии;

- выполнение всестороннего исследования технических и нетехнических движущих сил для развития биоэнергетики в России;

- определение возможных совместных действий лесохимической, нефтегазовой отраслей и возможностей научного и технологического сотрудничества, способных преодолеть преграды, препятствующие реализации проекта;

- улучшение конкурентоспособности российской энергетики, основываясь на более глубоком внедрении биоэнергетики;

- подготовка прогнозов и сценариев развития отрасли на ближайшие (2020—2030) годы, а также определение степени реальности и достижимости поставленных задач;

- оценка правовых рамок и существующих схем поддержки, с предложением новых инструментов, которые

облегчили бы доступ к деловым возможностям и стимулированию инвестиций в эти технологии и производства;

- формулирование всесторонней стратегии расширения и продвижения технологий, нацеленных на передачу лучших практических результатов и всестороннего сотрудничества профессионалов, руководящих работников и менеджеров схемы поддержки;

- создание пилотных проектов с производством топливных пеллет, брикетов, формованных изделий (см. рис. 2);

- тиражирование проектов с производством топливных пеллет и брикетов, а также других формованных изделий;

- продолжение работ НИР (НИОКР) по совершенствованию топлив на основе возобновляемого сырья.

3. Состав и химические превращения биомассы

Древесина различных пород состоит из целлюлозы (40–50%), лигнина (16–33%), гемицеллюлоз (15–30%), экстрагируемых веществ и неорганических примесей. Целлюлоза является линейным полисахаридом, построенным из звеньев $C_6H_{10}O_5$. Структурная формула целлюлозы представлена на рисунке 4.

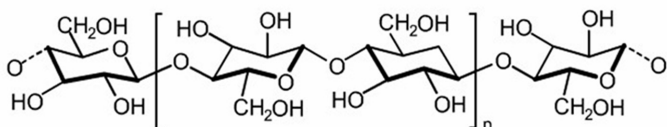


Рис. 4. Структурная формула целлюлозы [3]

Цепочки, содержащие до 10000 глюкозидных звеньев, стянуты в пучки посредством водородных связей. Перекрученные пучки образуют так называемые фибриллы, которые посредством гемицеллюлозных и лигниновых компонентов как бы склеены друг с другом в единую жесткую структуру. Гемицеллюлозы — разветвленные полисахариды, в основном построенные из звеньев $C_5H_8O_4$ с более короткими, чем у целлюлозы, цепочками. Лигнин не является карбогидратным полимером. Как полагают, ароматическая структура лигнина состоит из комбинации фенолпропановых структурных единиц, которые связаны друг с другом посредством эфирных и углерод-углеродных связей в соответствии со схемой, представленной на рисунке 5.

Из функциональных групп в лигнине преобладают метоксильные и фенольные. Древесина и ее компоненты подвергаются различным химическим превращениям уже при относительно невысоких температурах.

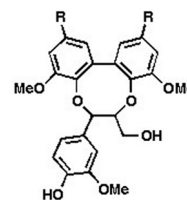


Рис. 5. Структурная формула лигнина

Карбогидратные компоненты древесины (целлюлоза и гемицеллюлозы) более реакционноспособны, чем лигнин. Гидроксильные группы целлюлозы легко вступают в реакции нитрования, ацетилирования, ксантогенирования, этерификации. Они могут быть заменены на NO_2 , NH_2 , галогены или окислены с образованием альдегидных и карбоксильных групп. Гидроксильный водород может обмениваться на катионы металлов.

4. Газификация лигноцеллюлозной биомассы

Газификация твердого топлива представляет собой совокупность окислительных и восстановительных процессов, в результате которых органическое вещество из исходного низкосортного угля, сланцев или биомассы превращается в смесь газов, содержащую горючие компоненты (CO , H_2 , CH_4 и т.д.) и балластные примеси (CO_2 , N_2 , H_2O) [4]. Процесс газификации органического топлива осуществляется в газогенераторах, представляющих собой вертикальную шахтную печь, в которую сверху загружается газифицируемое топливо. Слой топлива поддерживается внизу колосниковой решеткой. Воздух подается снизу, образующийся генераторный газ отводится сверху. Остающиеся после газификации зола и шлак удаляются в нижней части генератора. Топливо, опускаясь в генераторе постепенно вниз, последовательно претерпевает ряд изменений.

В газогенераторе можно условно выделить по вертикали сверху вниз четыре зоны (рис. 6).

Поступающее в газогенератор дутье проходит через шлаковую подушку (зону золы и шлака), в которой оно несколько подогревается и затем поступает в раскаленный слой топлива (зону горения), где происходит сгорание топлива за счет кислорода дутья с образованием, главным образом, двуокиси углерода.

Поднимаясь выше и встречая на своем пути раскаленное топливо (в зоне восстановления), двуокись углерода и водяные пары, находящиеся в дутье, восстанавливаются в горючие газы — окись углерода и водород. Углерод кокса в зоне газификации переходит в газообразное состояние, от топлива остаются лишь зола и шлак.

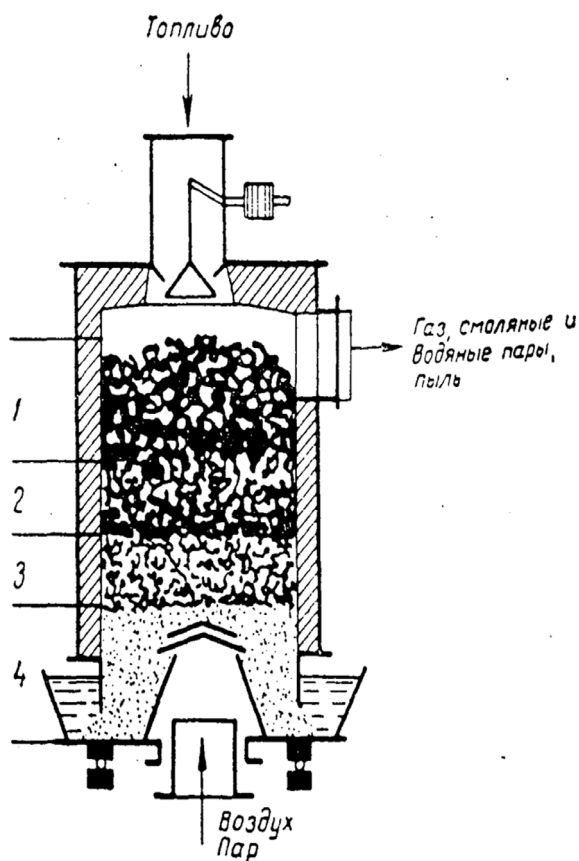


Рис. 6. Схема расположения зон в газогенераторе:

- 1 — подсушки топлива; 2 — сухой перегонки;
- 3 — газификации (восстановления и горения);
- 4 — золы и шлака

Выходящий из зоны газификации генераторный газ, поднимаясь выше, нагревает топливо. Проходя через зону сухой перегонки, газ производит термическое разложение топлива и уносит с собой продукты полукоксования — газ, смоляные пары, водяной пар. Топливо в зоне сухой перегонки превращается в полукоксы и далее в кокс. Выше зоны сухой перегонки генераторные газы, будучи еще достаточно нагретыми (в зоне подсушки), производят сушку топлива, загружаемого в газогенератор. Высота зоны подсушки должна быть тем больше, чем крупнее куски и выше влажность топлива.

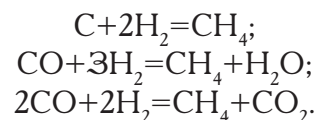
В процессе газификации по всей высоте слоя топлива происходят существенные изменения. Топливо под действием высокой температуры теряет влагу, выделяет летучие вещества, а твердый остаток сухой перегонки взаимодействует с дутьем.

Описанный выше процесс называется прямым, в нем топливо и газ движутся в газогенераторе в противоположных направлениях, то есть навстречу друг другу. При этом сушка и прогрев топлива происходят за счет тепла газов, выходящих из нижнего слоя раскаленного

кокса, где происходит химическое взаимодействие дутья и газа с раскаленным топливом. При высокой влажности топлива тепла газа может не хватить для его сушки и прогрева, потому что в нижнюю зону будет поступать холодное сырое топливо и процесс газификации может нарушиться. В газе резко увеличится содержание двуоксида углерода и теплота сгорания его снизится. При газификации топлива по прямому процессу с большим выходом летучих веществ в газе, выходящем из газогенератора, содержится значительное количество смолы, выделяющейся в зоне сухой перегонки топлива.

Поскольку карбогидраты биомассы $[C_6(H_2O)_5]_n$ содержат много кислорода и влаги, в процессе газификации лигноцеллюлозного материала требуется гораздо меньше водяного пара, чем при газификации ископаемых углей. Реакцию окислительной газификации растительной биомассы обычно осуществляют в автотермическом режиме, добавляя кислород или воздух.

Повышение давления в газогенераторе оказывает существенное влияние на механизм термического разложения органического вещества при нагревании топлива и на развитие процессов газообразования. Повышение давления способствует относительному увеличению выхода жидких компонентов при термическом разложении органического вещества и соответственно уменьшению образования газа. С повышением давления в общем процессе газообразования возрастает значение реакций, идущих с уменьшением объема и, в частности, реакций метанообразования:



Эти реакции экзотермичны и под давлением осуществляются при относительно невысокой температуре в зоне реагирования (600–800 °С). Повышение содержания метана и других углеводородов в газе увеличивает теплоту сгорания.

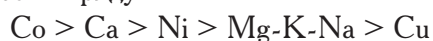
С повышением давления возрастает концентрация реагирующих компонентов и интенсифицируется генераторный процесс. При этом скорость фильтрации парогазовых продуктов через слой топлива уменьшается и резко сокращается унос твердых частиц из слоя.

В газогенераторах под давлением можно успешно газифицировать мелкозернистое топливо. Преимущество газификации под давлением особенно проявляется, если применяется парокислородное дутье. В этом случае расходуется энергия лишь на нагнетание в генератор

кислорода. Вместе с тем в корпусе газогенератора производится газ под давлением, достаточным для транспорта этого газа к потребителям на десятки километров.

В последнее время возрос интерес к исследованию каталитической газификации биомассы. Обнаружено, что щелочные катализаторы (карбонаты натрия, калия и др.) значительно повышают выход синтез-газа при газификации биомассы водяным паром в интервале температур 550–750 °С. Карбонаты натрия и калия являются также эффективными катализаторами газификации древесных углей диоксидом углерода. Соли переходных металлов, хотя и проявляют высокую активность на начальной стадии реакции, дезактивируются в ходе процесса.

Для осуществления процессов каталитической газификации биомассы используются различные приемы. Газификация механических смесей растительной биомассы и катализатора отличается технической простотой, но менее эффективна по сравнению с другими приемами каталитической газификации вследствие ограниченной поверхности контакта гетерогенного катализатора с твердым сырьем. Исключения составляют механические смеси на основе катализаторов, способных плавиться или возгоняться при температуре процесса. Развитая поверхность контакта достигается путем формирования в пористой структуре биомассы высокодисперсных частиц катализатора. В частности, для введения катализаторов в состав древесного угля применяли пиролиз древесины тополя с введенными ионным обменом катионами К, Са, Mg, Со, Ni. В газификации древесного угля CO_2 при температуре 800 °С катализаторы располагались по активности в ряду



Наиболее высокую активность проявлял кобальтовый катализатор, подвергнутый пиролизу при температуре 600 °С и содержащий частицы металлического кобальта в матрице древесного угля.

Предложен способ газификации древесины, основанный на паровом крекинге летучих веществ древесины в неподвижном слое алюмоникелевого катализатора. При этом выход газообразных продуктов повышается с 50 до 90% по сравнению с некаталитическим процессом. А высокое отношение H_2/CO (1,96) дает возможность использовать продуцируемый синтез-газ для получения метанола без стадии конверсии CO водяным паром.

Представляются перспективными процессы окислительной газификации измельченной растительной биомассы в псевдооживленном слое катализатора окисления. На этой основе возможно создание комбинированных процессов переработки биомассы с одновременным

получением топливного газа или синтез-газа, а также нанопористых углеродных материалов. Возможность реализации этого комбинированного процесса подтверждена при изучении термокаталитических превращений гидролизного лигнина в кипящем слое частиц Al-Cr-Cu оксидного катализатора [1].

5. Сжижение биомассы

Основу для производства многих видов пластмасс и топлива можно теперь получать прямо из целлюлозы. Такую технологию разработала и продемонстрировала группа исследователей, возглавляемая К. Чжаном, из американского Института межфазного катализа. Речь идет о соединении НМФ (5-hydroxymethylfurfural — гидроксиметилфурфураль), которое широко применяется как основа для синтеза большого числа разнообразных полимеров, используется в других областях химической промышленности и даже может применяться как база для производства синтетического горючего для двигателей внутреннего сгорания (как бензина, так и дизтоплива).

Синтез НМФ из возобновляемого растительного сырья может оказаться одним из магистральных путей. Но главным камнем преткновения здесь выступала даже не технология как таковая (подбор цепочек реакций), а КПД процесса и себестоимость продукта. Пока первый был низок, а вторая — высока.

Еще в 2006 году ученые из Висконсинского университета нашли эффективный способ производства НМФ из фруктозы, и это был первый крупный шаг к «большой зеленой химии». Через год они научились синтезировать НМФ из глюкозы. И это оказалось еще заманчивее — ведь глюкозу можно в огромных количествах получать из биомассы различного происхождения.

Но процесс пусть и был эффективнее, чем все, продемонстрированное в этой области ранее, все равно был далек от идеала. Недавно К. Чжан сообщил о прорыве: найден способ синтеза НМФ непосредственно из целлюлозы, в обход стадии получения сахаров и всего в один шаг.

Целлюлозы, как известно, очень много в древесине и разнообразных однолетних растениях (солومه, просе и др.). Их можно культивировать в огромных количествах, получая НМФ в промышленных масштабах. Это заманчивая перспектива, в первую очередь, для США — страны, которая давно мечтает если не избавиться от импорта черного золота, то, во всяком случае, сократить зависимость от него. Ранее ученые, кстати, уже призывали развернуть промышленный синтез искусственной

нефти из тех же древесных отходов, благо технологии, в принципе, существуют.

В предыдущей своей работе К. Чжан и коллеги обнаружили, что комбинация хлорида хрома и ионной жидкости конвертирует глюкозу в очень чистый НМФ. Но оставался вопрос, как эффективно получать простые сахара из целлюлозы? Ведь весь процесс должен был быть еще и дешевым, и с большим выходом сырья, и с минимумом примесей, чтобы не создавать себе трудностей с очисткой.

Теперь та же команда химиков нашла, что комбинация из хлорида меди и хлорида хрома при 120 °С разлагает целлюлозу, не создавая при этом множества нежелательных побочных продуктов. Также ученые провели испытания и выяснили, что сочетание этих двух металл-хлоридов и ионной жидкости преобразует целлюлозу в десять раз быстрее и при более низких температурах, чем традиционный способ с применением кислоты.

