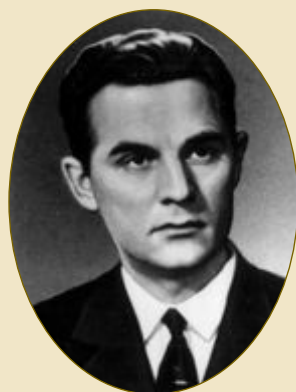


· БЕЛОЗЕРСКИЙ · ТОДД · СЕНГЕР · ОЧОА ·

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

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

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



Т. 6, № 3
2010

· СМИТ · ГИЛБЕРТ · БЕРГ · ЭНГЕЛЬГАРДТ ·

2010, Т. 6, № 3

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.А. Вахитов (Уфа), М.С. Вонский (Санкт-Петербург),
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), Е.Н. Орешкин (Москва),
А.Н. Панин (Москва), Е.В. Пименов (Киров), В.О. Попов (Москва),
К.Г. Скрыбин (Москва), Г. Хаммерлинг (Германия), Р.М. Хаитов (Москва),
В.И. Швец (Москва), Н.К. Янковский (Москва)

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

Зав. редакцией О.В. Воробьева
Адрес: 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, 2010.

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

К читателям. *Р.Г. Василев* 4

Оригинальные статьи

Биосенсор для экспресс-анализа биохимического потребления кислорода на основе дрожжевых микроорганизмов родов *Candida* и *Debaryomyces*.

О.Н. Понаморева, В.А. Арляпов, С.С. Каманин, Н.Ю. Юдина, А.Н. Решетилев 5

Состав и биологическая активность ультрафильтрата культуральной жидкости лактобактерий.

Е.И. Молохова, Ю.В. Сорокина, В.А. Несчислаев 13

Краткие сообщения

Выделение лигнин-разрушающего микробного ферментного препарата для получения концентрата пищевых волокон с повышенным содержанием целлюлозы.

В.В. Митерева 18

Производство и применение новой формы биопрепарата в Республике Татарстан для создания экологически чистой пищевой промышленности.

Р.П. Ибатуллина, Ф.К. Алимова, Д.И. Тазетдинова, Р.И. Тухбатова 22

Поиск варибельных генетических элементов у вируса инфекционной анемии цыплят, способных влиять на реализацию патогенного потенциала вируса.

Н.А. Селиверстова 27

Глубинный способ получения посевных культур вакцинного производственного штамма сибиреязвенного микроба.

А.Н. Шевцов, В.В. Фокина, И.В. Дармов, И.Н. Седельников 30

Обзоры

Получение образцов синтетических природных соединений для биоскрининга: фармакологическая активность низкомолекулярных и полимерных компонентов растительного происхождения.

А.В. Кучин 35

Персонализированная медицина: возможности и действительность.

В.С. Баранов 39

Система биологического скрининга во Франции: стратегии и тенденции.

Вехари Саканян 44

Биотехнология в Италии: состояние и перспективы, в особенности в области белой биотехнологии.

Фабио Фава, Леонардо Санти 48

Рынок биопластиков — текущая ситуация и перспективы (PRO-BIP 2009).

Ли Шен, Мартин Патель 51

Основанный на биоводородной энергии самодостаточный подход к созданию автономного дома.

Шанг-Юан Чен 54

Биокатализаторы для ключевых стадий современных технологий производства сахаристых крахмалопродуктов.

Г.А. Коваленко 59

Страницы истории

К 70-летию со дня рождения австралийского иммунолога Питера Догерти, лауреата Нобелевской премии.

О.В. Воробьева 63

Хроника

События первой половины 2010 года 68

Правила для авторов 70

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. *R.G. Vasilov* 4

Original articles

Biosensor for rapid analysis of biochemical oxygen demand on the basis of yeast microorganisms genera *Candida* and *Debaryomyces*.

O.N. Ponamoreva, V.A. Arlyapov, S.S. Kamanin, N.Y. Yudina, A.N. Reshetilov 5

The composition and biological activity of *Lactobacillus* culture fluid ultrafiltrate.

E.I. Molokhova, Yu.V. Sorokina, V.A. Neschislyayev 13

Short communications

Isolation of lignin-degrading microbial enzyme for production of food fibers concentrate with high content of cellulose.

Mitereva V.V. 18

Production and use of new forms of biological preparation in Republic of Tatarstan for the creation of clean food.

R.P. Ibatullina, F.K. Alimova, D.I. Tazetdinova, R.I. Tuhbatova 22

Search variable genetic elements in the virus infectious anemia chickens that may affect the implementation of the pathogenic potential of the virus.

N.A. Seliverstova 27

Submerged method of preparing inoculation cultures of production vaccine *B. anthracis* strain.

A.N. Shevtsov, V.V. Fokina, I.V. Darmov, I.N. Sedelnikova 30

Reviews

Obtaining samples of synthetic natural compounds for bioscreening: pharmacological activity of low molecular weight and polymer components of plant origin.

A.V. Kuchin 35

Personalized medicine: opportunities and realities.

V.S. Baranov 39

The system of biological screening in France: strategies and trends.

Vehary Sakanyan 44

Biotechnology in Italy: state-of-the-art and prospects, in particular in the area of White Biotechnology.

Fabio Fava, Leonardo Santi 48

Bioplastics market – current situation and prospects (PRO-BIP 2009).

Li Shen, Martin Patel 51

A bio-hydrogen based energy self-sufficient approach for the autonomous house.

Shang-Yuan Chen 54

Biocatalysts for the key stages of the modern technologies of production of starch sugar.

G.A. Kovalenko 59

Pages of history

To the 70th anniversary of the Australian immunologist Peter Doherty, the Nobel winner.

O.V. Vorobyeva 63

The chronicle

Events of the first half-year 2010 68

Rules for authors 70

К читателям

Третий номер журнала за 2010 год содержит несколько оригинальных статей теоретического и методического плана. Так, в публикации профессора А.Н. Решетилова с коллегами из Тульского университета представлены результаты оригинальной разработки биосенсора для экспресс-анализа биохимического потребления кислорода. Исследователи из Перми (Молохова Е.И. и др.) привели данные об изучении состава и физико-химических характеристик ультрафильтрата культуральной жидкости лактобактерий.

В разделе «Краткие сообщения» собраны работы, затрагивающие отдельные частные вопросы по профильной тематике журнала: исследования Митеревой В.В. (Москва), Шевцова А.Н. и др. (Киров), Ибатуллиной Р.П. и др. (Казань), Селиверстовой Н.А. (Новосибирск).

В номере продолжено печатание материалов (в основном обзорного характера) II Международного конгресса «ЕвразияБио-2010». Причем, помещаются выступления как отечественных, так и зарубежных авторов по наиболее актуальным вопросам современной молекулярной биологии и биотехнологии (Баранов В.С., Кучин А.В., Коваленко Г.А., Фабио Фава, Шанг-Юан Чен, Мартин Патель, Вехари Сахаян). Среди зарубежных докладов я особенно хотел бы обратить внимание на сообщение тайваньского биотехнолога Шанг-Юан Чена об автономном доме, основанном на применении биоводородной энергетики. Интересную сводку представил член-корреспондент РАН В.С. Баранов (Санкт-Петербург) о перспективах развития персонализированной медицины и применения геномных технологий для охраны репродуктивного здоровья.

Журнал откликнулся на юбилейную дату — 70-летие со дня рождения Питера Догерти, известного иммунолога, лауреата Нобелевской премии, поместив специальную мемориальную статью о его жизненном и творческом пути.

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

БИОСЕНСОР ДЛЯ ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗА БИОХИМИЧЕСКОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕВЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ РОДОВ *CANDIDA* И *DEBARYOMYCES*

О.Н. ПОНАМОРЕВА¹, В.А. АРЛЯПОВ¹, С.С. КАМАНИН¹,
Н.Ю. ЮДИНА¹, А.Н. РЕШЕТИЛОВ^{2*}

¹ Тульский государственный университет, Тула;

² Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
Московская обл., Пушкино

Рассмотрена каталитическая активность штаммов в зависимости от фазы роста. Сравниваются параметры биосенсоров на основе дрожжевых штаммов *Candida maltosa* ВКМ У-2359, *Candida blankii* ВКМ У-2675 и *Debaryomyces hansenii* ВКМ У-2482. Показана принципиальная возможность применения микроорганизмов *Debaryomyces hansenii* как основы рецепторного элемента биосенсора для определения БПК коммунальных и биотехнологических сточных вод.

Ключевые слова: БПК-сенсоры, *Candida maltosa*, *Candida blankii*, *Debaryomyces hansenii*.

Введение

Важнейшей интегральной характеристикой качества воды является биохимическое потребление кислорода (БПК) — количество растворенного кислорода (мг), необходимое для окисления всех биоразлагаемых органических соединений, находящихся в 1 дм³ воды [1]. Оценка БПК — это эмпирический тест, в котором используют стандартизованную лабораторную процедуру, чтобы определить потребление кислорода в анализируемых пробах воды. Авторы исследовали этот вопрос и опубликовали свои данные в одном из предыдущих номеров настоящего журнала [2].