Соединив оба процесса (разложение целлюлозы и синтез гидроксиметилфурфурала) в один, химики показали на опыте, что новая технология способна преобразовывать в НМФ 57% от сахаров, содержащихся в целлюлозе. Из полученного соединения выделить получалось более 90%, и этот продукт обладал 96%-ной чистотой. Причем, катализаторы (металл-хлориды) и растворитель (ионная жидкость) в этом процессе могут использоваться повторно по многу раз, что снижает стоимость конечного продукта.

Существуют новые креативные решения фундаментальной задачи получения жидкого топлива в Рос-

сии. Некоторые аспекты получения жидкого топлива путем радиолитического разложения древесины отражены в программах Российской академии наук по фундаментальным проблемам энергетики. Место биоресурсов в ТЭК определено академиком И.И. Моисеевым [2]. Впервые проведены работы по высокотемпературному радиолитическому разложению растительных материалов и академиком Б.Ф. Мясоедовым с соавторами [3], запатентован способ получения качественного жидкого топлива.

Литература

1. *Кислицын А.Н.* Пиролиз древесины: химизм, кинетика, новые процессы. — М.: изд. Лесная промышленность, 1990. — 134 с.
2. *Платэ Н.А., Моисеев И.И.* Биоресурсы: место в ТЭК // Экологический вестник России. — 2008. — № 7. — С. 32–39.
3. *Пономарев А.В., Макаров И.Е., Тананаев И.Г., Мясоедов Б.Ф.* «Способ переработки растительного сырья» / Патент РФ // Бюллетень изобретений. Полезные модели, 2008.
4. *Рожкова О.В., Щеголихин А.Н., Мясоедова В.В.* Термическое разложение, пиролиз и газификация биомассы // Энциклопедия инженера-химика. — 2010. — № 4. — С. 18–23.
5. *Myasoedova Vera et al.* Norwegian Patent nr 320094, 2005.
6. *Myasoedova Vera.* Physical chemistry of non-aqueous solutions of cellulose and its derivatives. — John Wiley & Sons Publishers. Chichester-New York-Weimheim-Brisbane-Singapore-Toronto, 2000. — 196 p.
7. *Myasoedova Vera et al.* European Patent 1090 095, 2003.

THERMOCHEMICAL CONVERSION, GASIFICATION AND LIQUEFACTION OF LIGNOCELLULOSIC BIOMASS

V.V. MYASOEDOVA

Engineering company GRANTEK Ltd., Moscow

Provides an overview of using their own data on the thermal decomposition, pyrolysis and gasification of biomass.

Keywords: biomass, lignocellulose, thermochemical conversion, biofuels.

СЫРЬЕВОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ПРОИЗВОДСТВА ТОВАРОВ НА ОСНОВЕ МОРСКИХ БИОТЕХНОЛОГИЙ

А.В. АГЕЕВ*

*Некоммерческое партнерство «Системы и Технологии»,
Москва*

Представлен обзор современного состояния отечественной морской биотехнологии. Акцент делается на обеспечение сырьем данной отрасли как за счет внутренних морей и водных бассейнов, так и разных экономических зон и отдаленных районов Мирового океана.

Ключевые слова: морская биотехнология, сырьевое обеспечение.

Введение

Главным условием технологического прорыва является не наличие промышленных мощностей и сырьевых ресурсов, а интеллектуальный и трудовой потенциал населения, основой которого служит физическое и духовное здоровье. Причинами ухудшения состояния здоровья населения России, наряду с общими социально-экономическими причинами, является низкий уровень снабжение населения качественными и полноценными продуктами питания и неэффективность фармацевтического обеспечения. Важную роль в изменении ситуации с эффективностью продовольственного и фармацевтического обеспечения могут сыграть отечественные морские биотехнологии.

Значение морских биотехнологий определяется особенностями водных биоресурсов: широкой распространенностью, генетическим разнообразием, уникальным химическим составом, жизнестойкостью, химической и биологической безопасностью и высоким уровнем содержания полезных веществ. Экологическая чистота холодных вод морей и океанов и отсутствие опасных для человека инфекционных агентов придает продуктам питания, кормам и фармацевтическому сырью и полуфабрикатам из водных биоресурсов существенные

конкурентные преимущества перед животными и растительными аналогами.

Согласно данному в Конвенции «О биологическом разнообразии» определению, «биотехнологии — это любой вид технологии, связанный с использованием биологических систем, живых организмов или их производных для изготовления или изменения продуктов и процессов с целью их практического использования». Одним из направлений биотехнологической отрасли является «синяя», или «морская», биотехнология.

Исходя из определения этого термина («Словарь терминов по биотехнологии для производства продовольствия и ведения сельского хозяйства», ФАО, 2008 г.) предмет морских биотехнологий можно определить как — «использование любых технологий переработки водных биоресурсов или их производных для производства биологического сырья, полуфабрикатов и товаров пищевого, кормового, ветеринарного, технического и фармацевтического назначения». Данное в проекте «Стратегии развития биотехнологической отрасли промышленности до 2020 г.» [5] и рабочих материалах определение этого термина и содержание соответствующего раздела не охватывает в полной мере особенностей морских биотехнологий. В связи с этим требуется более подробная проработка данного вопроса.

В России основным источником поставки для переработки водных биоресурсов (91% общего объема) является морское рыболовство, которое не только обеспечивает добычу водных биоресурсов в морских районах промысла, но и осуществляет непосредственно в море на судах их первичную переработку. В результате такой переработки часть произведенной продукции представляет собой готовый товар и поставляется непосредственно

© 2011 г. Агеев А.В.

* **Автор для переписки:**

Агеев А.В.

советник генерального директора

некоммерческого партнерства «Системы и Технологии»

125047 Москва, ул. 2-я Брестская, 8

Тел.: 8 (926) 825-92-30,

E-mail: aageev57@mail.ru

потребителям, а другая часть — сырье или полуфабрикаты для дальнейшей более глубокой переработки на основе пищевых и морских биотехнологий на береговых предприятиях. Для первичной переработки водных биоресурсов на судах в море используются следующие технологии: охлаждение, замораживание, консервирование, стерилизация, соление, нагревание, прессово- и центрифужно-сушильная обработка, ферментативный гидролиз и некоторые другие.

Уровень сырьевого обеспечения морских биотехнологий и соответственно масштаб производства продукции на их основе напрямую зависят от эффективности морского рыболовства. Морское рыболовство и морские биотехнологии — это взаимосвязанные виды деятельности с высоким уровнем взаимопроникновения: морское рыболовство использует морские биотехнологии для переработки водных биоресурсов на борту судов и одновременно является основным поставщиком сырья и полуфабрикатов из водных биоресурсов для берегового производства из них товаров на основе морских биотехнологий. В последние годы такая взаимосвязь увеличивается, а грань между этими видами деятельности стирается (рис. 1). Многие фондовые биржи и инвестиционные институты мирового уровня классифицируют компании, ведущие промысел и глубокую переработку водных биоресурсов на борту судов, как «биотехнологические» (в частности: норвежские компании «Aker Biomarine», «Krill Sea Products» и некоторые другие).

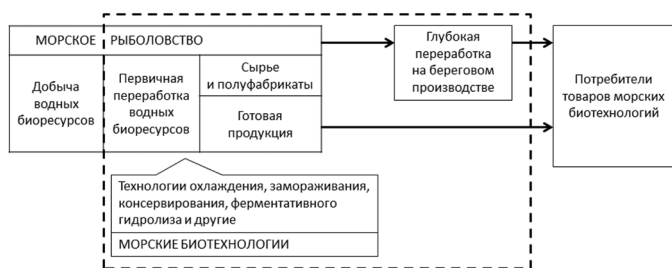


Рис. 1. Взаимодействие и взаимопроникновение морского рыболовства и морских биотехнологий

Всю производимую из добытых водных биоресурсов в море на судах продукцию можно условно разделить на две большие группы: пищевые продукты и непищевая продукция, причем, сырьевые источники каждой из групп различаются. Направления использования водных биоресурсов определяются видовым составом, пищевой ценностью и потребительскими характеристиками товаров из разных водных биоресурсов, гастрономическими предпочтениями населения, особенностями промысла,

наличием инфраструктуры и другими причинами. На производство пищевой продукции традиционно направляется основная часть водных биоресурсов российской экономической зоны и соседних с Россией экономических зон иностранных государств и конвенционных районов. На производство непищевой продукции направляется большая часть водных биоресурсов, добытых в отдаленных районах Мирового океана, а также отходы от разделки сырья на пищевую продукцию.

Непищевая продукция включает в себя биологическое сырье, полуфабрикаты и готовые товары кормового, ветеринарного, технического и фармацевтического назначения. Рыбохозяйственный комплекс СССР для удовлетворения потребностей сельского хозяйства, промышленности и медицины производил из водных биоресурсов свыше полумиллиона тонн в год разнообразных непищевых товаров (с учетом кормовой рыбы — около миллиона тонн), направляя на ее производство более 40% добытых водных биоресурсов. Если производство и потребление пищевых рыбных продуктов в современной России достигли показателей СССР, то масштабы производства непищевых товаров уменьшились на порядок (табл. 1).

Важнейшим компонентом кормов сельскохозяйственных животных и птиц а также выращиваемых рыб является рыбная мука, потенциальная потребность в которой, по мнению Минсельхоза России, составляет 400–500 тыс. тонн в год при фактическом удовлетворении потребности не более чем на треть. Недостаток рыбной муки отечественного производства частично компенсируется поставками импортной продукции, которая занимает на рынке более 70%.

В СССР потребности микробиологии в белковых основах питательных сред удовлетворялись за счет продуктов переработки водных биоресурсов, притом что за рубежом основным источником белка для производства питательных сред служат мясные пептоны и гидролизаты сои. Перспективы отечественного производства белковых питательных сред определяются необходимостью замещения импорта биологических субстанций и мировой тенденцией опережающего развития биофармацевтики.

Основным потребителем рыбьего жира являются аквакультура и животноводство, растет и фармацевтическое потребление жира из рыб и морепродуктов с высоким содержанием жирных кислот группы омега-3. В России масштабы производства рыбьего жира сократились по сравнению с советским периодом в 18 раз, изготавливается рыбий жир с низкой степенью очистки для технического использования.

Сравнение показателей рыбохозяйственного комплекса СССР и России по состоянию на 2009 г.

Показатели	Единица измерения	СССР (1990–1991)	РФ (2009)	Изменение (СССР-РФ), %
Уловы водных биоресурсов всего, из них:	млн. тонн	7,1	3,8	-46,5
- в отдаленных районах Мирового океана		2,3	0,2	-91,3
Производство пищевых рыбных продуктов	млн. тонн	3,7	3,9	+5,4
Потребление населением пищевых рыбных продуктов «первого предъявления»	кг/чел.	24,6	20,2	-17,9
Направление водных биоресурсов на производство непищевых рыбных товаров	%	42	14	-66,7
Производство непищевых рыбных товаров (без учета кормовой рыбы) всего, из него:	тыс. тонн	521,4	81,9	-84,3
- жир технический,		42,0	1,4	-96,7
- жир ветеринарный и медицинский,		41,5	0,1	-99,8
- мука высокобелковая кормовая		421,3	75,9	-82,0

Источники: ФАО, ВНИРО [11], оценки

Сырьевая база и величина отечественных уловов раков, крабов, креветок и прочих ракообразных (2009 г. — 59,7 тыс. тонн) позволяет производить в год более тысячи тонн хитиновых биополимеров, но распыленность бизнеса более чем на 150 производителей, отдаленность районов промысла на Дальнем Востоке и экспортная направленность этого бизнеса привели к тому, что сырьевой потенциал используется только на 10–20%.

Ресурсная база морской биотехнологии

Основные районы отечественного морского промысла водных биоресурсов можно разделить на две большие группы: прилегающие к побережью России или вблизи расположенные районы промысла и отдаленные районы Мирового океана (табл. 2).

За период после ликвидации СССР произошли существенные изменения в структуре отечественного морского рыболовства, которое сконцентрировалось в российской экономической зоне и прилегающих международных районах промысла и экономических зонах соседних государств.

В результате сокращения масштабов промысла в отдаленных районах Мирового океана с 2,3 млн. тонн до 0,2 млн. тонн промысел многих видов водных биоресурсов (тихоокеанская ставрида) полностью прекратился, а других (атлантическая ставрида, кальмары, криль) многократно сократился (табл. 3).

Правительство России в качестве первоочередной задачи рыбохозяйственного комплекса, составной и крупнейшей частью которого является морское рыболовство, определило «удовлетворение спроса населения страны в пищевых рыбных продуктах, а также потребности сельского хозяйства и промышленности в непищевых товарах из водных биоресурсов». Сырьевое обеспечение поставленной задачи предполагается осуществить путем увеличения морским рыболовством объемов уловов водных биоресурсов, преимущественно в отдаленных районах Мирового океана, производства и поставок товаров из них на внутренний рынок. Сырьевыми индикаторами поставленной задачи служит увеличение к 2013 г. объемов уловов водных биоресурсов до 4,7 млн. тонн (фактический вылов в 2009 г. — 3,8 млн. тонн), а к 2020 г. — до 6,6 млн. тонн.

Существенным фактором, негативно повлиявшим на масштабы отечественного морского рыболовства в отдаленных районах Мирового океана, стало изменение модели финансовых взаимоотношений рыболовства и государства. Во времена СССР рыбохозяйственный комплекс был призван решать важные социальные и политические задачи, для чего государство обеспечивало его мощной международной политической поддержкой и значительными финансовыми ресурсами. Морское рыболовство, особенно в отдаленных районах Мирового океана, ныне превратилось в убыточное или низкорентабельное и поэтому в большинстве развитых рыболовных стран в той или иной форме поддерживается государством.

Таблица 2

Классификация основных районов промысла отечественного морского рыболовства

Тип района промысла	Прилегающие к побережью или вблизи расположенные районы	Отдаленные районы Мирового океана
Российская экономическая зона	Дальневосточный, Северо-Западный бассейн и внутренние моря	—
Экономические зоны иностранных государств	Норвегия, Фарерские острова, Япония	Мавритания, Марокко, Сенегал, Ангола, Намибия
Конвенционные районы под международным регулированием	Районы Северной Атлантики (регулирование NEAFC и NAFO)	Атлантическая часть Антарктики
Открытые районы	—	Атлантическая часть Антарктики, Южная часть Тихого океана

Таблица 3

Изменение структуры и видового состава отечественного морского рыболовства в отдаленных районах Мирового океана (тыс. тонн)

Показатели	1991 г.	2009 г.	Изменение 2009–1991 гг.
Вылов по основным отдаленным морским районам промысла			
Центрально-Восточная Атлантика	522	155	-367
Южная Атлантика	333	0	-333
Антарктическая часть Атлантики	231	10	-221
Южная часть Тихого океана	1248	0	-1248
Вылов по видам водных биоресурсов отдаленных районов промысла			
Ставрида мавританская и капская	254	74	-180
Ставрида тихоокеанская	1047	0	-1047
Антарктический криль	249	9	-240
Электрона	59	0	-59
Кальмары атлантические	100	0	-100
Кальмары тихоокеанские	43	3	-40

Источники: ВНИРО [11], Росрыболовство, оценки

В СССР до половины издержек на промысел в отдаленных районах Мирового океана и иностранных экономических зонах компенсировалось за счет бюджета, а обновление флота осуществлялось за счет государственных капвложений. В настоящее время взаимоотношения с бюджетом изменились кардинально, в результате чего отрасль превратилась в донора бюджета (нетто-платежи в бюджет составляют 10–15% от выручки).

Уменьшение сырьевого обеспечения отечественного производства непищевых товаров за счет сокращения масштабов промысла в отдаленных районах Мирового океана привело к изменению структуры использования

уловов и снижению масштабов производства непищевых товаров. Если в 1980-е годы более половины отечественных уловов водных биоресурсов в отдаленных районах Мирового океана перерабатывалось на непищевые товары, то в настоящее время основным сырьевым источником для их производства стали отходы от разделки минтая (80% объема производства кормовой рыбной муки и рыбьего жира). В результате структурных изменений сырьевое обеспечение производства наиболее массовых видов непищевых рыбных товаров (рыбной муки и рыбьего жира) в 2008–2010 гг. составляло порядка 1 миллиона тонн, что эквивалентно потенциальному объему производства

150 тыс. тонн рыбной муки и 30 тыс. тонн рыбьего жира при фактическом производстве соответственно 75,9 и 1,5 тыс. тонн (мощности флота и береговых предприятий позволяют производить более 240 тыс. тонн рыбной муки и 50 тыс. тонн рыбьего жира в год).

Снижение уловов направляемых на производство кормовой продукции видов рыб и морепродуктов, наряду с рядом глобальных продовольственных факторов послужило причиной образования в мире значительного дефицита рыбной муки. По данным ФАО, потребность в рыбной муке достигает 10 млн. тонн в год при сырьевых возможностях производства только половины этого объема. Ситуация усугубилась в результате бурного роста масштабов основного потребителя рыбной муки и рыбьего жира — аквакультуры, объемы продукции которой за последние 20 лет увеличились на порядок и составили более 50 млн. тонн.

Дефицит рыбной муки привел к 4-кратному росту с начала 2000-х годов цен на нее (до 1600 долл./МТ на условиях поставки DDP Гамбург). В период 2006–2008 гг. цены на рыбную муку значительно снизились, а с 2009 года начался новый этап роста цен и к концу 2010 г. цены на рыбную муку превысили докризисный период (1800 долл./МТ). Очевидно, что по причине дефицита рыбной муки рост цен на нее в обозримом будущем продолжится.

Создание условий для возрождения деятельности отечественного промыслового флота в отдаленных районах Мирового океана Правительство России считает одним из приоритетных направлений развития морского рыболовства. При оценке потенциала Правительство РФ и Росрыболовство руководствуются оценкой отраслевой наукой запасов водных биоресурсов отдаленных районов Мирового океана на основе биологических и иных природных факторов (табл 4).

Таблица 4

Характеристики основных массовых неосвоенных водных биоресурсов отдаленных районов Мирового океана в 2008–2009 гг. (тыс. тонн)

Район/ИЭЗ	Видовой состав	ОДУ	Улов	Причина неосвоения ОДУ
Исключительные экономические зоны иностранных государств Восточной Африки				
Марокко, Мавритания	Ставрида, сардина, скумбрия, сардинелла	300	155	Высокие издержки промысла, низкая производительность российских судов, низкая покупательная способность населения, высокие политические и валютные риски Центральной Африки
Сенегал, Гвинея-Бисау, Сьерра-Леоне		105	—	
Ангола, Намибия	Ставрида, сардинелла, хек	126	—	
Конвенционные и открытые районы отдаленных частей Мирового океана				
Юго-Западная Атлантика	Кальмар	35	—	Отдаленность районов промысла, высокие издержки, волатильность цен на ставриду, отсутствие потребности на продовольственном рынке России
Юго-Восточная часть Тихого океана	Ставрида, скумбрия	550	—	
Атлантическая часть Антарктики	Антарктический криль	620	—	Отдаленность района промысла, высокие издержки, необходимость значительных капитальных вложений в технологии
Итого	X	1736	155	X

Источники: Росрыболовство, ВНИРО [11], оценки

Вместе с тем целесообразность промышленного рыболовства водных биоресурсов помимо природных факторов определяется уровнем рентабельности их промысла, то есть промысловой производительностью судов, востребованностью рынками такой продукции и эффективностью применяемых технологий. Если приемлемая рентабельность морским рыболовством не достигается, то промысел такого объекта рыболовный бизнес не осуществляет. Неосвоение прогнозного общего допустимого улова на 30–40%, в основном за счет ресурсов отдаленных районах Мирового океана, создает иллюзию наличия значительного потенциала для наращивания уловов. Объективными причинами неосвоения этих ресурсов являются различные факторы, обуславливающие экономическую непривлекательность их промысла: невысокие пищевые и потребительские характеристики этих ресурсов, кратковременность образования промысловых концентраций, отсутствие потребности на пищевых рынках, низкие цены на эти пищевые товары, невысокая покупательная способность населения России, большие производственные издержки вследствие отдаленности районов промысла.

Целесообразно рассмотреть для примера причины неосвоения доступных запасов тихоокеанской и атлантической ставриды. Росрыболовство предполагает для решения проблемы «удвоения» уловов дополнительно вылавливать в Юго-Восточной части Тихого океана и Центрально-Восточной Атлантике до 1 миллиона тонн ставриды в год. Понятно, что для насыщения внутреннего рынка нужна не абстрактная рыбная продукция, а продукция востребованного населением страны видовой состава по доступным для населения ценам. В СССР население страны даже при существовавшем в тот период дефиците продовольствия так и не смогли приучить есть тихоокеанскую ставриду. Продукция из нее не пользовалась спросом у населения, торговля от нее отказывалась, рефрижераторные вагоны были вынуждены использовать как склады для ее хранения, в итоге — значительная часть товаров из тихоокеанской ставриды направлялась на кормовые цели или утилизировалась.

Поскольку самой распространенной из видов рыб на внутреннем рынке является атлантическая и тихоокеанская сельдь, объем потребления которых с учетом импорта составляет около 600 тыс. тонн в год, нереально реализовать примерно такой объем тихоокеанской ставриды с худшими потребительскими характеристиками. Высокие издержки на добычу и отдаленность района промысла от мест проживания российского населения приведут к тому, что при поставке мороженой ставриды

на внутренний рынок цена на нее превысит уровень цен на традиционные массовые «народные» виды рыб (сельдь, мойва, путассу, минтай, хек). При строительстве специализированных судов для промысла тихоокеанской ставриды финансовый результат будет еще хуже, так как увеличение производительности новых судов не компенсирует вытекающие из заемного финансирования дополнительные расходы (возвратные платежи по кредиту, страховые выплаты, банковский интерес и др.).

В традиционных для отечественного рыболовства экономических зонах государств Центрально-Восточной Африки также не осваивается более 300 тыс. тонн пелагических рыб, включая атлантическую ставриду, но причины в этом случае другие. При дефиците продовольствия в Африке и высоком спросе на традиционную для этого рынка мороженую ставриду увеличение масштабов отечественного промысла будет сдерживаться низкой производительностью российских судов, низкой покупательной способностью населения, слабым развитием логистической инфраструктуры, неконвертируемостью местных валют, политическими и военными рисками региона.

Глубокая переработка водных биоресурсов отдаленных районов Мирового океана в более востребованные и рентабельные товары при доступном финансировании технологического перевооружения представляется единственным способом в значительных масштабах увеличить ресурсную базу производства товаров морских биотехнологий.

Помимо природного и экономического фактора, в вопросе возобновления российского промысла в отдаленных районах Мирового океана имеется политический аспект. Ограниченность сырьевых и биологических ресурсов приводит к усилению конкуренции между развитыми странами за доступ к ресурсам Мирового океана, что выражается в создании международных организаций, ограничивающих доступ к водным биоресурсам в открытых районах Мирового океана и требований признания «исторических прав» на них прибрежных государств. Поскольку морское рыболовство играет важную роль в создании «исторических прав» на ресурсы Мирового океана, то правительства всех стран (кроме России) оказывают значительную финансовую и политическую поддержку компаниям, осваивающим ресурсы отдаленных районов Мирового океана.

Примером использования морского рыболовства для решения политических задач может служить Китай, который рассматривает финансовые результаты океанического рыболовства в открытой части Тихого

океана и других отдаленных районах Мирового океана в комплексе с результатами другой деятельности и политическими возможностями. Поставки мороженой рыбы из отдаленных районов Мирового океана в государства Центральной Африки стали одним из важных факторов, обеспечивающих политическое влияние Китая в этом регионе и облегчающих доступ к запасам минеральных и сырьевых ресурсов региона.

Антарктический криль

Основным объектом промысла в отдаленных районах Мирового океана, запасы которого позволяют существенно увеличить объем уловов для производства непищевых товаров на основе морских биотехнологий является антарктический криль, величина запасов которого оценивается различными специалистами в 200–400 млн. тонн. За весь период освоения запасов криля добыто около 7,5 млн. тонн, из которых на СССР и Россию приходится около 60%. Общий допустимый улов антарктического криля на сезон 2009/2010 гг. составлял 6,5 млн. тонн при фактическом вылове 212 тыс. тонн, то есть 3,3% потенциала.

Антарктический криль имеет существенные конкурентные преимущества перед другими доступными для отечественного морского рыболовства массовыми водными биоресурсами и животными источниками белка и по совокупности всех факторов является наиболее выгодным и качественным сырьевым источником для производства товаров на основе морских биотехнологий:

- Советский опыт изучения и промышленного освоения ресурсов антарктического криля послужил основой нынешних знаний о биологии и промысле криля.

- Биомасса криля превышает биомассу других видов рыб и морепродуктов, криль создает высокие промысловые концентрации, что позволяет его добывать в больших количествах.

- По аминокислотному составу и ценности белков антарктический криль близок к образцу ФАО и существенно превосходит сельскохозяйственных животных и птиц.

- Криль, в отличие от большинства других массовых видов рыб и морепродуктов (минтай, хек, сельдь, скумбрия, ставрида и другие), не популярен в качестве пищи человека.

- Создание мощностей для промысла криля требуют в 3–4 раза меньше времени по сравнению со строительством животноводческих ферм на адекватное количество голов крупного рогатого скота и капитальных

вложений на тонну живого веса (соответственно 125 и 500 долл.).

- Затраты на добычу тонны криля существенно меньше затрат на производство продукции животноводства.

Район промысла криля, как и других массовых неосвоенных водных биоресурсов, значительно удален от европейской части территории России (около 10 тыс. миль), что приводит к усложнению логистики и увеличению транспортных и логистических издержек, составляющих порядка 400–500 долл. на тонну продукции. Из этого следует необходимость осуществления глубокой переработки добытого сырья непосредственно на борту судна в районе промысла, так как при производстве высокотехнологичных товаров выход готовой продукции (соответственно — вес груза) из тонны сырья — в три-четыре раза меньше, чем при производстве мороженой продукции, а доход — в два-три раза больше.

Экономическая целесообразность возобновления отечественного промысла криля напрямую связана с внедрением современных технологий его добычи и переработки, что можно проиллюстрировать на примере Норвегии, которая в результате эффективного государственно-частного партнерства и применения инновационных технологий стала лидером в изучении и освоении ресурсов антарктического криля. По мнению правительства Норвегии, «рыболовная деятельность в Антарктике обеспечивает подтверждение исторических прав будущих поколений норвежцев на ресурсы Антарктики».

Деятельность норвежских компаний по промыслу криля в Антарктике поддерживается государством, которое финансирует исследования запасов водных биоресурсов в этом регионе и предоставляет национальным компаниям различные преференции. Так, правительство Норвегии с целью стимулирования присутствия в Антарктике судов под норвежским флагом и создания долгосрочных условий деятельности в этом регионе создало институт долгосрочных национальных лицензий на право промысла антарктического криля. Наличие такой лицензии обеспечивает норвежским компаниям доступ к заемному финансированию в национальных банках.

Хотя норвежские компании начали промысел криля только семь лет назад, ими выловлено более 350 тыс. тонн криля, что составляет почти 40% мирового улова за этот период. Использование современных технологий добычи криля и технологий его переработки позволили существенно увеличить производительность судов на промысле и расширить ассортимент продукции из него. Помимо традиционной кормовой продукции, норвежские

компании производят из криля биологически активные вещества и пищевые добавки на основе астаксина и фосфолипидов, сухие белковые гидролизаты, полуфабрикаты хитиновых биополимеров.

Использование на промысле криля прогрессивной промысловой системы «непрерывного лова» позволило существенно повысить суточные уловы, которые стали в 2–3 раза больше, чем у конкурентов. Норвежский траулер-завод «Saga Sea», используя эту систему, установил промысловый рекорд на промысле криля — более 48 тыс. тонн за сезон, что по количеству белка эквивалентно стаду в 90 тыс. голов крупного рогатого скота (продукция животноводства Курской области).

При инновационном подходе к промыслу криля значительно увеличивается роль финансового фактора, так как затраты на технологическое перевооружение одного судна, в зависимости от его производительности и применяемых технологий переработки сырья, составят 50–80 млн. долл. В СМИ анонсировано, что строительство на норвежской верфи «Aker Soviknes» нового специализированного крилевого судна обойдется в 170 млн. долл.

Исходя из взаимозависимости промышленного морского рыболовства и морских биотехнологий, функционирование рыболовного, научного и биотехнологического направления в норвежских компаниях «Aker Biomarine» и «Krill Sea Products» осуществляется в рамках единой бизнес-структуры.

Россия как всегда идет своим путем. Крупнейшая российская рыболовная компания «Мурманский траловый флот» при модернизации траулера-завода «Максим Старостин» в целях экономии сократила состав технологического оборудования, а в процессе промысла криля не смогла наладить функционирование системы «непрерывного лова», используя при этом малоэффективные тралы собственной конструкции. В итоге — компания получила убытки, а траулер-завод «Максим Старостин» выставлен на продажу.

Технологии

Главным техническим инструментом морского рыболовства для изъятия водных биоресурсов и при этом носителем технологического оборудования для их первичной переработки является добывающий флот. С развитием рыночных отношений полученный в наследство от советского рыболовства добывающий флот оказался неконкурентоспособным по сравнению с флотами развитых рыболовных стран по причине несо-

ответствия современному техническому уровню, меньшей производительности на промысле, высоких затрат топлива и плохого технического состояния. Основное отличие добывающего флота развитых рыболовных стран от российского флота заключается в качественно иной системе укомплектования и обслуживания судов, обеспечивающей их хорошее техническое состояние и укомплектованность эффективным технологическим оборудованием независимо от возраста.

Судовое и технологическое оборудование, которым укомплектован российский добывающий флот, существенно уступает зарубежным аналогам по большинству технических характеристик. Для отечественного оборудования свойственны низкая производительность, большие массогабаритные характеристики, ненадежность и низкое качество изготовления, необходимость значительных затрат на ремонт и обслуживание, отсутствие развитого сервиса. Российские машиностроители, как и во времена СССР, не смогли вывести производимое ими оборудование на приемлемые качественные характеристики и не организовали серийное производство лицензионной продукции.