Традиционная методика определения БПК требует инкубирования насыщенной кислородом пробы в течение минимум 5 сут. [3]. В силу значительной продолжительности процедуры метод не является адекватным в современных условиях жизни, поскольку представляет результаты анализа со значительной задержкой. По указанной причине возникают экологически опасные ситуации, при которых остается незамеченной поступление

на водоочистные сооружения аварийно загрязненных вод или, наоборот, недоочистка их в процессе регенерации.

Альтернативой являются экспрессные методы определения БПК с использованием биосенсорных анализаторов, основанные на применении микроорганизмов, способных метаболизировать широкий спектр органических соединений [4]. В настоящее время промышленно выпускаются биосенсорные анализаторы, позволяющие в течение нескольких минут производить определение БПК в диапазоне 2–500 мг/дм³ [5–7].

Для создания биораспознающих элементов БПК сенсоров используют либо чистые культуры с определенными функциональными свойствами (широкий спектр окисляемых субстратов, устойчивость к воздействию негативных факторов окружающей среды или специфичность в отношении определенных стоков), либо смесь идентифицированных микроорганизмов (искусственные ассоциации), либо активный ил. Каждый из этих подходов имеет свои преимущества и недостатки. Дрожжи являются более предпочтительным биоматериалом для биосенсоров почти всех типов, поскольку они окисляют широкий спектр веществ, устойчивы к негативным факторам окружающей среды и могут функционировать в распознающем элементе биосенсора длительное время. Так, в работе [8] описан сенсор на основе дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, инкапсулированных в альгинат кальция. Сенсор имел удовлетворительную стабильность и был использован для анализа образцов сточных вод. Показано хорошее соответствие между значениями БПК, определенными с ис-

© 2010 г. Понаморева О.Н., Арляпов В.А., Каманин С.С.,
Юдина Н.Ю., Решетиллов А.Н.

* Автор для переписки:

Решетиллов Анатолий Николаевич

д.х.н., проф., зав. лабораторией биосенсоров

Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН

142290 Московская обл., Пушкино, пр-т Науки, 5

E-mail: anatol@ibpm.pushchino.ru

пользованием биосенсора и стандартным БПК₅. В работе [9] БПК-сенсор на основе дрожжей *Arxula adeninovorans*, иммобилизованных в полимер на основе полиуретана — поликарбомоилсульфонат, был использован для определения БПК в коммунальных и промышленных сточных водах из различных источников, в том числе в стоках с высоким содержанием солей. Применение различных дрожжевых штаммов для разработки БПК-сенсоров не ограничивается приведенными примерами [10–12].

Развитие биосенсорных методов анализа предъявляет новые требования к качеству БПК-сенсоров и точности измерений, которые, прежде всего, зависят от свойств биораспознающих элементов. Перспективным направлением для исследований является изучение возможности применения биораспознающих элементов, которые позволят улучшить качество производимых измерений.

В настоящей работе были использованы дрожжевые штаммы *Candida maltosa* ВКМ У-2359, *Candida blankii* ВКМ У-2675 и *Debaryomyces hansenii* ВКМ У-2482. Согласно данным литературы, дрожжи *Candida maltosa*, *Candida blankii* и *Debaryomyces hansenii* обладают широкой субстратной специфичностью и способны окислять многие спирты, углеводы, аминокислоты и другие органические вещества. Штамм *Candida maltosa* ВКМ У-2359 обладает устойчивостью к тяжелым металлам, в частности, к присутствию хроматов, и используется для биологической очистки нефтепродуктов от загрязнителей [13, 14]. Известно, что дрожжи *Debaryomyces hansenii* устойчивы к высоким концентрациям солей [15]. Указанные особенности позволяют предположить, что эти микроорганизмы могут быть эффективно использованы для разработки БПК-сенсоров, обладающих высокой точностью и устойчивостью к воздействию негативных факторов окружающей среды. Тем не менее в литературе не рассматривались параметры биосенсоров при совместном применении штаммов.

В данной работе рассмотрены параметры биосенсоров на основе каждого из штаммов, что позволяет провести сравнительную оценку. Применили адсорбцию как метод иммобилизации, который в высокой степени сохраняет нативность метаболических характеристик штаммов. Рассмотрена активность штаммов в зависимости от фазы роста.

В качестве калибровочного стандарта использована глюкозо-глутаматная смесь. Впервые показана принципиальная возможность применения микроорганизмов *Debaryomyces hansenii* как основы рецепторного элемента биосенсора для определения БПК коммунальных и биотехнологических сточных вод.

Материалы и методы

Биосенсорные измерения. В работе использовали многоканальный биосенсорный анализатор проточно-инжекционного типа «Мультибио-01», управляемый с помощью персонального компьютера. Для регистрации и обработки сигналов сенсоров использовали специализированное программное обеспечение Violan-1011 (Кронас, Россия). Датчиками являлись кислородные электроды Кларка с иммобилизованными клетками микроорганизмов. Средняя величина тока, соответствующая содержанию кислорода в дистиллированной воде 9,2 мг/дм³, составляла 30 нА при шуме ±0,25 нА.

Все измерения проводили в проточном режиме при скорости потока 0,5 см³/мин., объем отбираемой пробы 300 мкл. Первичная обработка данных включала в себя сглаживание и последующее дифференцирование кривой I(t). Ответ сенсора вычислялся как максимальная скорость изменения силы тока от времени.

Для измерений использовали натрий-калиевый фосфатный буфер (рН 6,8), концентрация солей составляла 20 мМ. Пробы вводили автоматическими микропипетками переменного объема (200–1000 мкл, 20–200 мкл, 0,5–10 мкл) (Biotech, США). Для калибровки использовали модельную смесь глюкозы и глутаминовой кислоты (ГГС), которую применяют как стандарт в определении БПК₅ [3]. В соответствии с определением принимали, что БПК₅, равное 205 мг/дм³, соответствует раствору, содержащему 150 мг/дм³ глюкозы и 150 мг/дм³ глутаминовой кислоты.

Культивирование клеток микроорганизмов. Клетки штаммов *Candida maltosa* ВКМ У-2359, *Candida blankii* ВКМ У-2675 и *Debaryomyces hansenii* ВКМ У-2482 были получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН (Пушино).

Дрожжевые микроорганизмы выращивали на богатой минеральной среде (жидкая глюкозо-пептонная питательная среда). Состав жидкой среды: глюкоза — 10 г/дм³, пептон — 5 г/дм³, дрожжевой экстракт — 0,5 г/дм³ (Sigma, США), дистиллированная вода — 200 см³. Среду для выращивания клеток стерилизовали автоклавированием при давлении в 1 атмосферу в течение 45 мин. Клетки выращивали аэробно 18–20 часов в качалочных колбах объемом 750 см³ при температуре 29 °С. Затем полученную биомассу центрифугировали при комнатной температуре при 8000 об/мин. 10 минут. Далее центрифугат промывали 20 мМ фосфатным буфером рН 6,8. Осевшие клетки рассуспандировали

в свежей порции буфера, распределяли по порциям и осаждали на центрифуге «Eppendorf» 3 минуты при 8000 об/мин. Промытую биомассу взвешивали и хранили в микропробирках при +4 °С.

Формирование рецепторного элемента. Выращенные клетки микроорганизмов промывали фосфатным буферным раствором (20 мМ, рН 6,8), центрифугировали (2000 об/мин., 10 мин.), осадок сырой массы клеток взвешивали и разбавляли определенным количеством раствора буфера до концентрации 150 мг/см³. Полученную смесь наносили на стекловолоконный фильтр Whatman GF/A (Sigma, США) в количестве 3 мкл. Элемент (3×3 мм) подсушивали на воздухе в течение 15 мин. при 20 °С. Подготовленный биорецепторный элемент помещали на поверхность кислородного электрода типа Кларка и фиксировали с помощью нейлоновой сетки.

Определение численности жизнеспособных клеток микроорганизмов. Для определения числа колониобразующих единиц (КОЕ) — концентраций живых клеток — в суспензии применяют метод стандартных серийных разведений. В пробирки наливали по 4,5 мл стерильного физиологического раствора. Затем производили первое разведение: 0,5 мл исходной суспензии клеток (нулевое разведение) переносили в первую пробирку и перемешивали на микробиологическом миксере (Heidolph, Германия).

Второе разведение: 0,5 мл раствора из первой пробирки помещали во вторую. Затем проводили третье разведение и т.д. Далее суспензию из пробирки с нужным разведением высевали на чашки Петри с богатой питательной средой (LB-агар). Для этого брали по 0,1 мл суспензии, наносили на чашку и растирали изогнутой стеклянной палочкой (шпатель Дригальского), равномерно распределяя жидкость по поверхности агара. Непосредственно перед употреблением шпатель окунали в 96% этанол и проводили его через пламя бунзеновской горелки, после чего охлаждали о крышку чашки Петри.

Чашки помещали в термальную комнату с оптимальной для роста микроорганизмов температурой (24 °С) на 24–48 ч, после чего производили подсчет числа выросших колоний и вычисляли концентрацию микробных клеток в исходной суспензии.

Определение БПК₅ стандартным методом разбавления. В качестве референтного метода для определения БПК₅ был использован метод разбавления. Анализ проводили строго в соответствии с методикой, указанной в ПНД Ф 14. 1:2:3:4. 123-97 [3]. Определение содержания растворенного кислорода в исследуемых пробах

производилось йодометрическим методом Винклера в соответствии со стандартной методикой.

Результаты и обсуждение

Зависимость окислительной активности используемых дрожжевых микроорганизмов от времени роста. Для разработки биосенсоров, способных давать надежные и воспроизводимые результаты при низких значениях БПК, необходимо использовать микроорганизмы с высокой окислительной активностью. Окислительная активность микроорганизмов может меняться в зависимости от времени роста, поэтому для получения микроорганизмов с высокой окислительной активностью представляло интерес изучение кривых роста исследуемых дрожжей.

Графическая зависимость числа КОЕ от времени культивирования имеет сигмоидальную форму и является типичной кривой роста дрожжевых штаммов [16]. На кривых роста дрожжевых штаммов можно выделить несколько фаз роста (табл. 1).

Таблица 1

Фазы роста микроорганизмов *Candida maltosa*, *Candida blankii* и *Debaryomyces hansenii*

Фаза роста	<i>Candida maltosa</i>	<i>Candida blankii</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>
Лаг-фаза, ч	0–8	0–14	0–18
Фаза экспоненциального роста, ч	8–11	14–18	18–23
Фаза линейного роста, ч	11–15	18–30	23–27
Фаза замедленного роста, ч	15–20	30–38	27–30
Стационарная фаза, ч	20–30	38–42	30–40
Максимальная окислительная активность, ч	14	18	24

Проводя сравнительный анализ кривых роста трех дрожжевых штаммов, можно отметить, что дрожжи *Debaryomyces hansenii* и *Candida blankii* имеют более длительную лаг-фазу и фазу экспоненциального роста, что приводит к более позднему выходу на стационарную фазу по сравнению с *Candida maltosa*.

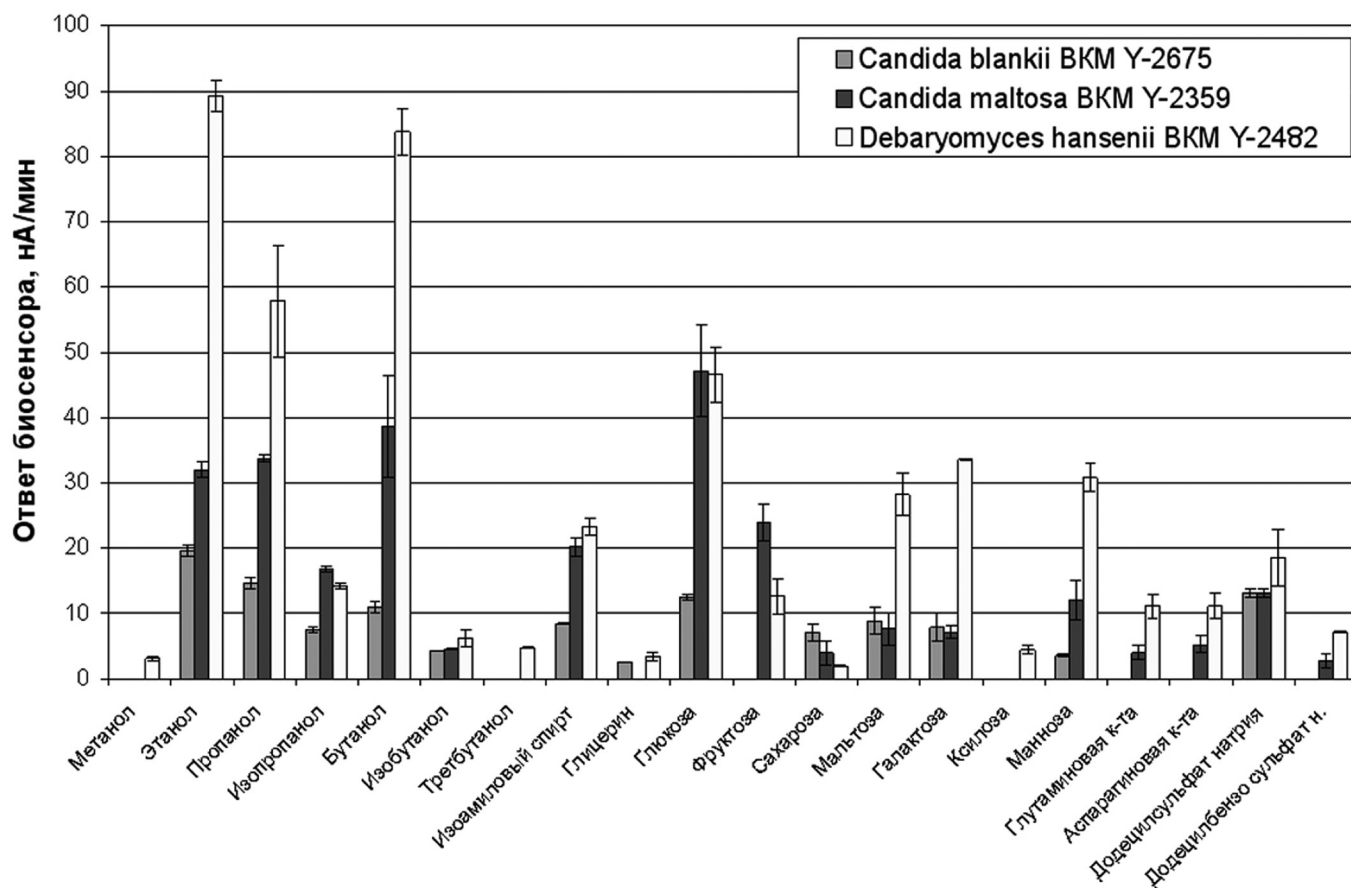


Рис. 1. Субстратная специфичность рецепторных элементов на основе исследуемых штаммов (концентрация субстратов 0,09 моль/дм³)

Окислительную активность дрожжевых штаммов изучали электрохимическим методом количественного определения интенсивности процессов окисления субстратов, основанным на регистрации содержания кислорода в жидкой среде с помощью электрода Кларка. При использовании кислородного электрода принцип измерений основан на регистрации тока, полученного при восстановлении молекулярного кислорода. Сила тока пропорциональна концентрации кислорода в исследуемом образце. Изменение концентрации кислорода, регистрируемое при помощи такого электрода, позволяет судить о дыхательной активности иммобилизованных на поверхности электрода микроорганизмов.

Для определения зависимости окислительной активности дрожжевых штаммов от времени роста из ростовой среды через равные интервалы времени отбирали суспензию клеток, центрифугировали и проводили трехкратное промывание буферным раствором. Промытые клетки иммобилизовали и наносили на электрод. В качестве модельной использовали смесь глюкозы и глутаминовой кислоты.

Все три дрожжевых штамма проявляют наибольшую окислительную активность в конце экспоненциальной фазы роста или в начале линейной фазы. Для дальнейшей работы микроорганизмы выращивали с максимальной окислительной активностью в течение времени, приведенного в таблице 1.

Определение характеристик БПК-биосенсоров на основе используемых дрожжевых микроорганизмов. Важной характеристикой анализа является его селективность, то есть возможность определения каждого компонента анализируемого объекта независимо от других. В случае биосенсорного анализа селективность определяется субстратной специфичностью биоматериала, используемого для формирования рецепторного элемента сенсора. При определении БПК в качестве рецепторного элемента предпочтительно использовать целые клетки микроорганизмов, обладающих широкой субстратной специфичностью (низкой селективностью). Широкая субстратная специфичность при этом является преимуществом, так как приводит к повышению правильности результатов анализа. Оценка субстрат-

ной специфичности рецепторных элементов на основе микроорганизмов *Candida maltosa*, *Candida blankii* и *Debaryomyces hansenii* была проведена по двадцати различным субстратам. В качестве субстратов были выбраны легкоокисляемые органические вещества, попадание которых в водоемы приводит к существенному снижению уровня растворенного кислорода и дальнейшей эвтрофикации [1]. Для оценки субстратной специфичности регистрировали отклик биосенсора при введении в измерительную кювету одинакового количества субстратов. На рисунке 1 приведены данные по субстратной специфичности рецепторных элементов на основе адсорбированных *Candida maltosa*, *Candida blankii* и *Debaryomyces hansenii* на анализируемые субстраты.

Сенсор на основе микроорганизмов *Debaryomyces hansenii* обладает наиболее широкой субстратной специфичностью и способен окислять все исследуемые вещества. Ценным с практической точки зрения является факт наличия ответов на додецилсульфат натрия (ДСН) и додецилбензосульфат натрия (ДБСН) (компоненты моющих средств), а также отсутствие токсического действия данных субстратов на микроорганизмы в составе биорецептора при кратковременном контакте.