Применение устаревших технологий переработки сырья и соответствующего им технологического оборудования обуславливает сырьевую направленность отечественного рыболовства: на судах в море выпускается мороженое сырье или полуфабрикат, которые перерабатываются на зарубежных фабриках в товары с высокой добавленной стоимостью. В результате упомянутых причин эффективность отечественного рыболовного бизнеса существенно уступает морскому рыболовству соседних с Россией стран, обладающих аналогичным видовым составом водных биоресурсов (табл. 5).

Использование современного оборудования с заложенными в нем эффективными технологиями позволяет значительно повысить рентабельность переработки водных биоресурсов отдаленных районов Мирового океана, что делает их промысел экономически оправданным. Так, оборудование ведущих мировых производителей жиромучных установок («Atlas», «Kvaerner», «Alfa Laval») позволяет существенно увеличить по сравнению с традиционным для российского флота оборудованием выход готовой рыбной муки и рыбьего жира. Заложенные в этом оборудовании современные биотехнологии дают возможность производить качественно другую продукцию: кормовую муку с более высоким содержанием белков и лучшими потребительскими характеристиками, рыбий жир за счет высокого уровня очистки используется на фармацевтические цели.

Эффективность морского рыболовства в 2006–2007 гг.

Показатель	Единица измерения	Показатели рыболовных стран		
		Россия	Норвегия	США
Улов на одну тонну валовой вместимости добывающих судов	тонн/БРТ	1,8	7,6	6,0
Цена тонны обезличенной экспортной продукции	долл.	1,400	2,900	2,700

Источники: ФАО, МИК, оценки

Таким образом, для повышения эффективности морского рыболовства и увеличения сырьевого обеспечения морских биотехнологий необходимо произвести модернизацию судов и замену устаревшего оборудования на современное. Между тем возможности технологического переоснащения добывающего флота сильно уменьшились. В последние 20 лет наблюдается тенденция опережающего роста цен на энергоносители, металлы и продукцию судостроения и машиностроения по сравнению с ценами на рыбные товары. С 2002 года индексы цен на топливо, металлы, индустриальную продукцию (включая машиностроение) выросли от 3 до 3,5 раз, а индекс цен на рыбные товары ФАО — только в 1,5 раза. Столь существенный рост цен на продукцию судостроения, судового и технологического машиностроения не сопровождается адекватным увеличением производительности судов и оборудования, что связано с биологическими ограничениями величины уловов.

Возможности использования при технологическом переоснащении отечественных разработок в области морских биотехнологий ограничены. Обилие научных разработок, диссертаций и патентов в области технологий переработки водных биоресурсов так и не привело к созданию на их основе промышленных технологий. Хотя истоки большинства отечественных научных разработок в области морских биотехнологий находятся в 1970–1980 гг., инженерного решения по этим разработкам чаще всего не существует, а серийное производство технологического оборудования практически отсутствует. В итоге российские компании закупают импортное технологическое оборудование, тем самым поддерживая зарубежные технологии, в нем заложенные.

Для объективности следует заметить, что технологическому и инженерному направлению отраслевой науки и созданию современного технологического оборудования со стороны органов управления отраслью внимания уделяется мало, а объемы финансирования

не позволяют добиться трансформации научных идей в массовые промышленные технологии и серийное технологическое оборудование.

Финансирование

Отечественное морское рыболовство является одним из самых недофинансированных, при этом капиталоемких видов деятельности. Действующее законодательство и фактические условия хозяйствования не только не мотивируют отечественный рыболовный бизнес осуществлять промысел в отдаленных районах Мирового океана, но и не предоставляют им необходимых для этого финансовых ресурсов и инструментов их привлечения. Собственные финансовые возможности отечественного морского рыболовства весьма скромные: с середины 2000-х годов рентабельность крупных и средних компаний морского рыболовства находилась в диапазоне 8–11%. Некоторое улучшение финансовых показателей началось с 2009 г., когда рентабельность превысила 22% (отдельные компании — 30–40%). Но и при такой рентабельности величина собственных финансовых ресурсов отечественных рыболовных компаний несопоставима с потребностью в них.

В результате значительного ухудшения финансовых условий функционирования и недостатка собственных источников финансирования инвестиции в основной капитал российских компаний морского рыболовства сократились до 12% от уровня 1991 г., притом что в целом по народному хозяйству России инвестиции в основной капитал приблизились к уровню СССР. Вся сумма инвестиций, направляемых в основной капитал компаний морского рыболовства, по данным Росстата, составляет около 7 млрд. руб. в год, что эквивалентно стоимости строительства двух-трех современных крупнотоннажных траулеров-заводов при потребности в десятках единиц судов этого класса (табл. 6).

Финансовые результаты средних и крупных рыболовных компаний России (по выборке Росстата) и размер инвестиций в их основной капитал

Показатель	Единица измерения	2005	2006	2007	2008	2009
Выручка от продаж (без НДС)	млрд. руб.	38,4	50,6	56,7	60,5	62,2
Прибыль от продаж	млрд. руб.	3,4	3,9	6,5	5,5	13,8
Рентабельность продаж	%	+ 8,9	+ 7,8	+ 11,4	+ 9,1	+ 22,1
Инвестиции в основной капитал	млрд. руб.	4,9	6,6	7,4	7,1	н.д.

Источники: ЦБСД Росстата [14], оценки

Капиталоемкость морского рыболовства может проиллюстрировать следующий пример. В настоящее время стоимость строительства современного траулера-завода для промысла и переработки минтая составляет 150–170 млн. долл., то есть капвложения на добычу и первичную переработку 1 тонны минтая составляют около 300 долл. (с учетом банковского интереса — около 500 долл.) при доходе рыбаков из тонны минтая около 1000 долл.

Проблема финансирования модернизации и технологического перевооружения морского рыболовства и биотехнологической отрасли, как и любых других отраслей промышленности (кроме топливно-энергетического комплекса), заключается в отсутствии в России «длинных» денег, источниками которых обычно могут быть собственные средства банков, депозиты населения, пенсионные и страховые накопления, средства суверенных фондов и бюджетные источники.

Следует отметить, что для морского рыболовства финансовый рынок не является важным источником капитала. Так, капитализация 30 крупнейших в мире публичных рыболовных компаний составляет около 20 млрд. долл., что в 7 раз меньше капитализации одного пищевого гиганта «Nestle». Для морского рыболовства основным источником финансирования традиционно служат банковские кредиты, на обслуживание которых по данным «Lloyds», крупные рыболовные компании расходуют 30–40% выручки.

Средства банков в нашей стране не играют существенной роли в финансировании обновления основных фондов реального сектора экономики. Так, в 2009 г. кредиты российских банков по финансированию вло-

жений в основной капитал составили только 7% общего объема финансирования на эти цели. Низкая способность банковского сектора финансировать модернизацию экономики ограничена отсутствием долгосрочных и дешевых денежных ресурсов у самих банков и значительными институциональными рисками. Величина депозитов российского населения при ограниченности сроков большинства депозитов одним годом составляет только 12% ВВП страны (Индия — 35%, Китай — 60%).

Привлечение финансовых ресурсов на цели технологического перевооружения морского рыболовства осложняется отсутствием отечественных потенциальных заемщиков, соответствующих банковским критериям надежности. Высокие риски рыболовства как вида деятельности усугубляются его плохой кредитной историей во многих российских и зарубежных банках, низким уровнем концентрации рыболовного бизнеса, непрозрачностью товарных и финансовых потоков и высокой степенью влияния внесистемных факторов. Отечественное морское рыболовство «распыленно» на множество (более тысячи) мелких и непрозрачных компаний, удельный вес 8 крупнейших компаний в объемах уловов России составляет всего 28%, выпуске рыбных товаров — 23%, выручке от продаж — 17%.

Осложняет привлечение кредитов на технологическое перевооружение отечественного морского рыболовства и соответственно морских биотехнологий отсутствие реального механизма гарантий. В рыболовстве ликвидным активом являются не суда и оборудование, а квоты, которые во многих развитых рыболовных странах находятся в свободном рыночном обороте. Поэтому за рубежом залог или иная форма обременения необходи-

мых для возвратности заемщиком кредита на технологическую модернизацию квот (долей) на вылов водных биоресурсов, представляются главным инструментом минимизации кредитных рисков.

С конца 1980-х и до середины 1990-х годов основным финансовым инструментом технологической модернизации отечественного морского рыболовства были экспортные кредиты, предоставляемые под ведомственные и государственные гарантии правительствами ряда европейских стран. За счет этого источника в период с 1987 по 1997 гг. было построено и приобретено 90 современных добывающих судов общей стоимостью свыше 1,4 млрд. долл., которые при надлежащем использовании могли выловить и переработать свыше 1,5 млн. тонн водных биоресурсов. Благодаря этим судам российское рыболовство в середине 1990-х годов занимало ведущие позиции в производстве высокотехнологичной продукции из минтая (филе и кормовая мука из «белых» рыб), занимая до 40% этих секторов мирового рынка. В настоящее время этот источник финансирования технологического перевооружения рыболовным бизнесом практически не используется.

Другим перспективным финансовым инструментом для целей технологического перевооружения может быть институт государственных гарантий по привлекаемому для этого заемному финансированию. Применение государственных гарантий позволяет решить проблему без существенной нагрузки для бюджета, поскольку государственные гарантии — это условные бюджетные обязательства с высоким мультипликативным эффектом. Однако бюрократизированная система государственного управления России в настоящее время предоставляет такие возможности очень немногим.

При осуществлении технологической модернизации за счет импортных поставок при таможенном оформлении уплачиваются налоги и сборы в сумме более четверти стоимости судна или оборудования. Для стимулирования эксплуатации судов под российским флагом Правительством Российской Федерации создан Международный Реестр морских судов, при нахождении в котором и уплате регистрационных взносов судно освобождается от уплаты налогов и таможенных сборов. Распространение на все ведущие промысел в отдаленных районах Мирового океана добывающие суда под российским флагом действия правил и льгот Международного Реестра морских судов позволит стимулировать отечественный промысел в этих районах и соответственно — сырьевое обеспечение морских биотехнологий.

Заключение

На основании проведенного анализа можно сделать следующие выводы:

1. Запасы многих видов водных биоресурсов отдаленных районов Мирового океана предоставляют возможность их изъятия при условии модернизации имеющихся судов с внедрением передовых биотехнологий переработки сырья в востребованные товары пищевого, кормового, ветеринарного, технического и фармацевтического назначения.

2. Глубокая переработка водных биоресурсов отдаленных районов Мирового океана в более востребованные и рентабельные товары при доступном финансировании технологического перевооружения — это единственный способ в значительных масштабах увеличить ресурсную базу производства товаров морских биотехнологий. Основным перспективным сырьевым источником для отечественных морских биотехнологий является антарктический криль.

3. Морское рыболовство в отдаленных районах Мирового океана и морские биотехнологии переработки водных биоресурсов представляет собой взаимосвязанные виды деятельности. Организационная и финансовая модель функционирования морского рыболовства и биотехнологии должна ориентироваться на достижение единого финансового результата.

4. Для использования имеющегося у России потенциала в области морского рыболовства и морских биотехнологий необходимо повышение мотивации отечественного рыболовного бизнеса в инновационном развитии, эффективности его хозяйствования, а также прозрачности и привлекательности для инвесторов и кредиторов.

5. Для увеличения масштабов отечественного промысла в отдаленных районах Мирового океана и сырьевого обеспечения производства товаров на основе морских биотехнологий в рамках государственно-частного партнерства необходимо:

- предоставление государственной поддержки отечественному морскому рыболовству в отдаленных районах Мирового океана на международном уровне;
- снятие законодательных ограничений на свободное обращение квот (долей) на вылов водных биоресурсов и использование их в качестве объектов залога;
- распространение на добывающие суда в отдаленных районах Мирового океана под российским флагом таможенного и налогового режима Международного Реестра;

- создание института долгосрочных национальных лицензий на промысел в отдаленных районах Мирового океана;
- предоставление государственных гарантий при привлечении заемного, в том числе экспортного, финансирования на технологическое перевооружение.

В работе помимо цитированных в списке литературы источников [1–19] использовались материалы сайтов: Росстат, ССАМЛР, ИФФО, ФАО, Index Mundi, Alfa Laval, Aker Biomarine и СМИ: «Эксперт», «Финанс», «РБК», «Рыбное хозяйство», 2010–2011.

Литература

1. Антарктический криль: справочник / Под ред. Быковой В.М. — М.:ВНИРО, 2001. — 207 с.
2. Боева Н.П., Бредихина О.В., Бочкарев А.И. Технология рыбы и рыбных продуктов. Кормовые и технические продукты из водных биологических ресурсов. — М.: Изд-во «ВНИРО», 2008. — 118 с.
3. Исаев В.А. Кормовая рыбная мука. — М. Агропромиздат, 1985. — 191 с.
4. Итоги реализации Морской доктрины РФ. История, состояние и перспективы океанического рыболовства в Южной части Тихого океана и Антарктики. — ВНИРО, 2008.
5. Концепция и рабочие материалы к Стратегии развития биотехнологической отрасли промышленности на 2008–2020 гг. — Общество биотехнологов России, 2008–2009.
6. Меджидов М.М. Справочник по микробиологическим питательным средам. — М.: Медицина, 2003.
7. Мезенова О.Я., Терещенко В.П., Сергеева Н.Т. и др. Биотехнология гидробионтов. — Калининград: КГТУ, 2006. — 461 с.
8. Потенциал морского рыболовства по производству рыбной муки и жира для нужд сельского хозяйства и субстанций для фармацевтической промышленности. — Альфа Лаваль Поток, 2010.
9. Прикладная биохимия и технология гидробионтов. Том. 143. — ВНИРО, 2004.
10. Романов В.А. и др. Флот рыбной промышленности. Справочник. — Гипрорыбфлот, 2008.
11. Статистические сведения по рыбной промышленности России. — ВНИРО, 2010.
12. Стратегия развития фармацевтической промышленности РФ на период до 2020 г. — Минпромторг России, 2009.
13. Султанов Э.З. Разработка и усовершенствование технологий получения микробиологических питательных основ и сред. Автореф. дис. докт. биол. наук. — Махачкала, 2008.
14. Центральная база статистических данных. — Росстат, 2010.
15. Шуст К.В. и др. Биоресурсы Антарктики. Перспективы их изучения и промыслового использования. — ВНИРО, 2000.
16. Annual Review of the feed grade fish stocks used to produce. — Seafish, 2010.
17. Fishmeal & fishoil. — Globefish, 2009–2011.
18. Statistical Bulletin. — Vol. 23. — ССАМЛР, 2011.
19. Yearbook Fishery Statistics. — ФАО, 2010.

Список сокращений:

БРТ — брутто-регистрационные тонны,
 ИЭЗ — исключительная экономическая зона,
 МИК — Межведомственная ихтиологическая комиссия,
 НАФО — см. NAFO,
 НЕАФК — см. NEAFC,
 ОДУ — общий допустимый улов,
 ФАО — см. FAO,
 DDP — Delivered Duty Paid,
 FAO — Food and Agriculture Organization of the United Nations,
 NAFO — Northwest Atlantic Fisheries Organization,
 NEAFC — North East Atlantic Fisheries Commission.

FEEDSTOCK SUPPLY TO MANUFACTURE PRODUCTS BASED ON MARINE BIOTECHNOLOGY

A.V. AGEEV

Noncommercial Partnership «Systems and Technology», Moscow

The current status of the national marine biotechnology. The emphasis is on providing the industry with raw materials both through the inland seas and watersheds, and in different economic zones and remote areas of the oceans.

Keywords: marine biotechnology, feedstock supply.

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ *VACILLUS COAGULANS* В ВЕТЕРИНАРИИ И ЗООТЕХНИИ

В.Н. АФОНЮШКИН^{1*}, Т.В. ПЛОТНИКОВА², А.Е. ДЕНИСЕНКО³

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск;

² ГНУ Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока Россельхозакадемии,
Новосибирская область;

³ ООО «Пробиотик центр», г. Королев Московской области

В кратком обзоре рассмотрены биологические свойства и возможности использования *Bacillus coagulans* в ветеринарии и зоотехнии.

Ключевые слова: *Bacillus coagulans*, пробиотики, ветеринария, зоотехния.

Bacillus coagulans — это вид, продуцирующий молочную кислоту и относящийся к роду *Bacillus*. Микроорганизм был впервые идентифицирован и описан в 1932 году Horowitz-Walssowa и Nowotelnow [12] в качестве *Lactobacillus sporogenes* и впоследствии реклассифицирован в 1939 г. как *Bacillus coagulans* и зарегистрирован в 5-й редакции справочника-определителя бактерий Bergey. Изначально он был отнесен к спорообразующим лактобактериям. Сходство внешних характеристик *Bacillus coagulans* с признаками обоих родов — *Lactobacillus* и *Bacillus*, его таксономическое положение между семействами *Lactobacillaceae* и *Bacillaceae* были весьма дискуссионными. Тем не менее в седьмой редакции Bergey он был окончательно отнесен к роду *Bacillus*.

Для выявления различий между родами, сходными морфологически и обладающими сходными биохимическими и физиологическими характеристиками [12, 16], были использованы ДНК-технологии. *Bacillus coagulans* часто именуют по-прежнему — *Lactobacillus sporogenes*. Хотя *Bacillus coagulans* продуцирует L-молочную кислоту, микроорганизм, использующий этот продукт, не является молочнокислой бактерией, так же, как виды *Bacillus* не относятся к молочнокислым бактериям. По определению, молочнокислые бактерии (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) не образуют спор. Таким образом, использование наименования *Lactobacillus sporogenes* в строгом смысле некорректно.

B. coagulans — грамположительная палочка (0,9 × 3–5 мкм, каталазопозитивная, спорообразующая, подвижная, факультативный анаэроб. На стационарной фазе роста могут образовываться грамтрицательные формы. Температурный оптимум роста — 50 °С, растет в диапазоне температур 30–55 °С. Оптимальная рН — 5,5–6,5. Реакция Фогеса — Проскауэра положительна. Споры *B. coagulans* эллипсоидальной формы, локализуются в одном из полюсов клетки, резистентны к нагреванию и неблагоприятным условиям окружающей среды, способны выживать также в присутствии разбавленных растворов HCl или NaOH. Активация спор происходит в кислой среде желудка, после чего в кишечнике начинается их рост и пролиферация. Базовые характеристики приведены в таблице 1.

Bacillus coagulans была добавлена EFSA (European Food Safety Authority) в лист презумпции безопасности [21], признана в США Центром ветеринарной медицины FDA и Европейским Союзом, представляющим ветеринарную ценность и безопасным (GRAS — generally recognized as safe). Микроорганизм также зарегистрирован AAFCO (Association of American Feed Control Officials — Американской ассоциацией управлений по контролю продуктов питания) для применения при производстве животноводческой продукции. Он в основном используется для ветеринарных целей, в особенности как пробиотик для свиней и креветок. Также отмечено применение этих бактерий у человека, в том числе для восстановления вагинальной микрофлоры [20], лечения патологии желудочно-кишечного тракта, метеоризма и синдрома раздражения кишечника [9], повышения иммунного ответа при вирус-

© 2011 г. Афонюшкин В.Н., Плотникова Т.В., Денисенко А.Е.

* **Автор для переписки:**

Афонюшкин Василий Николаевич

к.б.н., Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН, Новосибирск

ных инфекциях [3]. Бактерия была признана безопасной в качестве пищевого ингредиента [8].

Таблица 1

Основные характеристики *B. coagulans* в сравнении с родами *Bacillus* и *Lactobacillus*

Характеристики	Название вида и родов микроорганизмов		
	<i>B. coagulans</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>
Каталаза	+	+	-
Оксидаза	-	+	
Восстановление нитрата	-	+ a	-
Споры	+	+	-
Подвижность	+	+	-/+
Продукция молочной кислоты	+	-	+
Мезо-диаминопимелиновая кислота	+	+	-/+

В 2003 году был опубликован большой обзор об использовании спорообразующих бактерий, включая *B. coagulans*, в качестве пробиотика у человека. В нем было сделано заключение о крайне ограниченном количестве исследований об эффективности *B. coagulans* в качестве пробиотика у людей [20]. Однако эти данные не включают исследований, проведенных ранее 2003 г. В более современных исследованиях проводилось изучение терапии синдрома раздражения кишечника. В них был использован комплексный продукт, включающий *B. coagulans*, *L. acidophilus* и *S. salivarius ssp thermophilus* и несколько растительных экстрактов. Эффект был минимален, нельзя было его соотнести с бактериями или иными компонентами смеси [6]. В другом исследовании 2003 года показано уменьшение диареи у детей: в нем использовались *B. coagulans* и фрукто-олигосахариды [11]. Еще в одной недавней публикации [10] демонстрируется позитивный эффект *B. coagulans* при вагинитах, но, вероятно, не в качестве пробиотика (то есть при местном применении). Наконец, появился ряд публикаций о применении *B. coagulans* в качестве пробиотика для личинок креветок [18, 22] и свиней [13].

Ввиду способности хорошего роста в кислой среде и способности к продукции большого количества молочной кислоты *B. coagulans* нередко используется

в кисломолочных продуктах, овощах и фруктах [2, 5]. Производство различных продуктов, таких как молочная кислота и термостабильные ферменты, вышло на промышленный уровень [4, 17].

Исследования эффектов *B. coagulans* в отношении животных в основном проведены в Италии. Эти работы посвящены изучению влияния на рост и состав микрофлоры кишечника *B. coagulans* CNCM I-1061 [1]. Данные, опубликованные в этих исследованиях, показывают значительные изменения у цыплят, в рацион которых была добавлена *B. coagulans*, в сравнении с цыплятами, выращиваемыми без добавок, либо с использованием антибиотиков в качестве основного ростостимулирующего и профилактического средства, масса тела и среднесуточный прирост были выше у цыплят, получавших *Bacillus*. В сравнении со стандартным рационом или рационом, включающим цинк-бацитрацин, добавление *B. coagulans* в рацион поросят значительно снижало смертность, улучшало среднесуточные привесы и конверсию корма [1]. В этом же исследовании анализ фекальной микрофлоры показал увеличение отношения аэробных спорообразующих бактерий к анаэробным и уменьшение анаэробных кокков, коли-форм и бактериоидов у животных, получавших *B. coagulans*.

Donskey C.J. et al. использовали мышиную модель с ванкомицин-резистентными энтерококками для проверки гипотезы о том, что пероральное применение *B. coagulans* позволяет уменьшить плотность колонизации [7]. В результате было выяснено, что из трех штаммов энтерококков (два штамма имели ген VanB и один — VanA) только один VanB штамм был чувствителен к терапии *B. coagulans*, что свидетельствовало о штамм-зависимой активности.

Что касается исследований на людях, то нами найдено только три клинических исследования, описывающих пробиотическую активность *B. coagulans* у человека. Два из этих сообщений относятся к одному и тому же исследованию [14, 15]. В этих исследованиях небольшая группа пациентов (n=17) с гиперлипидемией была подвергнута лечению *B. coagulans*, которую называли *L. sporogenes*, в течение трех месяцев (360 млн. спор в день) и тестировалась сыворотка крови на уровень липидов. Назначение *B. coagulans* приводило к значительному уменьшению содержания общего холестерина, LDL-холестерина, отношений общего холестерина к HDL-холестерину и LDL-холестерина к HDL-холестерину, а также снижению уровня HDL холестерина. Пока эти данные можно оценить как интересное пилотное исследование, но делать окончательные выводы о роли *B.*

coagulans в контроле липидов сыворотки крови у гиперлипидемических пациентов пока преждевременно [20].

Была изучена эффективность препарата фруктоолигосахаридов (FOS)-*B. coagulans* для профилактики постантибиотической диареи у детей [11]. В этом многоцентровом, рандомизированном исследовании с двойным плацебо контролем на 98 пациентах наблюдали значительное ослабление или прекращение диареи у детей, получавших FOS-*B. coagulans*.

Заключение

В сравнении с более хорошо изученными пробиотиками данных об использовании *B. coagulans* в качестве пробиотика явно недостаточно. Тем не менее имеющаяся на сегодняшний день информация позволяет прогнозировать, что пробиотические препараты на основе *B. coagulans* будут играть не меньшую роль в ветеринарии, чем другие споровые пробиотики.

Литература

1. *Adami A. and Cavazzoni V.* Biomass production, preservation and characteristics of a strain of *Bacillus coagulans* as probiotic // *Microbiologie – Aliments – Nutrition.* – 1993. – Vol. 11. – P. 93–100.
2. *Anderson R.E.* Growth and corresponding elevation of tomato juice pH by *Bacillus coagulans* // *J. of Food Science.* – 1984. – Vol. 49. – P. 647–649.
3. *Baron M.* A patented strain of *Bacillus coagulans* increased immune response to viral challenge // *Postgraduate medicine.* – 2009. – Vol. 121 (2). – P. 114–118.
4. *Batra N., Singh J., Banerjee U.C., Patnaik P.R. and Sobti R.C.* Production and characterization of a thermostable beta-galactosidase from *Bacillus coagulans* RCS3. // *Biotechnology and Applied Biochemistry.* – 2002. – Vol. 36. – P. 1–6.
5. *De Clerck E., Rodriguez-Diaz M., Forsyth G., Lebbe L., Logan N.A. and De Vos P.* Polyphasic characterization of *Bacillus coagulans* strains, illustrating heterogeneity within this species, and emended description of the species // *Systematic Applied Microbiology.* – 2004. – Vol. 27. – P. 50–60.
6. *De Vecchi E., Drago L.* *Lactobacillus sporogenes* or *Bacillus coagulans*: misidentification or mislabelling? [Электронный ресурс]: [http://www.ecosistemavaginale.it/Lactobacillus sporogenes or Bacillus coagulans.doc](http://www.ecosistemavaginale.it/Lactobacillus_sporogenes_or_Bacillus_coagulans.doc) (November 2006)
7. *Donskey C.J., Hoyen C.K., Das S.M., Farmer S., Dery M., and Bonomo R.A.* Effect of oral *Bacillus coagulans* administration on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized mice // *Letters in Applied Microbiology.* – 2001. – Vol. 33. – P. 84–88.
8. *Endres J.R., Clewell A., Jade K.A., Farber T., Hauswirth J., Schauss A.G.* Safety assessment of a proprietary preparation of a novel Probiotic, *Bacillus coagulans*, as a food ingredient // *Food and Chemical Toxicology.* – 2009. – Vol. 47 (6). – P. 1231–1238.
9. *Hun L.* *Bacillus coagulans* significantly improved abdominal pain and bloating in patients with IBS // *Postgraduate medicine.* – 2009. – Vol. 121 (2). – P. 119–124.
10. *Kale V.V., Trivedi R.V., Wate S.P., and Bhusari K.P.* Development and evaluation of a suppository formulation containing lactobacillus and its application in vaginal diseases // *Ann N.Y. Acad Sci.* – 2005. – Vol. 1056. – P. 359–365.
11. *La Rosa M., Bottaro G., Gulino N., Gambuzza F., Di Forti F., Ini G., Tornambe E.* Prevenzione della diarrea associata ad antibiotici con *Lactobacillus sporogenes* e fruttoligosaccaridi. Studio pediatrico multicentrico in doppio cieco vs placebo // *Minerva Pediatr.* – 2003. – Vol. 55. – P. 447–452.
12. *Lactobacillus sporogenes* a probiotic species? [Электронный ресурс]: <http://www.food-info.net/uk/ff/sporogenes.htm>.
13. *Lonkar P., Harne S.D., Kalorey D.R., Kurkure N.V.* Isolation, in vitro antibacterial activity, bacterial sensitivity and plasmid profile of lactobacilli // *Asian Australasian J. Animal Sci.* – 2005. – Vol. 18. – P. 1336–1342.
14. *Mohan J.C., Arora R., and Khalilullah M.* Preliminary observations on effect of *Lactobacillus sporogenes* on serum lipid levels in hypercholesterolemic patients // *Indian J. of Medical Research.* – 1990. – Vol. 92. – P. 431–432.
15. *Mohan J.C., Arora R., and Khalilullah M.* Short term hypolipidemic effects of oral *Lactobacillus sporogenes* therapy in patients with primary dyslipidemias // *Indian Heart Journal.* – 1990. – Vol. 42. – P. 361–364.
16. Official list of bacterial names [Электронный ресурс]: <http://www.bacterio.cict.fr/allnamesac.html>.
17. *Payot T., Chemaly Z. and Fick M.* Lactic acid production by *Bacillus coagulans* – kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentations // *Enzyme and Microbial Technology.* – 1999. – Vol. 24. – P. 191–199.
18. *Rani A.M.B., Reddy A.K., Sahu N.P.* Growth enhancement and survival of *Macrobrachium rosenbergii* larvae fed *Artemia* nauplii enriched with cod liver oil and/or *Lactobacillus* // *Israeli J. Aquacult. Bamidgeh.* – 2006. – Vol. 58. – P. 183–190.
19. *Sanders M.E., Morelli L. and Tompkins T.A.* Sporeformers as human probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus* // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* – 2003. – Vol. 2. – P. 101–110.
20. *Sanders M.E., Morelli L., Tompkins T.A.* Sporeformers as Human Probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus* // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* – 2003.

21. The maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed – Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards [Электронный ресурс]: http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1211902221481.htm.
22. Venkat H.K., Sahu N.P., Jain K.K. Effect of feeding Lactobacillus-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) // *Aquaculture Res.* – 2004. – Vol. 35. – P. 501–507.