Полученные результаты позволяют предположить, что при определении БПК реальных образцов можно получить высокую степень корреляции между показаниями биосенсоров и стандартным методом, поскольку все три штамма микроорганизмов способны окислять широкий спектр органических веществ.

Градуировочная зависимость ответа от концентрации определяемого вещества является важнейшей метрологической характеристикой сенсора.

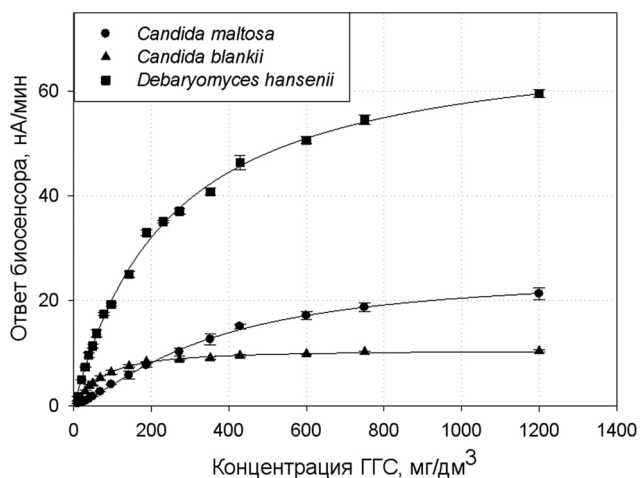


Рис. 2. Зависимости ответов от концентрации ГГС для биосенсоров на основе разработанных рецепторных элементов

Для биосенсоров на основе каждого рецепторного элемента были получены градуировочные зависимости отклика биосенсора от концентрации ГГС в измерительной кювете (рис. 2).

Биорецепторы на основе целых клеток микроорганизмов являются биорецепторами каталитического типа, то есть биологический ответ в таких системах обеспечивается ферментативными реакциями микроорганизмов. Поэтому зависимости, приведенные на рисунке 2, хорошо аппроксимирует уравнение типа Михаэлиса—Ментен:

$$R = \frac{R_{\max} [S]}{K_M + [S]},$$

где R_{\max} — максимальная скорость потребления кислорода иммобилизованными микроорганизмами, достигаемая при $[S] \rightarrow \infty$, K_M — эффективная константа Михаэлиса, то есть концентрация субстрата, при которой $R = R_{\max} / 2$.

Для снижения ошибок анализа, как правило, ограничиваются использованием линейного участка градуировочной зависимости. Верхняя граница линейного участка ограничена константой K_M , так как при концентрации субстрата много большей K_M отклик не зависит от концентрации субстрата.

Зависимость БПК₅ от ответа биосенсоров (R) для линейного участка градуировочных зависимостей для биосенсора на основе микроорганизмов *Candida maltosa* имеет вид: БПК₅ = 21,7R - 13,1; для биосенсора на основе микроорганизмов *Candida blankii*: БПК₅ = 9,4R - 3,7; для биосенсора на основе микроорганизмов *Debaryomyces hansenii*: БПК₅ = 4,8R - 18,1.

Для определения аналитических и метрологических характеристик БПК-биосенсоров на основе разработанных рецепторных элементов в качестве модельной использовали глюкозо-глутаматную смесь. Полученные данные приведены в таблице 2.

Биосенсоры с разработанными рецепторными элементами характеризуются близким уровнем операционной стабильности и параметров экспрессности. Следует отметить, что для биосенсора на основе *Candida blankii* снижение ответов в течение 8 сут. составило 50%. Это говорит о невысокой долговременной устойчивости рецепторных элементов на основе этой культуры. Лучшей долговременной стабильностью обладают рецепторные элементы на основе дрожжей *D. hansenii* и *C. maltosa*. Наибольшей чувствительностью и соответственно минимальным значением нижней границы линейного диапазона обладает биосенсор на основе дрожжей *D. hansenii*. Таким образом, по своим характеристикам биосенсор на

Характеристики БПК-биосенсоров на основе различных микроорганизмов

Основа рецепторного элемента	Относительное стандартное отклонение, %	Долговременная стабильность, сутки	Чувствительность нА·дм ³ /мин·мг	Длительность одиночного измерения, мин.	Линейный диапазон зависимости ответа биосенсора от БПК ₃ , мг/дм ³
<i>Candida maltosa</i>	3	>30	0,05	8–20	9,3–422
<i>Candida blankii</i>	5	8	0,11	10–22	3,0–56
<i>Debaryomyces hansenii</i>	4	>30	0,21	10–17	2,2–177

основе микроорганизмов *Debaryomyces hansenii* является лучшим среди исследуемых.

Важно отметить, что биосенсор на основе микроорганизмов *Debaryomyces hansenii* по своим характеристикам не уступает аналогам [17].

Влияние условий внешней среды на работу БПК-биосенсоров. pH среды является одним из факторов, влияющих на активность клеточных ферментов и соответственно на чувствительность биорецептора к различным субстратам. Ответы биосенсоров на стандартный раствор ГТС были получены в диапазоне pH от 5,4 до 7,8 (рис. 3).

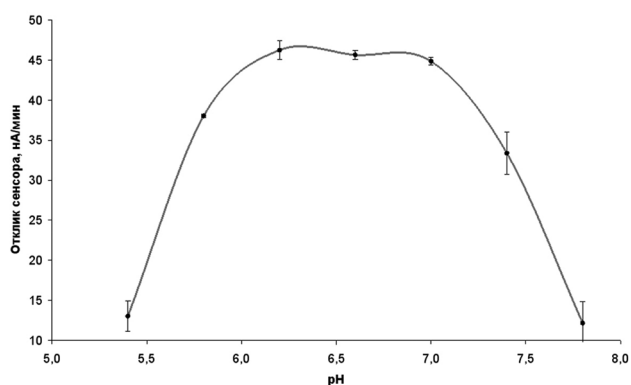


Рис. 3. Зависимость ответов биосенсоров на основе микроорганизмов *D. hansenii* от pH

Максимальный ответ биосенсора на основе дрожжей *S. maltosa* наблюдается при pH 6,5, *S. blankii* при pH 6,8, а для *D. hansenii*, оптимум pH составляет 7,0. Кроме того, из полученных данных видно, что микроорганизмы *D. hansenii* могут работать в более широком диапазоне pH, чем исследуемые дрожжи рода *Candida*.

Еще одним фактором, влияющим на чувствительность биорецептора, является ионная сила, которая, прежде всего, влияет на давление внутри клетки. Для создания градиента ионной силы в растворе использовали фосфатную буферную систему с pH 6,8 и диапазоном концентраций 16,5–132 мМ.

На рисунке 4 представлена зависимость окислительной способности микроорганизмов *D. hansenii* от ионной силы раствора. Зависимость для двух других штаммов имела аналогичный вид. Полученные данные показывают, что зависимость окислительной активности клеток от ионной силы раствора носит практически линейный характер. Кроме того, дрожжи *D. hansenii* и *S. blankii* лучше сопротивляются возрастающей ионной силе раствора, что может быть объяснено более эффективной системой регуляции внутриклеточного осмотического давления, чем у *S. maltosa*.

Основным фактором, который может снижать отклик биосенсора и даже приводить к гибели биорецептора, является наличие ионов тяжелых металлов во многих сточных водах. Ионы тяжелых металлов обладают как бактериостатическим, так и бактерицидным действием. Механизмы их взаимодействия с ферментами различны: замещение физиологически важных катионов и неметаллсодержащих оксианионов в активных центрах ферментов, связывание функциональных сульфидгидрильных групп и др.

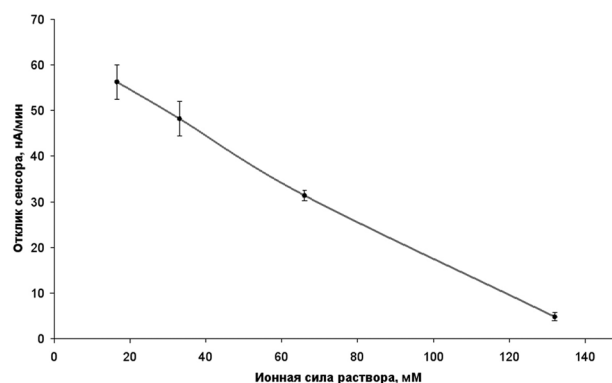


Рис. 4. Зависимость окислительной способности клеток штамма *D. hansenii* от ионной силы раствора

Для изучения ингибирующего действия соединений тяжелых металлов была исследована зависимость окислительной способности клеток штаммов *Candida*

**Результаты измерения БПК₅, полученные с использованием биосенсоров
на основе дрожжевых штаммов и стандартным методом**

Пробы		Полученные значения БПК, мг/дм ³			
		Биосенсор на основе <i>Candida maltosa</i>	Биосенсор на основе <i>Debaryomyces hansenii</i>	Биосенсор на основе <i>Candida blankii</i>	Стандартный метод разбавления
Очистные сооружения г. Пушкино	1	860±10	1610±50	1040±30	1500±200
	2	700±10	1280±30	800±20	1200±200
	3	570±10	1180±20	550±10	1100±100
	4	220±50	460±20	240±10	440±60
Глюкозо-паточный комбинат	1	1010±70	840±80	860±70	900±100
	2	1100±100	940±70	910±80	1000±100
	3	840±60	770±50	730±40	800±100

maltosa, *Candida blankii* и *Debaryomyces hansenii* от присутствия в растворе Zn, Ni и Cr(VI) в диапазоне концентраций 0–6·10⁻⁴ моль/дм³ (для сточных вод ПДК Zn²⁺ 1,5·10⁻⁴ мг/л, Ni²⁺ составляет 3,4·10⁻⁷ моль/дм³, для Cr(VI) ПДК = 2·10⁻⁷ моль/дм³).

Показано, что рецепторный элемент на основе *Candida blankii* подвергается негативному воздействию ионов Ni²⁺ и Cr(VI), так как наблюдается снижение его окислительной активности. Однако присутствие тяжелых металлов в растворе в диапазоне концентраций, выбранном для анализа, не оказывает значительного влияния на микроорганизмы *Candida maltosa* и *Debaryomyces hansenii* (рис. 4), что может быть объяснено устойчивостью исследуемых дрожжей к данным соединениям, а также малым временем контакта пробы с биорецепторным элементом, благодаря использованию проточно-инжекционного режима измерения.

Анализ образцов сточных вод. Для определения величины БПК₅ были использованы образцы сточных вод с очистных сооружений города Пушкино и сточные воды пищевого комбината. Отбор проб производился в соответствии со стандартной методикой [18]. Измерения биосенсорами на основе микроорганизмов *Candida maltosa* и *Candida blankii* характеризуются высокой ошибкой при анализе сточных вод очистных сооружений (табл. 3). Вероятнее всего это связано с наличием в пробах веществ, которые не окисляются этими микроорганизмами. Значения БПК, определенные с использованием биосенсора на основе дрожжевой культуры *Debaryomyces hansenii*, во всех случаях совпадают со значениями БПК, определенными стандартным методом ($r^2 = 0,98$).

Таким образом, биосенсор на основе микроорганизмов *D. hansenii* может быть эффективно использован для анализа БПК сточных вод, в том числе в присутствии соединений Zn, Ni и Cr(VI) и при высокой ионной силе раствора.

Заключение

Описана динамика роста дрожжевых штаммов *Candida maltosa* ВКМ У-2359, *Candida blankii* ВКМ У-2675 и *Debaryomyces hansenii* ВКМ У-2482 в жидкой глюкозо-пептонной среде. Показано, что все три дрожжевых штамма проявляют наибольшую окислительную активность по отношению к ГГС в конце экспоненциальной или в начале линейной фазы роста.

Разработаны лабораторные модели биосенсоров для экспресс-определения БПК₅ на основе рецепторных элементов, полученных с использованием дрожжевых клеток *Candida maltosa*, *Candida blankii* и *Debaryomyces hansenii*. Обнаружено, что биосенсор на основе микроорганизмов *Debaryomyces hansenii* является лучшим среди исследуемых и по своим характеристикам не уступает зарубежным аналогам.

Изучено влияние рН, ионной силы и содержания тяжелых металлов на исследуемые дрожжевые штаммы. Выявлено, что присутствие в среде ионов Zn²⁺, Ni²⁺ и Cr(VI) в диапазоне концентраций 0–6·10⁻⁴ моль/дм³ не оказывает существенного влияния на окислительную способность ни одного из исследуемых штаммов в ходе измерения.

Впервые показана принципиальная возможность применения микроорганизмов *Debaryomyces hansenii* как

основы рецепторного элемента биосенсора для определения БПК коммунальных и биотехнологических сточных вод. Действующий макет биосенсорного анализатора на основе данной культуры микроорганизмов может служить прототипом опытного образца прибора для серийного освоения и применения.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (2009–2013 гг.), госконтракт № 02.740.11.0296 и № П551.

Литература

- Хенце М., Армоэс П., Ля-Кур-Янсен Й., Арван Э. Очистка сточных вод / Пер. с англ. — М.: Мир, 2004. — 480 с.
- Понаморева О.Н., Арлямов В.А., Алферов В.А., Решетилов А.Н. Теория и применение микробных биосенсоров для оперативного мониторинга биохимического потребления кислорода // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2009. — Т. 5. — № 1. — С. 42–48.
- ПНДФ 14.1:2:3:4.123-97. Количественный химический анализ вод. Методика выполнения измерений биохимической потребности в кислороде после *n*-дней инкубации (БПКполн) в поверхностных пресных, подземных (грунтовых), питьевых, сточных и очищенных сточных водах. — М., 1997. — 25 с.
- D'Souza S.F. Microbial biosensors // Biosens. Bioelectron. — 2001. — Vol. 16. — P. 337–353.
- Rodriguez-Mozaz S., de Alda M.J.L., Barcelo D. // Anal. Bioanal. Chem. — 2006. — Vol. 386. — N 4. — P. 1025–1041.
- Bourgeois W., Burgess J.E., Stuetz R.M. // J. of Chemical Technology and Biotechnology. — 2001. — Vol. 76. — P. 337–348.
- Baeumner A.J. // Anal. Bioanal. Chem. — 2003. — Vol. 377. — P. 434–445.
- Seo K.S., Choo K.H., Chang H.N., Park J.K. // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2009. — Vol. 83. — N 2. — P. 217–223.
- Lehmann M., Chan C., Lo A., Lung M., Tag K., Kunze G., Riedel K., Gruendig B., Renneberg R. // Biosens. Bioelectron. — 1999. — Vol. 14. — P. 295–302.
- Trosok S.P., Driscoll B.T., Luong J.H.T. // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2001. — N 56. — P. 550–554.
- Nakamura H, Suzuki K, Ishikuro H, Kinoshita S, Koizumi R, Okuma S, Gotoh M, Karube I. // Talanta. — 2007. — Vol. 15. — N 72(1). — P. 210–216.
- Jianbo J., Tang M., Chen X., Qi L., Dong S. // Biosens. Bioelectron. — 2003. — Vol. 18(8). — P. 1023–1029.
- Candida maltosa used for the bio-degradation of petroleum product pollutants // United States Patent 6444204.
- Chrzanowski L., Kaczorek E., Olszanowski A. // Polish J. of Environmental Studies. — 2006. — Vol. 15. — N 1. — P. 47–51.
- Pereira M.S. / In: A Portrait of State-of-the-Art Research at the Technical University of Lisbon Part VII. — Springer: Dordrecht, Netherlands, 2007. — P. 457–464.
- Walmsley R M, Keenan P. // Biotechnology and Bioprocess Engineering. — 2000. — Vol. 5. — N 6. — P. 387–394.
- Liu J., Mattiasson B. // Water Research. — 2002. — Vol. 36. — P. 3786–3802.
- ГОСТ Р 51592 — 2000. Вода, общие требования к отбору проб. — М.: ИПК Издательство стандартов, 2000. — 30 с.

BIOSENSOR FOR RAPID ANALYSIS OF BIOCHEMICAL OXYGEN DEMAND ON THE BASIS OF YEAST MICROORGANISMS GENERA CANDIDA AND DEBARYOMYCES

O.N. PONAMOREVA¹, V.A. ARLYAPOV¹, S.S. KAMANIN¹, N.Y. YUDINA¹, A.N. RESHETILOV²

¹Tula State University;

²G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, RAS, Pushchino, Moscow region

The parameters of biosensors based on the yeast strains *Candida maltosa* VKM Y-2359, *Candida blankii* VKM Y-2675, and *Debaryomyces hansenii* VKM Y-2482 for BOD detection are compared. The catalytic activity of strains has been analyzed depending on the growth phase. The possibility of using *Debaryomyces hansenii* as a basis for receptor element of the biosensor for BOD detection in municipal and biotechnological wastewaters has been shown.

Keywords: BOD-sensors, *Candida maltosa*, *Candida blankii*, *Debaryomyces hansenii*.

СОСТАВ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ УЛЬТРАФИЛЬТРАТА КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ЛАКТОБАКТЕРИЙ

Е.И. МОЛОХОВА¹, Ю.В. СОРОКИНА^{1*}, В.А. НЕСЧИСЛЯЕВ²

¹ ГОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия
Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»,
² Филиал ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ «Пермское НПО «Биомед», Пермь

Проведено изучение состава и физико-химических характеристик исходного и концентрированного ультрафильтратов культуральной жидкости лактобактерий. Установлено их бактериотропное действие в отношении пробиотических и условно-патогенных микроорганизмов.

Ключевые слова: ультрафильтрация, метаболитный пробиотик, ультрафильтрат, лактобактерии.