PROSPECTS OF APPLICATION OF BACILLUS COAGULANS IN THE VETERINARY AND ZOOTECHNICS

V.N. AFONYUSHKIN¹, T.V. PLOTNIKOVA², A.E. DENISENKO³

¹ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk;*

² *Institute of Experimental Veterinary of Siberia and the Far East, RAAS, Novosibirsk region;*

³ *ООО Probiotic Center, Korolev, Moscow Region*

In a brief review considers the biological properties and possible use of *Bacillus coagulans* in veterinary and zootechnics.

Keywords: *Bacillus coagulans*, probiotics, veterinary science, zootechnics.

ЮБИЛЕЙНЫЕ И ЗНАМЕНАТЕЛЬНЫЕ ДАТЫ 2011 ГОДА*

СОБЫТИЯ, ФАКТЫ

1761 — немецкий ботаник И. Кельрейтер (1733—1806) сообщил об успешном скрещивании некоторых видов хлебных злаков.

1831 — английский ботаник Р. Браун (1773—1858) впервые описал ядро растительной клетки.

1861 — Луи Пастер открыл микроорганизмы, вызывающие маслянокислое брожение.

1866 — публикация классической работы Г. Менделя «Опыты над растительными гибридами».

1866 — открытие биогенетического закона Эрнстом Геккелем (1834—1919).

1871 — немецкий биохимик Э. Гоппе-Зейлер (1825—1895) обнаружил инвертазу — фермент, расщепляющий сахарозу на глюкозу и фруктозу.

1876 — Ф. Гальтон предложил «закон анцестрального наследования», который впоследствии был отвергнут.

1881 — Луи Пастер получил первые вакцины против куриной холеры.

1881 — Роберт Кох предложил методы для выращивания чистых культур бактерий (агар, желатин и др.).

1881 — введение термина «митоз» немецким цитологом Вальтером Флемингом (1843—1905).

1896 — разработка хромосомной теории наследственности американским цитологом Э. Вильсоном (1856—1930). Публикация его книги «Клетка в развитии и наследственности».

1901 — М. Бейеринк выделил из почвы чистую культуру аэробных неспорообразующих бактерий, фиксирующих молекулярный азот (новый микроорганизм получил наименование *Azotobacter chroococcum*).

1906 — У. Бэтсон предложил термин «генетика».

1911 — Т.Х. Морган в опытах на дрозофиле обнаружил связь между конкретными генами и конкретными хромосомами.

1911 — открытие Раусом вируса саркомы (впоследствии в 1966 г. он получил за это Нобелевскую премию).

1911 — американский биолог Ч. Давенпорт (1866—1944) выпустил книгу «Heredity in Relation to Eugenics» («Наследственность в свете евгеники»).

1916 — ученик Т.Х. Моргана — К. Бриджес (1889—1938) открыл явление анеуплоидии (нерасхождение X хромосом в мейозе).

1921 — Г. Меллер в лаборатории Т.Х. Моргана обнаружил способность фагов и генов к размножению, то есть к самовоспроизведению.

1926 — выход в свет книги Т.Х. Моргана «Теория гена».

1931 — Б. Мак-Клинток (будущий лауреат Нобелевской премии 1983 г.) и Х. Крейтон в экспериментах на кукурузе доказали, что в основе рекомбинации лежит кроссинговер.

1941 — американские генетики Дж. Бидл и Э. Тейтем предложили гипотезу «один ген — один фермент» (им была присуждена Нобелевская премия в 1958 г.).

1941 — первое употребление термина «генетическая инженерия».

1946 — М. Дельбрюк и А. Херши независимо друг от друга показали генетическую рекомбинацию у вирусов.

1946 — Дж. Ледерберг и Э. Тейтем показали, что между членами генетически неоднородной популяции *E. coli* может происходить обмен генетической информацией и возникать новые генетические комбинации (генетическая рекомбинация).

* Материал подготовлен О.В. Воробьевой

1946 — присуждение Нобелевской премии по химии: одну половину — Джеймсу Бетчеллеру Самнеру за открытие свойств кристаллизации ферментов, а вторую половину — Джону Говарду Нортропу и Уэнделлу Мередиту Стэнли за получение в чистом виде ферментов и белковых вирусов.

1946 — присуждение Нобелевской премии по физиологии и медицине Герману Меллеру за открытие возникновения мутаций под действием рентгеновских лучей.

1956 — Артур Корнберг выделил ДНК-полимеразу (за это вместе с Северо Очоа был удостоен Нобелевской премии в 1959 г.).

1956 — американский биохимик Х. Френкель-Конрат (1910–1999) разделил вирус табачной мозаики на белок и нуклеиновую кислоту и осуществил «самосборку» вируса.

1961 — открытие генетического кода: М. Ниренберг вместе с Г. Маттеи обнаружили первый триплет из полиурацила, кодирующий фенилаланин. Сообщение М. Ниренберга об этом — на V Международном биохимическом конгрессе в Москве; соответствующая публикация: M.W. Nirenberg, J.H. Matthaei. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic poliribonucleotides // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. — 1961. — Vol. 47. — N 10. — P. 1588–1602.

1961 — публикация статьи Ф. Жакоба и Ж. Моно о генетических регуляторных механизмах синтеза белка (J. Mol. Biol., 1961, Vol. 3, p. 318–356).

1966 — полная расшифровка генетического кода.

1966 — основание Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН.

1971 — американские исследователи С. Коэн и Г. Бойер независимо друг от друга разработали методы переноса гена из одного организма в другой (начало генной инженерии).

1976 — Национальный институт здоровья США выпустил первое руководство по экспериментам с рекомбинантной ДНК.

1976 — основание биотехнологической компании «Дженентек» (Бойер Г., Свэнсон Р.).

1981 — картирование гена инсулина (Harper M. et al.).

1981 — появление на рынке первых диагностикумов на основе моноклональных антител (США).

1981 — «Дженентек» создала гамма интерферон.

1986 — Лерой Худ разработал автоматический секвенатор.

1986 — публикация Ю.А. Овчинниковым статьи «Биотехнология — промышленный переворот XXI века».

1986 — первый неудачный эксперимент Министерства сельского хозяйства США по созданию трансгенных животных (свиней).

1986 — FDA выдало лицензию на производство первой рекомбинантной вакцины (против гепатита).

1986 — начало обсуждения проекта «Геном человека» (публикация статьи Ренато Дульбекко на эту тему в журнале «Science»).

1991 — выход в свет книги «Mendelian Inheritance in Man».

1991 — компания «Amgen» разработала новый класс лекарственных препаратов — колониестимулирующих факторов.

1996 — определение полной нуклеотидной последовательности генома пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

1996 — клонирование овцы шотландскими исследователями.

2001 — публикация генома человека в «Science» и «Nature».

2001 — окончание проекта картирования генома риса (компания «Синджента»).

ПЕРСОНАЛИИ

145 лет со дня рождения Т.Х. Моргана, американского генетика.

130 лет со дня рождения Александра Флеминга (1881–1955), шотландского микробиолога, первооткрывателя пенициллина, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1945).

125 лет со дня рождения В.С. Пустовойта (1886–1972), академика АН СССР и ВАСХНИЛ, отечественного селекционера.

115 лет со дня рождения и 25 лет со дня смерти Н.Н. Семенова (1896–1986), академика АН СССР, вице-президент АН СССР, лауреат Нобелевской премии 1956 г.

110 лет со дня рождения Лайнуса Полинга (1901–1994), американского химика, дважды лауреата Нобелевской премии (1954 г. — по химии за работы по природе химической связи и их приложению к определению структуры сложных соединений, 1962 г. — премия мира). Изучал строение молекул и природу химической связи методами квантовой механики. Сформулировал принципы образования ионных кристаллических структур. Занимался исследованием структуры белков, раскрытием молекулярных механизмов серповидноклеточной анемии. Начиная с 70-х его интересы переключились на изучение антиоксидантов (витамины Е и С). Иностраный член АН СССР (1958). Лауреат Международной Ленинской премии «За укрепление мира между народами» (1970).

110 лет со дня рождения С.Е. Северина (1901–1993), академика АН и АМН СССР, отечественного биохимика.

110 лет со дня рождения П.П. Лукьяненко (1901–1973), академика АН СССР и ВАСХНИЛ, отечественного селекционера.

105 лет со дня рождения и 30 лет со дня смерти Макса Дельбрюка (1906–1981), немецко-американского биофизика и молекулярного биолога, лауреата Нобелевской премии 1969 года по физиологии и медицине за исследования в области биохимии и механизмов размножения бактериофагов (совместно

с Сальвадором Лурья и Алфредом Херши). Подробнее см. публикацию о нем в нашем журнале: Воробьев В.С. Макс Дельбрюк — путь от физики к биологии: к 100-летию со дня рождения и 25-летию со дня смерти // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2006. — Т. 2. — № 3. — С. 68–77.

100 лет со дня рождения немецкого биохимика Ф. Линена (1911–1979), лауреата Нобелевской премии 1964 года по физиологии и медицине за открытия, связанные с механизмом и регуляцией метаболизма холестерина и жирных кислот (совместно с К. Блохом).

100 лет со дня рождения датско-английского иммунолога Нильса К. Ерне (1911–1994), лауреата Нобелевской премии 1984 года (совместно с Г. Келером и С. Мильштейном).

100 лет со дня рождения Уильяма Говарда Стайна (1911–1980), американского биохимика, лауреата Нобелевской премии 1972 года по химии за вклад в прояснение связи между химической структурой и каталитическим действием активного центра молекулы рибонуклеазы (половинная премия вместе со Станфордом Муром — вторая половина присуждена Кристиану Анфинсену за исследование, связанное с этой темой).

95 лет со дня рождения Фрэнсиса Крика (1916–2004), английского физика, первооткрывателя двойной спирали ДНК. Лауреат Нобелевской премии 1962 года по физиологии и медицине (совместно с Дж. Уотсоном и М. Уилкинсом). Занимался также проблемами генетического кода, механизмами памяти (актиновые элементы в постсинаптических структурах), научной публицистикой.

95 лет со дня рождения Мориса Уилкинса (1916–2004), английского физика. Вместе с Дж. Уотсоном и Ф. Криком удостоен Нобелевской премии в 1962 г.

95 лет со дня рождения Жана Батиста Габриеля Жоашема Доссэ (Jean Baptiste Gabriel Joachim Dausset) — род. в 1916 г. Французский иммунолог. Открыл в 1959 году HLA (человеческие лейкоцитарные антигены). Лауреат Нобелевской премии по медицине 1980 г. (совместно с Дж.Д. Снеллом, первооткрывателем

МНС — главного комплекса гистосовместимости, — и Б. Бенасеррафом).

95 лет со дня рождения шведского биохимика С.К. Бергстрема, лауреата Нобелевской премии 1982 года по физиологии и медицине за открытия, касающиеся простагландинов и близких к ним биологически активных веществ (совместно с Бенгтом Самуэльсоном и Джоном Вейном).

95 лет со дня рождения американского микробиолога Ф.Ч. Роббинса, лауреата Нобелевской премии 1954 г.

90 лет со дня рождения Ирины Николаевны Блохиной (1921–1999), академика РАН, отечественного микробиолога. Разрабатывала проблемы идентификации и классификации бактерий, дисбактериозов, иммунобиотехнологии. Лауреат Государственной премии СССР,

85 лет со дня рождения Пола Берга (Paul Berg) — род. в 1926 г. Американский биохимик. Лауреат Нобелевской премии по химии 1980 года. Первым получил рекомбинантную молекулу ДНК (в 1972 г.), то есть фактически он является основателем геной инженерии. Тем не менее вместе с другими крупными учеными в 1974 г. П. Берг выступил с предложением наложить мораторий на работы с рекомбинантными ДНК *in vitro*, который был прерван после Асиломарской конференции в 1975 году.

80 лет со дня рождения Гамильтона Отанела Смита (Hamilton Othanel Smith) — род. в 1931 г. Американский исследователь. В 1970 г. выделил фермент — рестрикционную эндонуклеазу у бактерии *H. influenzae*, — который рассекал чужеродную ДНК на фрагменты везде, где встречал запрограммированную последовательность из 6 оснований. В 1978 г. удостоен Нобелевской премии по медицине за открытие ферментов рестрикции и приложение этих знаний к проблемам молекулярной генетики (вместе с В. Арбером и Д. Натансом).

80 лет со дня рождения Александра Сергеевича Спирина (род. в 1931 г.), отечественного биохимика, академика РАН. Автор ряда фундаментальных исследований в области биохимии нуклеиновых кислот, в том числе работы, в которой предсказано существование информационной РНК (1957, 1958) — совместно с

А.Н. Белозерским. Лауреат Ленинской (1976) и Государственной (1986) премий СССР. Награжден Большой золотой медалью РАН им. М.В. Ломоносова (2001).

80 лет со дня рождения Николая Павловича Бочкова (род. в 1931 г.), отечественного медицинского генетика, академика РАН.

75 лет со дня рождения американского вирусолога Дж.М. Бишоп, лауреата Нобелевской премии 1989 г. за открытие клеточного происхождения ретровирусных онкогенов (совместно с Х.Э. Вармусом).

75 лет со дня рождения Виталия Ивановича Швеца (род. в 1936 г.), академика РАН, специалиста в области медицинской биотехнологии.

70 лет со дня рождения Владимира Олеговича Самойлова (род. в 1941 г.), отечественного биофизика, члена-корреспондента РАН.

65 лет со дня рождения Георга Келера (1946–1995), немецкого иммунолога, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине 1984 года за открытие и разработку принципов выработки моноклональных антител с помощью гибридом (половинная премия вместе с Сезаром Мильштейном — вторая половина была присуждена Нильсу К. Эрне).

100 лет со дня смерти Фрэнсиса Гальтона (1822–1911), английского исследователя генетических основ таланта, основателя евгеники.

95 лет со дня смерти И.И. Мечникова, русского микробиолога и иммунолога.

65 лет со дня смерти А.Н. Баха (1857–1946), отечественного химика, академика АН СССР. Основатель Института биохимии АН СССР (1935 г.), носящего его имя.

50 лет со дня смерти Эрвина Шредингера, австрийского физика, лауреата Нобелевской премии (1933 г.). Сыграл большую роль в развитии молекулярной биологии, написав книгу «Что такое жизнь с точки зрения физики» (1944). Книга имела большое значение для построения прочной физико-химической базы для биологии, обратив внимание многих специалистов к поискам в этом направлении.

50 лет со дня смерти бельгийского микробиолога и иммунолога Ж. Борде (1870–1961), лауреата Нобелевской премии 1919 г.

45 лет со дня смерти Л.А. Зильбера (1899–1966), отечественного вирусолога, академика АМН СССР.

35 лет со дня смерти Жака Моно (1910–1976), французского молекулярного биолога, лауреата Нобелевской премии 1963 г. за открытия, касающиеся генетической регуляции синтеза ферментов и вирусов (совместно с Андре М. Львовым и Ф. Жакобом).

35 лет со дня смерти Г.М. Франка (1904–1976), академика АН СССР, одного из основателей отечественной биофизики.

30 лет со дня смерти Н.В. Тимофеева-Ресовского (1900–1981), отечественного генетика.

25 лет со дня смерти А. Сент-Дьердьи, американского биохимика венгерского происхождения, лауреата Нобелевской премии 1937 г.

25 лет со дня смерти А.Е. Браунштейна (1902–1986), академика АН СССР, отечественного биохимика.

20 лет со дня смерти Сальвадора Лурия (1912–1991), итало-американского биолога, лауреата Нобелевской премии 1969 года (удостоен совместно с Максом Дельбрюком и Алфредом Херши за исследования в области биохимии и механизмов размножения бактериофагов).

СОБЫТИЯ ПЕРВОЙ ПОЛОВИНЫ 2011 ГОДА

21–24 февраля 2011 года в Хайдарабаде (Индия) прошел Форум «БиоАзия-2011». Организаторы Форума: FAВА (Федерация азиатских биотехнологических ассоциаций) и Правительство штата Андхра Прадеш. В работе Форума и выставки приняли участие свыше 1200 человек из более 40 стран. Наиболее крупные зарубежные делегации были из Китая, Ирана и Малайзии. В торжественной церемонии открытия Форума участвовали министры Правительства штата Андхра Прадеш, крупные бизнесмены, руководители зарубежных делегаций. Россия была представлена президентом Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова Р.Г. Васильевым, являющимся одновременно президентом FAВА. Р.Г. Васильев принял участие в официальной церемонии открытия Форума и выступил с почетной лекцией «Размышления о российско-индийском сотрудничестве в биотехнологии» (доклад был представлен совместно с Председателем Наблюдательного совета Союза биотехнологов России, Чрезвычайным и Полномочным Послом Российской Федерации В.И. Трубниковым). Во время Форума были проведены встречи и переговоры с индийскими и зарубежными коллегами. В результате был достигнут ряд договоренностей об осуществлении совместных проектов, согласован план работы FAВА на 2011 год и др. В ходе переговоров с представителями индийских деловых кругов высказано предложение о создании Российско-индийского бизнес-клуба (или делового совета) для усиления сотрудничества в различных сферах деятельности (биотехнология, фармацевтика, информатика и др.).

1 марта 2011 года в Москве были проведены Слушания Общественной палаты Российской Федерации на тему «Биологические коллекции России — основа устойчивого развития науки и наукоемких производств». В результате всестороннего обсуждения научных, производственных, правовых, экономических, организационных и иных аспектов проблемы сохранения и развития биологических коллекций и генетических ресурсов России участники Слушаний приняли РЕШЕНИЕ:

1. Считать приоритетной общегосударственной задачей сохранение и развитие коллекций биологических (в том числе почвенных) ресурсов — как важнейшего элемента инфраструктуры науки, образования и биоэкономики.

2. Просить Президента Российской Федерации рассмотреть вопросы сбора, сохранения, изучения и развития биологических коллекций и сохранения биологического разнообразия на Государственном Совете Российской Федерации.

3. Просить Государственную Думу Федерального Собрания Российской Федерации провести в 2011 году Парламентские слушания по вопросу сохранения и развития биологических коллекций в России.

4. Инициировать выработку долгосрочной государственной политики Российской Федерации в отношении изучения, гарантированного сохранения и устойчивого использования биологического разнообразия, включая комплексное решение правовых, экономических, организационных и иных вопросов. Для решения этих неотложных задач:

- создать постоянно действующую межведомственную комиссию с привлечением специалистов в области биологических коллекций, представителей РАН, РАМН, РАСХН, научных центров, обладающих соответствующими коллекциями, для оперативного обсуждения вопросов и поступающих предложений по совершенствованию деятельности биологических коллекций;

- ходатайствовать перед Правительством Российской Федерации о создании соответствующего подразделения при одном из профильных министерств (Минобрнауки России, Минпромторг России, Минсельхоз России, Минздравсоцразвития России, Минприроды России) с наделением его функциями координирующего органа по вопросам поддержания и развития коллекций биологических ресурсов;

- создать эффективную и отвечающую современному уровню развития информационных технологий систему мониторинга биологических коллекций Российской Федерации;

- провести на основе созданной системы мониторинга каталогизацию фондов всех действующих в стране биологических коллекций;

- разработать и принять программу дигитализации важнейших образцов биологических коллекций для обеспечения доступа к ним через Интернет.

5. Рассмотреть в рамках указанной межведомственной комиссии вопрос о составлении Перечня биологических коллекций национального значения как уникальных объектов инфраструктуры науки и биоэкономики — с соответствующим целевым долгосрочным

финансированием; подготовить и принять Федеральную целевую программу «Поддержка и развитие биологических коллекций России».

6. Министерством и ведомствам, в ведении которых находятся организации и учреждения, имеющие биологические коллекции, а также ведомствам, активно использующим результаты их деятельности:

- безотлагательно принять ведомственные программы ревизии их состояния, поддержки и развития, включая как неотложные меры по предотвращению деградации и дальнейшего исчезновения фондов, так и реальные планы их развития — в том числе формирования, объема, качества, надежности поддержания фондов, площадей (помещения, биохранилища, земельные участки), обеспеченности квалифицированными кадрами и оборудованием;

- в качестве срочной неотложной меры по обеспечению сохранности и развитию биологических коллекций Министерству образования и науки РФ организовать специальные лоты по поддержке коллекций или их ассоциаций в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007—2012 годы», мероприятия 1.8 (уникальные объекты инфраструктуры) и 5.2 (центры коллективного пользования), с применением международных стандартов оценки их деятельности;

- с целью предотвращения дальнейшего исчезновения биологических коллекций при вузах включить факт наличия коллекций (в первую очередь, входящих в системы международной регистрации и имеющих доступные он-лайн каталоги) в систему рейтинговых оценок деятельности вузов;

- поддержать инициативу по созданию на их базе Национальных биоресурсных центров, государственных депозитариев биологических видов растений, а также других прогрессивных форм организации коллекционного дела, соответствующим высшим мировым достижениям, с должной правовой и экономической проработкой вопроса.

7. Принять меры к безусловному выполнению Российской Федерацией мероприятий, вытекающих из ранее принятых страной обязательств по Конвенции о биологическом разнообразии и Протоколам к ней, Конвенции о международной торговле видами фауны и флоры, находящимися под угрозой исчезновения (Конвенция СИТЕС), Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры, включая формирование реально действующей инфраструктуры в Российской Федерации

(административные и научные органы, информационный центр, клирингхаус и др.). Рекомендовать Министерству природных ресурсов и экологии Российской Федерации срочно разработать и ввести в действие Порядок регистрации научных коллекций для целей пункта 6 статьи 7 Конвенции СИТЕС.

8. Обратиться в Правительство Российской Федерации и Государственную Думу Федерального Собрания Российской Федерации с предложением разработать и принять Федеральный закон, регулирующий вопросы собственности на объекты биологических коллекций, их стоимости, переуступке прав пользования и их надлежащего процессуального оформления, с учетом развивающегося национального законодательства и международного опыта.

9. Обратиться в Правительство Российской Федерации с предложением провести отбор коллекций, уполномоченных от имени государства осуществлять депонирование биологического материала для целей национальной и международной патентной процедуры, а также составить и утвердить Правила депонирования биологического материала и его выдачи третьим лицам для подобных коллекций.

10. Просить Министерство промышленности и торговли Российской Федерации, Федеральную таможенную службу усовершенствовать процедуры экспортного и импортного контроля за движением биологических материалов, касающиеся, в том числе сокращения сроков и упрощения оформления документации по коллекционному и некоммерческому научному обмену и импорту непатогенных организмов (не включенных в существующие ограничительные списки), снятия ограничений на экспорт выделенных из почв организмов — с учетом сложившейся международной практики.

11. Рекомендовать заинтересованным министерствам и ведомствам (Минобрнауки России, Минпромторгу России, Минсельхозу России, Минздравсоцразвития России, Рослесхозу и др.), РАН, РАМН, РАСХН во взаимодействии с Минприроды России, бизнес-структурами и общественными организациями усовершенствовать механизмы комплексного использования образцов биоматериалов в производственных процессах.

12. Широко информировать общественность о значимости проблемы сохранения биологических коллекций и генетических ресурсов России и обеспечить эффективный общественный контроль за реализацией декларируемых намерений, в том числе со стороны Общественной палаты Российской Федерации.

4–5 марта 2011 года в Казани состоялся Всероссийский Семинар-совещание заведующих кафедрами биотехнологии и ведущих преподавателей по специальностям 240901 «Биотехнология» и 240902 «Пищевая биотехнология», по направлению подготовки 240700 «Биотехнология». Организаторы: Казанский государственный технологический университет (КГТУ – КНИТУ), ОАО «Татнефтехиминвестхолдинг», Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова. Участников мероприятия приветствовали ректор КГТУ, профессор Г.С. Дьяконов, вице-президент ОАО «Татнефтехиминвестхолдинг», профессор И.А. Якушев. Были заслушаны доклады президента Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, профессора Р.Г. Василова о перспективах развития биотехнологии в РФ, директора Института биохимии им. А.Н. Баха РАН, профессора В.О. Попова о Российской технологической платформе «Биоиндустрия и биоресурсы» – БИОТЕХ 2030. Непосредственно вопросы подготовки кадров биотехнологов были подняты в докладе руководителя Учебно-научного центра Института биоорганической химии РАН, к.б.н. Т.В. Овчинниковой и заведующего кафедрой биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова, академика РАН В.И. Швеца, а также в докладе проректора по учебно-методической работе РХТУ им. Д.И. Менделеева, профессора В.Е. Кочурихина. В рамках семинара был организован круглый стол, на котором были подробно обсуждены наиболее актуальные проблемы подготовки кадров в области теоретической и практической биотехнологии

ПУБЛИКАЦИИ

Фаллер Д.М. Молекулярная биология клетки: руководство для врачей. – М.: Бином, 2011. – 272 с.

Аннотация. Предлагаемая вниманию читателей книга американских специалистов посвящена изложению основ молекулярной биологии клетки. Особое внимание уделено строению клеточных мембран, внутриклеточных органелл, цитоскелета и митохондрий. Подробно рассматриваются процессы клеточного деления на молекулярном уровне и процессы межклеточного взаимодействия, механизмы межклеточной и внутриклеточной передачи сигнала. Достоинством книги является увязывание этих сведений с механизмами развития разнообразных врожденных, наследственных и приобретенных забо-

леваний и с современными методами их лечения. Книга предназначена для студентов медицинских институтов, аспирантов, научных работников и врачей-клиницистов разных специальностей.

Chauhan A.K., Varma A. A Textbook of Molecular Biotechnology. – I.K. International, 2010. – 1352 p.

Резюме. В книге описывается роль биотехнологии в различных сферах человеческой деятельности – сельском хозяйстве, фармацевтике, протеомике, метагеномике и др. Даны материалы для высшего и последилового образования с широким охватом тем современной биотехнологии. К написанию глав книги были приглашены известные специалисты.

Орехова С.Н. Фармацевтическая биотехнология. Руководство к практическим занятиям. – М.: ГЭОТАР, 2009. – 384 с.

Аннотация. В учебном пособии представлены сведения о современных методах получения медицинских препаратов в условиях промышленного биофармацевтического производства. Наибольшее внимание уделено биотехнологическим аспектам производства антибиотиков. Подробно освещены методы выделения из почвы микроорганизмов-продуцентов антибиотиков, их идентификация по культурально-морфологическим признакам и хранение микроорганизмов-продуцентов. Представлены микробиологические методы определения чувствительности и концентрации антибиотиков. Даны сведения о промышленном получении препаратов различных фармакологических групп (витамины и коферменты, аминокислоты, стероидные гормоны и др.) с помощью биотехнологии. Показаны примеры получения рекомбинантных структур в лабораторных условиях. Рассмотрены технологические приемы, используемые для оценки качества готовых вакцин. В учебном пособии приведены все необходимые программные материалы для прохождения курса фармацевтической биотехнологии студентами медицинских вузов. Для облегчения усвоения материала пособие содержит словарь-справочник с комментариями. Предназначено студентам, интернам, аспирантам и преподавателям медицинских вузов.

Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry (Lippincott's Illustrated Reviews Series). 4th ed. – Lippincott Williams & Wilkins, 2010. – 544 p.

Резюме. Иллюстрированное издание биохимического руководства авторитетного издательства.

Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. 4th ed. CD-ROM Version / R.L. Lundblad, F. Macdonald (Eds.). – CRC Press, 2010. – 1264 p.

Резюме. Руководство в обобщенной форме дает представление о ключевых темах биохимии и молекулярной биологии: аминокислоты, пептиды, витамины, коэнзимы, протеомика, геномика, клеточная биология. Приводятся справочные данные по лабораторным вопросам.

Das H.K. Textbook of Biotechnology. 4th ed. – Wiley India Pvt Ltd., 2010. – 1476 p.

Резюме. Четвертое издание известного руководства. В нем существенно улучшен порядок преподнесения материала по сравнению с предыдущими изданиями (пересмотр начался с третьего издания). Значительно переработаны разделы медицинской микробиологии, биофизической химии, геномики. Существенно улучшены: глава 1 «Биомолекулы», глава 6 «Метаболические пути и их регуляция», глава 10 «Медицинская микробиология», глава 13 «Молекулярная биология», глава 14 «Генная инженерия», глава 15 «Биотехнология растений», глава 16 «Геномика и функциональная геномика», глава 17 «Биопроцессы, инжиниринг и технологии», глава 22 «Права на интеллектуальную собственность в биотехнологии».

Glick B.R., Pasternak J.J., Patten Ch.L. Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA. 4th ed. – ASM Press, Washington DC, 2010 – 1018 p.

Резюме. Полностью переработанное и расширенное издание. В нем рассмотрены теоретические основы многих направлений практической биотехнологии: промышленной, сельскохозяйственной, фармацевтической и биомедицинской. Описываются методы секвенирования ДНК, производства генно-инженерных препаратов, вакцин, получения трансгенных растений и животных. В книге более 630 иллюстраций и 120 таблиц. В каждой главе даются резюме, вопросы и примеры.

Kennedy S. and Oswald N. (Eds.) PCR Troubleshooting and Optimization: The Essential Guide. – Caister Academic Press, 2011. – 236 p.

Резюме. В книге 11 глав, написанных разными авторами. В них излагаются особенности метода ПЦР, обсуждаются проблемы контроля, объясняется значение стандартных кривых, анализируются причины артефактов и неисправностей и т.д. В отдельных главах описываются история ПЦР, применение ПЦР в метагеномике, ПЦР в мкл-шкале и др.

Marco D. Metagenomics: theory, methods and applications. – Caister Academic Press, 2010. – 212 p.

Резюме. В книге представлены основы метагеномики — быстро развивающейся области молекулярной биологии. В ней изложены концепции, предметная область, методы, обсуждены проблемы горизонтального трансфера генов, осуществлен анализ сложных микробных сообществ, баз данных, взаимодействий растений и микробов, рассмотрены вопросы биоремедиации, промышленных биопродуктов, метагеномики архей, микробиома человека, а также освещены философские аспекты метагеномики.