Введение

В Пермском НПО «Биомед» разработан метаболитный препарат «Микростим», способ получения которого включает в себя выделение ультрафильтрацией из культуральной жидкости штамма *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 биологически активной фракции с последующей ее термообработкой. В ходе исследований был выявлен широкий спектр бактериотропного действия ультрафильтрата, а также его иммуномодулирующая активность, что позволяет рекомендовать «Микростим» в качестве пробиотического средства для коррекции дисбактериозов, лечения кишечных инфекций, а также гнойно-септических осложнений в акушерско-гинекологической практике [3, 4]. Предваряя разработку лекарственных форм пробиотика, представляется актуальным сравнительное изучение исходного и концентрированного ультрафильтрата культуральной жидкости лактобактерий (УКЖЛ).

Материалы и методы

В работе применяли УКЖЛ (5 серий), полученный из бактериальной взвеси лактобактерий ультрафильтра-

цией на установке УПЛ-0,6 (Россия) с использованием половолоконных (ВПУ-15) разделительных аппаратов. Для получения концентрата исходный ультрафильтрат сгущали в 10 раз на вакуум-выпарной установке с последующей стерилизацией в автоклаве при температуре 110 °С в течение 30 мин. В ходе концентрирования подобраны необходимые параметры процесса для получения оптимального по технологическим свойствам продукта. По окончании процесса получали вязкую жидкость с характерными органолептическими свойствами.

Определение плотности нативного и концентрированного УКЖЛ проводили по ГФ XI, вып. 1 с использованием ареометра. Кислотность изучали титриметрическим методом согласно ФСП 42-05047298054 «Лактобактерин сухой». Спектры поглощения изучали на спектрофотометре СФ-2000 (Россия) в диапазоне длин волн 240–350 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Количественное определение низкомолекулярных пептидов в нативном и концентрированном УКЖЛ проводили по методу Лоури и с использованием биуретового реактива; содержание общего азота определяли с реактивом Несслера (ФС 42-3874-99). Органические кислоты определяли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) в хроматографических системах: этилацетат — муравьиная кислота — вода (3:1:1); н-бутанол — муравьиная кислота — вода (30:5:10); н-пропанол — концентрированный раствор аммиака (6:4), потенциометрическим титрованием и с помощью высокоэффективного капиллярного электрофореза в системе Agilent; аминокислотный состав — методом бумажной хроматографии в системе н-бутанол — уксусная кислота — вода (4:1:2) и на аминокислотном анализаторе Биотроник IC-2000 (Германия).

© 2010 г. Молохова Е.И., Сорокина Ю.В., Несчисляев В.А.

* **Автор для переписки:**

Сорокина Юлия Васильевна
кандидат фармацевтических наук,
ассистент кафедры промышленной технологии лекарств
с курсом биотехнологии, ГОУ ВПО «Пермская государственная
фармацевтическая академия»
E-mail: sorokinyulia@yandex.ru

Для микробиологических исследований использовали коллекционные штаммы микроорганизмов (*Lactobacillus acidophilus* КЗШ24, *Escherichia coli* М-17, *Candida albicans* АТСС 885-653, *Bacillus cereus* 8035, *Staphylococcus aureus* АТСС 65-38-Р, *Escherichia coli* АТСС 25922, *Pseudomonas aeruginosa* АТСС 9027) и микроорганизмы, выделенные из клинического материала (биотоп: гинекологический тракт). Определение противомикробной активности концентрированного УКЖЛ проводили по микрометоду серийных разведений [1]. Для культивирования микроорганизмов применяли питательные среды: МРС-1; МРС-4; МРС-5; мясо-пептонный агар; мясо-пептонный бульон; 0,5%-ный раствор глюкозы; среда № 199 («Пермское НПО «Биомед»). Определение стимулирующего воздействия метаболитного комплекса на лактобактерии включало в

себя исследование кислотности и динамики роста данной культуры микроорганизмов при внесении концентрированного УКЖЛ в питательный субстрат (0,5%-ный раствор глюкозы) [5].

Результаты и обсуждение

В таблице 1 представлены параметры УКЖЛ, включая физико-химические показатели: рН, плотности и кислотности при концентрировании нативного УКЖЛ. При значительном возрастании кислотности количественные показатели плотности увеличиваются в 1,1–1,2 раза. Во всех случаях сгущения показатели рН остались практически неизменными, что свидетельствует о сохранении в ходе концентрирования буферных свойств нативного УКЖЛ.

Таблица 1

Физико-химические параметры нативного и концентрированного УКЖЛ

Нативный УКЖЛ				Концентрированный УКЖЛ			
№ серии	рН	Плотность, г/мл	Кислотность, °Т	№ серии	рН	Плотность, г/мл	Кислотность, °Т
1	5,65±0,10	1,014±0,005	31,00±1,50	к 1	5,60±0,10	1,147±0,005	600,00±2,50
2	5,50±0,10	1,016±0,003	40,00±0,70	к 2	5,40±0,10	1,156±0,005	760,00±2,50
3	5,40±0,20	1,016±0,005	37,00±1,30	к 3	5,40±0,20	1,156±0,005	630,00±2,30
4	6,72±0,10	1,014±0,002	38,00±1,20	к 4	6,50±0,10	1,147±0,003	600,00±2,40
5	5,43±0,20	1,016±0,005	46,00±0,90	к 5	5,40±0,20	1,147±0,007	680,00±1,50

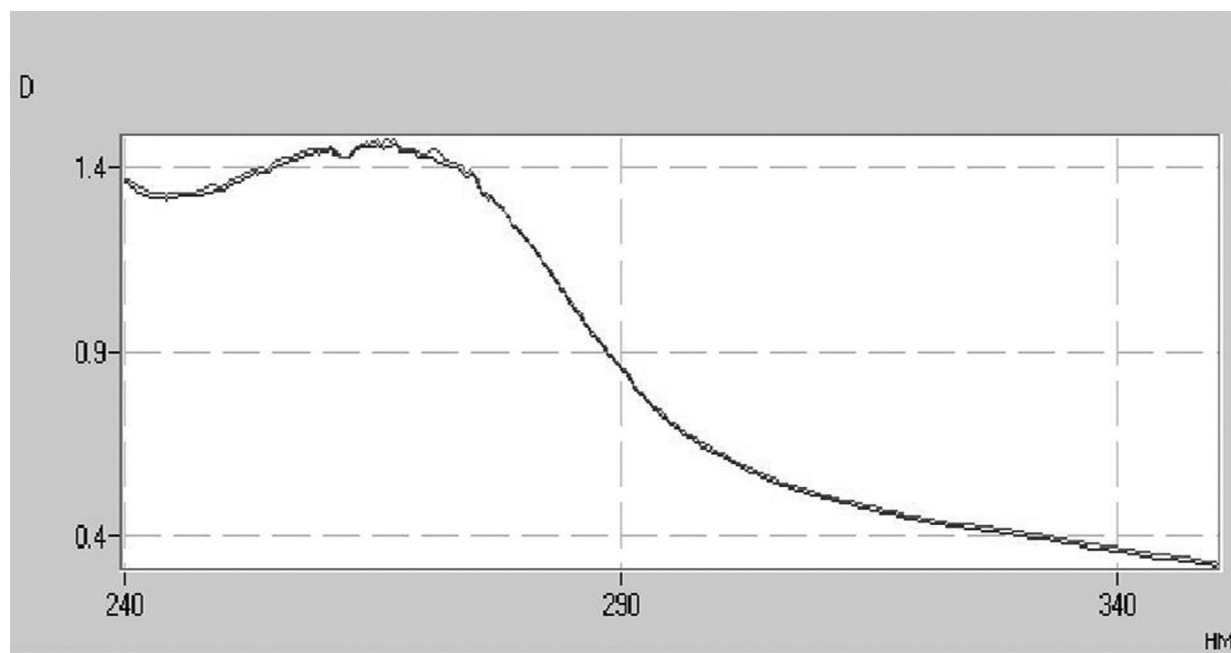


Рис. 1. УФ-спектры нативного и концентрированного УКЖЛ

Исследованием спектральных характеристик в ультрафиолетовой области нативного и концентрированного УКЖЛ установлена их идентичность. Для УФ-спектров характерны максимум поглощения при длине волны 245,7 нм и минимум поглощения — при длине волны 266,1 нм (рис. 1).

При определении азотсодержащих соединений в нативном и концентрированном УКЖЛ показано, что содержание общего азота при концентрировании увеличивается в 11,3 раза, пептидов: по методу Лоури — в 8 раз и по методу с использованием биуретового реактива — в 9,6 раз. Таким образом, процесс сгущения пропорционально повышает количество азотсодержащих соединений в концентрированном УКЖЛ (табл. 2).

Таблица 2

**Сравнительная характеристика
исходного и концентрированного УКЖЛ
по количеству азотсодержащих соединений**

Исследуемый объект	Общий азот, мг/мл	Белок (метод Лоури), мг/мл	Белок (с биуретовым реактивом), мг/мл
Нативный УКЖЛ	8,06±1,50	6,40±1,20	6,59±1,30
Концентрированный УКЖЛ	91,05±1,90	50,97±2,50	63,04±3,10

При идентификации молочной кислоты — основного метаболита лактобактерий — методом ТСХ наиболее подходящей оказалась система этилацетат — муравьиная кислота — вода (3:1:1). По результатам потенциометрического титрования построены дифференциальные и интегральные кривые для определения значений рКа. На полученных кривых не наблюдали пики, характерные для 0,1 М растворов молочной и уксусной кислот. Однако сами кривые титрования для нативного и концентрированного УКЖЛ идентичны, что позволяет использовать их для подтверждения подлинности.