ПРЕДСТОЯЩИЕ МЕРОПРИЯТИЯ 2011 ГОДА

КОНФЕРЕНЦИИ

18–22 апреля 2011 года в Пущино состоится 15-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». Организаторы: Пущинский научный центр РАН, Администрация города Пущино, Пущинский государственный университет. В числе основных направлений школы-конференции: биология и экология микроорганизмов, молекулярная биология, общая и функциональная биохимия, почвоведение и биогеохимия, прикладная биотехнология, приборы и методы для биологии, биотехнологии и медицины и др. Контакты: e-mail: orgcom@biology21.ru; www.biology21.ru.

26–28 апреля 2011 года в Санкт-Петербурге состоится I Международный форум по фармацевтике и биотехнологии IPhEB. Форум проводится при поддержке Полномочного представителя Президента РФ в Северо-Западном федеральном округе и Правительства г. Санкт-Петербурга. Контакты: e-mail: obr@bioros.info.ru.

17–19 мая 2011 года в Санкт-Петербурге состоятся международная выставка «Биоиндустрия-2011» и научно-практическая конференция «Биотехнологии и вызовы времени». Мероприятия пройдут в Выставочном комплексе ОАО «Ленэкспо». Информация: <http://lenexpo.ru/node/34383?from=57>.

24–26 мая 2011 года в Барселоне (Испания) состоится X Ежегодный конгресс по рекомбинантным антителам (10th Annual Congress Recombinant Antibodies). Информация: <http://www.informaglobalevents.com/event/antibodies1>.

6–8 июня 2011 года в Хайдарабаде (Индия) будут организованы Международная конференция и выставка по протеомике и биоинформатике (International Conference and Exhibition on Proteomics and Bioinformatics). Информация: <http://www.omicsonline.org/proteomicsbioinformatics2011>.

9 июня 2011 года в Москве, в Государственной Думе Федерального Собрания РФ состоится Круглый

стол «О совершенствовании законодательного обеспечения сохранения биологических коллекций для развития биотехнологической отрасли Российской Федерации». Контакты: e-mail: obr@bioros.info.ru.

21–24 июня 2011 года в Санкт-Петербурге будет проведена Международная конференция «Возобновляемые лесные и растительные ресурсы: химия, технология, фармакология, медицина». Организаторы: Санкт-Петербургская государственная лесотехническая академия, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербургский государственный технологический институт, Институт химии Коми НЦ УрО РАН, РФФИ и др. Направления конференции:

- химическая переработка древесины и другого растительного сырья;
- новые химические и биохимические технологии в области растительных ресурсов;
- новые полимеры и наноматериалы на основе древесины и растительного сырья;
- новые технологии в целлюлозно-бумажной промышленности;
- биотопливо из возобновляемых ресурсов;
- методы основного и тонкого органического синтеза на основе химических веществ древесины и растений;
- биологически активные вещества из древесины и различных видов растений;
- фармакологические и медицинские препараты из химических компонентов растительного сырья;
- утилизация отходов в химической технологии древесины;
- оценка запасов и потенциала возобновляемых ресурсов.

В рамках конференции планируется организация сателлитных мероприятий: молодежная конференция-школа «Физико-химические методы анализа органических соединений растительного происхождения» и симпозиум «Новые лекарственные препараты на основе растительных субстанций». Контакты: e-mail: RR2011@onlinereg.ru; <http://onlinereg.ru/RR2011>.

23–26 июня 2011 года в г. Чебоксары пройдет IV Чебоксарский экономический форум «Экономика России: технологии роста». Организатор Форума – Кабинет Министров Чувашской Республики. Соорганизаторы Форума – Государственная Дума Федерального Собрания Российской Федерации, Торгово-промышленная па-

лата Российской Федерации, Ассоциация региональных банков России, Межрегиональный центр промышленной субконтракции и партнерства, Представительство ГК «Агентство по страхованию вкладов» в Приволжском федеральном округе. На форуме планируется рассмотрение следующих вопросов:

- повышение инвестиционной привлекательности регионов Российской Федерации;
- объединение усилий представителей бизнеса, науки и власти в сфере реализации проектов государственно-частного партнерства и масштабному внедрению инновационных технологий в ключевых отраслях российской экономики;
- обсуждение перспектив перехода на инновационный путь развития и вход в обновленную структуру мировой экономики: нанотехнологии — фундамент новой наукоемкой экономики XXI века;
- организация основной площадки для презентации наиболее значимых инвестиционных и инновационных проектов, предлагаемых для реализации в Российской Федерации.

Контакты: 428004 г. Чебоксары, Президентский бульвар, 10. Факс: (8352) 62-87-34, 62-05-97. E-mail: ecopomy23@car.ru, ecopomy36@car.ru. Более подробная информация о Форуме на сайтах: www.ecopomy.car.ru, www.car.ru, www.chebef.car.ru.

27–30 июня 2011 года в Вашингтоне (США) состоится конгресс биотехнологов «BIO 2011 International Convention». Контакты: <http://www.convention.bio.org>.

30 июня — 1 июля 2011 года в г. Светлогорске Калининградской области будет проходить Научно-практическая конференция с международным участием «Пищевая и морская биотехнология для здорового питания и решения медико-социальных проблем». Организаторы конференции: Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, Правительство Калининградской области, Калининградский государственный технический университет. Мероприятие проводится при поддержке Федерального агентства РОССОТРУДНИЧЕСТВО, Союза предприятий биотехнологической отрасли и других государственных и общественных структур. Главные темы конференции:

- роль биотехнологии в обеспечении здорового питания,
- сырьевые ресурсы в пищевой и морской биотехнологии,

- функциональные продукты питания в диетологии,
 - биологически активные добавки и добавки к пище,
 - стандартизация, сертификация и безопасность в биотехнологии,
 - подготовка кадров в области биотехнологии,
 - перспективы формирования технологической платформы по морской биотехнологии.
- Контакты: e-mail: obr@bioros.info.ru.

30 июня — 1 июля 2011 года в Генте (Бельгия) состоится конференция «Обеспечение микробными ресурсами в биотехнологии: концепции и практика» («Microbial resource management in biotechnology: Concepts and applications»). Информация: <http://www.labmet.ugent.be/mrm>.

13–15 июля 2011 года в Амстердаме (Нидерланды) проводится Международная конференция по биоинформатике и биоинженерии (International Conference on Bioinformatics and Bioengineering). Информация: <http://www.waset.org/conferences/2011/amsterdam/icbb/>.

27–29 июля 2011 года в Париже (Франция) состоится международная конференция по биоинформатике, вычислительной биологии и биомедицинской инженерии (International Conference on Bioinformatics, Computational Biology and Biomedical Engineering). Информация: <http://www.waset.org/conferences/2011/paris/icbcbbe/>

23–29 августа 2011 года в Красноярске будет проведено Третье международное совещание по сохранению лесных генетических ресурсов Сибири, Организаторы: Федеральное агентство лесного хозяйства России, Сибирское отделение РАН, Научный совет РАН по проблеме леса, Институт леса им. В.Н. Сукачева РАН, Сибирский государственный технологический университет, Biodiversity International (Италия), International Union of Forest Research Organizations (IUFRO) и др. Рабочие языки: русский и английский. Главные вопросы, вынесенные на обсуждение:

- генетико-эволюционные основы устойчивости лесных экосистем.
- структура и динамика популяционных генофондов, стратегия сохранения лесных генетических ресурсов в условиях глобального изменения климата и антропогенного воздействия.
- «реликтовые» популяции в зоне рефугиумов: идентификация, генетические особенности и значение

для сохранения и воспроизводства генетических ресурсов бореальных лесов.

- объекты селекции и сохранения генофонда: состояние, генетическая паспортизация, отбор «элиты», лесосеменное районирование, генетика признаков устойчивости и продуктивности.

Контакты: e-mail: knyazevs@mail.ru.

31 августа — 3 сентября 2011 года в Будапеште (Венгрия) пройдет IV Европейская конференция по химии для наук о жизни (4th European Conference for Life Sciences — 4ECLS). Контакты: тел.: +36-1-2016883; факс: +36-1-2018056; e-mail: 4ecls@mke.org.hu.

14–16 сентября 2011 года в Торремолиносе, Малага (Испания) состоится IV Международная конференция по экологической, промышленной и прикладной микробиологии (IV International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology — BioMicroWorld 2011).

Направления конференции (пленарные заседания):

- Сельскохозяйственная, почвенная, лесная микробиология.
 - Аналитические и визуализационные методы. Микроскопия.
 - Экологическая, морская, водная микробиология. Геомикробиология.
 - Пищевая микробиология.
 - Промышленная микробиология — будущее биоиндустрии.
 - Медицинская микробиология — Фармацевтическая микробиология — Антимикробные агенты и химиотерапия.
 - Методы — Количественные модели и биоинформатика в микробиологии — Разработка технологий.
 - Физиология, метаболизм и генная экспрессия микроорганизмов.
 - Структура и морфогенез.
- Основная тематика сессий:*
- биоремедиация;
 - микробные биосенсоры;
 - бактериальные полимеры;
 - биопленки;
 - биоконтроль посредством бактериофагов;
 - метагеномика: комплексные микробные сообщества;
 - микробное разнообразие: некультивируемые микроорганизмы;

- микрофабрики (microfactories): микробное производство химикатов и фармацевтических препаратов.

Контакты: тел.: +34-924-258-815; факс: +34-924-263-053; e-mail: info@biomicroworld2011.com.

19–21 сентября 2011 года в Оксфорде (Великобритания) будет проведена первая международная Оксфордская конференция «Фаги 2011: применение бактериофагов» (Phages 2011: Bacteriophage Applications). Информация: <http://www.libpubmedia.co.uk/Conferences/Phages2011/Home.htm>

25–29 сентября 2011 года в Берлине (Германия) состоится VIII Европейский конгресс по химической инженерии (совместно с ProcessNet-Annual Meeting) и I Европейский конгресс по прикладной биотехнологии (совместно с DECHEMA's Biotechnology Annual Meeting). В качестве пленарных докладчиков приглашаются известные специалисты. Программа охватывает разнообразную тематику. Будет организована выставка. Информация: www.ecce2011.de/ECCE.html.

11–13 октября 2011 года в Ганновере (Германия) состоится очередная Международная выставка «БИОТЕХНИКА-2011». Это традиционное мероприятие, привлекающее профильных специалистов. «БИОТЕХНИКА» является одной из наиболее признанных выставок в области биотехнологии. Здесь создаются все условия для организации диалогами между специалистами, проведения партнеринга, осуществления обмена идеями и установления творческих контактов. Российские специалисты, включая Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова и Союз предприятий биотехнологической отрасли, активно участвуют в работе «БИОТЕХНИКИ» в Ганновере. Информация: http://www.biotechnica.de/homepage_d.

18–20 октября 2011 года в Амстердаме (Нидерланды) будет организован Европейский форум по промышленной биотехнологии и биоэкономике 2011 (European Forum for Industrial Biotechnology & The Biobased Economy 2011). Планируется обсуждение таких вопросов, как значение Common Agricultural Policy (CAP) для биоэкономики, роль стабильного обеспечения биоресурсами, перспективы и прогноз развития рынка, пакет инновационных биотехнологических продуктов и др. Информация: <http://www.efibforum.com/home.aspx>.

7–8 ноября 2011 года в Лондоне (Великобритания) состоится 2-дневная конференция по трансферу технологий — Technology Transfer (2 day). Будут обсуждены различные аспекты данной проблемы, включая рассмотрение потенциальной сложности технологии и трансфера продукции, вопрос о best practice в трансфере технологий и др. Информация: http://www.pharma-training-courses.com/technology-transfer-_14.htm.

23–25 ноября 2011 года в Венеции (Италия) состоится Международная конференция по биоинформатике и биоинженерии (International Conference on Bioinformatics and Bioscience Engineering). Планируется участие специалистов разного профиля, в том числе представителей академической науки, инженеров, иссле-

дователей, занятых в промышленном производстве и др. Информация: <http://www.waset.org/conferences/2011/venice/icbbe>.

28–30 ноября 2011 года в Венеции (Италия) пройдет Международная конференция по агробиотехнологии, биосистемам, биотехнологии и биоинженерии (International Conference on Agricultural, Biosystems, Biotechnology and Biological Engineering). Планируется специальный выпуск журнала «International Journal of Biological and Life Sciences», в котором будут представлены главные темы конференции на основании отбора материалов для публикации. Информация: <http://www.waset.org/conferences/2011/venice/icabbbe>.

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), не более 25 цитированных авторов; обзоры – не более 20–24 стр. (в среднем 40000 знаков), список литературы – не более 50 авторов. Требования к композиции рукописи: 1) оригинальные статьи – УДК, название, автор (ы), место работы, резюме на русском и английском языках, ключевые слова, введение, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение (выводы), литература, список сокращений; 2) краткие сообщения и обзоры строятся в виде сплошного текста, без вышеуказанных рубрикации, со списком литературы, но без резюме; 3) остальные материалы (письма в редакцию, хроникальные сообщения, рецензии и т.д.) представляются в произвольной форме.
4. Требования к оформлению содержания рукописи (таблицы, графики, формулы, фотографии, рисунки и др.). Рисунки прилагаются отдельно к тексту рукописи в бумажном и электронном виде в формате TIF или JPEG. Таблицы помещаются по ходу текста или прилагаются отдельно. Порядок оформления иллюстративного и иного дополнительного (пояснений, примечаний, благодарностей и т.д.) материала к текстам обычный.
5. Требования к цитированной литературе: Список литературы оформляется или в алфавитном порядке (вначале – литература на русском языке, затем – на иностранных), или по порядку упоминания и ссылок в тексте при использовании цифр. В последнем случае номер цитированного источника берется в тексте в квадратные скобки. Оформление отдельного источника литературы осуществляется в соответствии с общепринятыми для научных изданий библиографическими требованиями, включая международные установки (Index Medicus и др.).
6. Не допускается публикация работ, уже напечатанных или посланных в редакции других изданий.

7. При несоблюдении указанных правил статьи редакцией не принимаются.
8. Принятые к публикации рукописи проходят рецензирование, после чего принимается окончательное решение о возможности печатания. Отклоненные рукописи не возвращаются.
9. Редакция не несет ответственности за достоверность фактов, выводы и суждения, приведенные в представленном к печати и опубликованном материале авторов.
10. Редакция оставляет за собой право делать научную и литературную правку, в том числе сокращать объем статей.
11. Адрес редакции указан на титульном листе журнала.
12. Журнал является безгонорарным. Редакция резервирует для автора статьи по 1 экземпляру журнала. По вопросам приобретения отдельных номеров журнала следует обращаться в редакцию.



Подписано к печати 27.03.11
Формат 60/90¹/₈. 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. Регулярно 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 57 регионах России и объединяет свыше 3000 членов.

ОБР является членом Европейской федерации биотехнологии.

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

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

Членство в ОБР является бесплатным для физических лиц.

Контакты: Адрес: 1190171 Москва, Ленинский пр-т, 33

Тел.: +7 (495) 648-09-13

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