Метод высокоэффективного капиллярного электрофореза дал возможность не только определить в составе УКЖЛ молочную и уксусную кислоты (рис. 2), но и установить, что их количество пропорционально увеличивается при концентрировании УКЖЛ (табл. 3). В исследуемых пробах не обнаружены пропионовая, масляная и янтарная кислоты.

В ходе исследования аминокислотного состава нативного и концентрированного УКЖЛ методом бумажной хроматографии идентифицировано (путем сопоставления значений Rf пятен исследуемого образца и стандартных аминокислот) 10 аминокислот. Схема хроматограммы представлена на рисунке 3.

Для расширения сведений об аминокислотном составе нативного и концентрированного УКЖЛ были проведены исследования на аминокислотном анализаторе. Обнаружено большое число аминокислот: аспара-

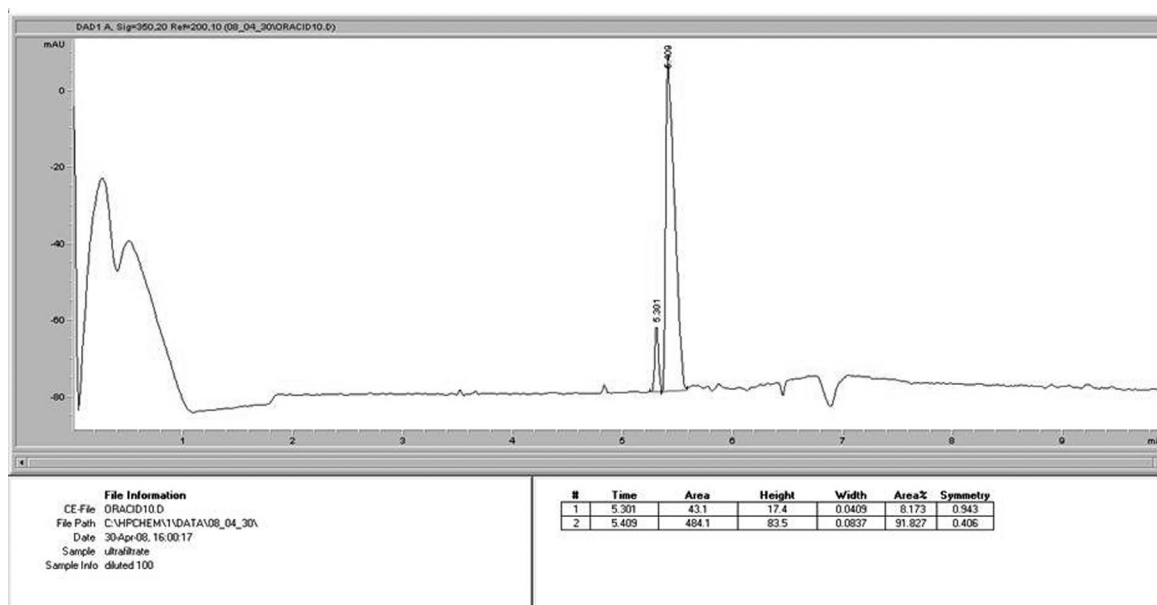


Рис. 2. Электрофореграмма нативного УКЖЛ, разведенного в 100 раз.

- 1 — пик уксусной кислоты
- 2 — пик молочной кислоты

Таблица 3
**Состав и количество органических кислот
 в исследуемых объектах**

Анализируемый образец	Содержание молочной кислоты, мг/мл	Содержание уксусной кислоты, мг/мл	Соотношение кислот
Нативный УКЖЛ	46,89±0,10	2,68±0,10	4,7 : 0,26
Концентрат УКЖЛ	532,82±0,20	22,12±0,20	5,3 : 0,22

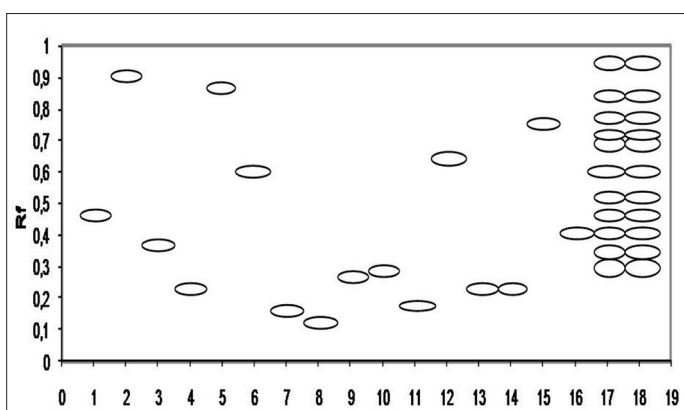


Рис. 3. Аминокислотный состав нативного и концентрированного УКЖЛ.

Примечание: 1 – β-аланин; 2 – лейцин; 3 – цистин; 4 – глицин; 5 – L-изолейцин; 6 – тирозин; 7 – L-аспарагин гидрохлорид; 8 – D,L-орнитин; 9 – D,L-серин; 10 – L-глутаминовая кислота; 11 – D,L-лизин моногидрохлорид; 12 – L-метионин; 13 – L-глутамин; 14 – L-гистидин гидрохлорид; 15 – валин; 16 – пролин; 17 – нативный УКЖЛ; 18 – концентрированный УКЖЛ, разведенный очищенной водой в 10 раз

гиновая, треонин, серин, глутаминовая, пролин, глицин, аланин, валин, метионин, изолейцин, лейцин, тирозин, фенилаланин, лизин, гистидин, аргинин (16 аминокислот) и определено их количество в свободном и связанном состоянии.

В наибольшем количестве в исследуемых образцах содержится глутаминовая кислота: 0,9747 мг/мл – в ультрафильтрате (в свободном и связанном виде) и 10,5018 мг/мл – в концентрате (в свободном и связанном виде).

В наименьшем количестве найден метионин: 0,1278 мг/мл – в ультрафильтрате (в свободном и связанном виде) и 1,0316 мг/мл – в концентрате. Полученные данные наглядно свидетельствуют о наличии широкого

спектра заменимых и незаменимых аминокислот как в ультрафильтрате, так и в его 10-кратном концентрате.

В ходе микробиологических исследований установлено стимулирующее влияние концентрата УКЖЛ на рост и активность кислотообразования *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 и *Lactobacillus acidophilus* КЗШ24 (табл. 4). Проведенными ранее исследованиями было выявлено, что стимулирующее влияние на микроорганизмы оказывает низкомолекулярная фракция, а не компоненты питательной среды [5].

Таблица 4
Стимулирующее влияние концентрированного УКЖЛ на рост и активность кислотообразования различных штаммов лактобактерий

Параметры	Исследуемые штаммы	
	<i>L. plantarum</i> 8P-A3	<i>L. acidophilus</i> КЗШ24
Прирост оптической плотности через 24–48 ч, D540, контроль	0,140±0,010	0,011±0,003
Прирост оптической плотности через 24–48 ч, D540 (добавление в питательную среду концентрата УКЖЛ)	0,370±0,01***	0,079±0,012***
Прирост общей кислотности через 24–48 ч, °Т, контроль	26,11±2,12	2,25±0,75
Прирост общей кислотности через 24–48 ч, °Т (добавление в питательную среду концентрата УКЖЛ)	34,22±0,59**	17,63±1,95***
Коэффициент стимуляции роста	2,57	7,00
Коэффициент стимуляции кислотообразования	1,31	7,83

Примечание: ** – p<0,01; *** – p<0,001 по t-критерию Стьюдента в сравнении с контролем

Для концентрированного УКЖЛ была определена противомикробная активность в отношении музейных и клинических штаммов микроорганизмов. Данные представлены на рисунках 4–5. Показано, что к действию концентрированного УКЖЛ чувствительны как грамположительные, так и грамотрицательные микроорганизмы.

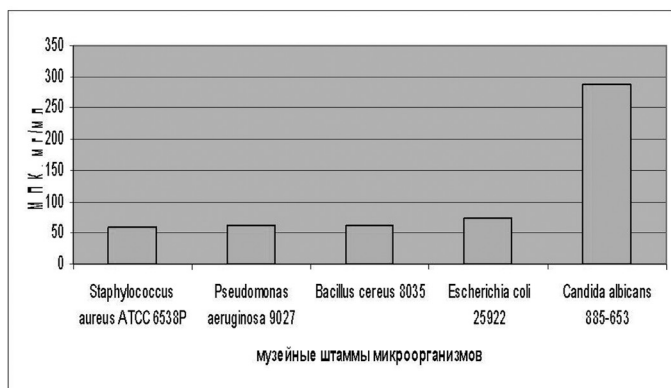


Рис. 4. Противомикробная активность концентрата УКЖЛ в отношении музейных штаммов микроорганизмов

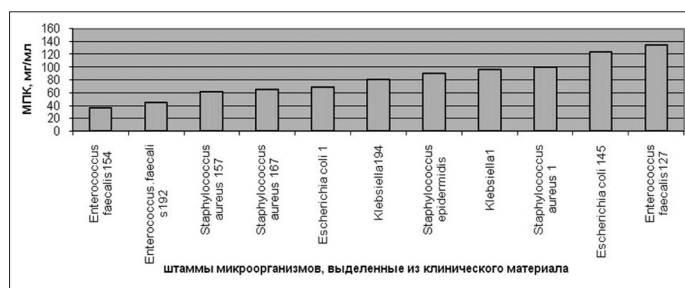


Рис. 5. Противомикробная активность концентрата УКЖЛ в отношении штаммов микроорганизмов, выделенных из клинического материала

Заключение

Полученные данные свидетельствуют о наличии в нативном и концентрированном УКЖЛ комплекса биологически активных веществ — основных метаболитов лактобактерий, обладающих высокой противомикробной активностью.

Литература

1. Аверьянова Н.И., Козлова В.В., Косарева П.В. и др. Исследование антибактериального действия Канефрона Н // Фармация. — 2007. — № 1. — С. 41–44.
2. Молохова Е.И., Сорокина Ю.В., Рюмина Т.Е. Потенциометрическое определение суммы органических кислот в ультрафильтрате культуральной жидкости лактобактерий / Фармация и общественное здоровье: Материалы конференции. — Екатеринбург, 2008. — С. 226–228.
3. Несчислаев В.А., Сафонова Г.М., Чистохина Л.П. Новый пробиотический препарат «Микростим» / Пробиотические организмы — современное состояние вопроса и перспективы использования: материалы междунар. науч.-практ. конф. — М., 2002. — С. 49.
4. Пат. 2224018. Способ получения биологического стимулятора / В.А. Несчислаев, Л.П. Чистохина.; Фед. гос. унит. Предприятие «Науч.-производств. объединение по мед. иммунобиол. препаратам «Микроген». — № 2001131538; заявл. 21.11.01.; опубл. 20.02.04.; приор. 21.11.2001. (Россия). — 10 с.
5. Чистохина Л.П. Иммунобиологическая характеристика препарата «Микростим» на основе метаболитов лактобактерий: дисс. ... канд. мед. наук. — Пермь, 2004. — 171 с.

THE COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF LACTOBACILLUS CULTURE FLUID ULTRAFILTRATE

E.I. MOLOKHOVA¹, Yu.V. SOROKINA¹, V.A. NESCHISLYAEV²

¹ Perm State Pharmaceutical Academy of Federal Agency for Health and Social Development,

² Branch of Federal State Unitary Enterprise «NPO «Microgen» Public Health Ministry RF
«Permskoye NPO «Biomed», Perm

A study of the composition and physico-chemical characteristics of the native and the concentrated ultrafiltrate of culture fluid *Lactobacillus*. Found their bacteriotropic effect on probiotic and conditionally pathogenic microorganisms.

Keywords: ultrafiltration, a metabolic probiotic, ultrafiltrate, *Lactobacillus*.

ВЫДЕЛЕНИЕ ЛИГНИН-РАЗРУШАЮЩЕГО МИКРОБНОГО ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КОНЦЕНТРАТА ПИЩЕВЫХ ВОЛОКОН С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

В.В. МИТЕРЕВА*

Московский государственный университет пищевых производств

В работе ставилась задача разработать метод получения микробного лигнин-разрушающего ферментного препарата, позволяющего проводить обработку древесных отходов с целью получения препарата пищевых волокон с повышенным содержанием целлюлозы. Им оказался ферментный препарат, выделенный из *Streptomyces mersei* по оригинальной методике автора.

Ключевые слова: лигнин, лигнин-разрушающий микробный ферментный препарат, целлюлоза, пищевые волокна.

Практически все натуральные пищевые продукты не являются сбалансированными, так как не содержат незаменимых нутриентов в необходимых количествах и соотношениях. Адекватный рацион питания должен включать в себя достаточно большое количество разнообразных пищевых и биологически активных веществ.

Особенно существенна роль в питании человека пищевых волокон (ПВ). Целлюлоза, гемицеллюлозы, инулин, пектин, гумми, слизи являются неусваиваемыми углеводами, которые человеческим организмом не утилизируются, но они чрезвычайно важны для пищеварения и составляют (вместе с лигнином) ПВ.

ПВ способны стимулировать моторную деятельность кишечника, играют ключевую роль в нормализации состава желудочно-кишечной микрофлоры, препятствуют всасыванию холестерина, оказывают благотворное влияние на липидный обмен, нарушение которого приводит к ожирению, адсорбируют желчные кислоты, способствуют выделению из организма токсичных веществ [1].

Продукты питания, изготовленные с помощью современных технологий, содержат мало ПВ; поэтому возникает необходимость дополнительного введения их в рацион питания. В количестве 5–10% они могут добавляться в хлеб, булочки, печенье, мясные фарше-

вые изделия, овощные консервы, различные пищевые концентраты.

Главным источником ПВ служат зерновые продукты, овощи, фрукты, виноград, орехи. Целлюлоза, гемицеллюлозы и лигнин также составляют основную часть клеточных стенок древесины, трав, стеблей злаков, кустарников.

Выбор методов выделения ПВ зависит от особенностей перерабатываемого растительного сырья, его состава и плотности упаковки биополимеров клеточных стенок. Они основаны на удалении из растительной ткани низкомолекулярных веществ с помощью ряда экстрагентов или обработке ее водными растворами химических веществ, в различных условиях осуществляющих как извлечение, так и частичное разрушение спутников ПВ и межмолекулярных связей.

Наименее деструктурированные ПВ в максимальном количестве выделяют из сырья ферментативными методами [2].

На долю целлюлозы приходится примерно одна треть ПВ. Она практически не переваривается в кишечнике, а ее усвояемость определяется происхождением, содержанием в пищевом рационе и характером предварительной обработки. В организме высших животных и человека не синтезируются ферменты, способные гидролизовать целлюлозу. Разлагают целлюлозу ферменты микроорганизмов. Микрофлора толстой кишки человека ферментирует целлюлозу овощей и фруктов полностью. Более грубая целлюлоза, входящая в структуры ПВ, расщепляется на 0–70%.

В пищеварительном тракте человека целлюлоза стимулирует деятельность кишечника, усиливая его перистальтику, нормализует деятельность кишечной

© 2010 г. Митерева В.В.

* Автор для переписки:

Митерева Виктория Валерьевна

кандидат технических наук,

ассистент кафедры биотехнологии ФТПИМ Московского

государственного университета пищевых производств

125080 Москва, Волоколамское ш., 11

Тел./факс: (499) 158–68–83

E-mail: biotech@mgupp.ru

микрофлоры (что важно для пожилых людей), сорбирует стерину, препятствуя их всасыванию, способствует выделению холестерина.

Гемицеллюлозы (ГМЦ) представляют собой значительную часть ПВ. ГМЦ находят во всех органах и тканях растений. Содержание ГМЦ составляет от 5 до 48% сухой массы растений. Ферментативный гидролиз ГМЦ является важной стадией биоконверсии многих видов растительных отходов в пищевые и кормовые белковые продукты.

Лигнин является существенной частью ПВ и составляет около 20–30% от сухой массы древесины.

Переработка лигноцеллюлозных отходов для получения ценных продуктов неразрывно связана с проблемой деструкции лигнина и требует ее решения, однако в настоящее время нет активных промышленных продуцентов лигнин-разрушающих ферментов [3, 4, 5].

Разложение лигнина — окислительный процесс, в котором участвует ряд окислительных ферментов лигнолитической системы. Комплекс ферментов, участвующих в деструкции лигнина, включает в себя феноксидазы, Mn^{2+} -независимые и Mn^{2+} -зависимые пероксидазы, а также ферменты, генерирующие перекись водорода.

Эффективность разложения лигноцеллюлозных субстратов определяется видовой принадлежностью деструктора, условиями его культивирования и продуцируемым составом ферментов. Поэтому актуальным является обнаружение новых культур микроорганизмов — продуцентов лигнин-разрушающих ферментов, а также оптимизация условий синтеза ферментов, участвующих в деструкции растительных полимеров [6].

Целью настоящего исследования была разработка метода получения микробного лигнин-разрушающего ферментного препарата, позволяющего проводить обработку древесных отходов с целью получения препарата ПВ с повышенным содержанием целлюлозы.

Известно, что лигнин древесины разлагают базидиальные грибы: *Polyporus versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Poria subacida*; аскомицеты: *Penicillium*, *Aspergillus*; несовершенные грибы: *Fusarium*, *Alternaria*; актиномицеты родов *Streptomyces* и *Thermomonospora*; бактерии родов *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*; некоторые дрожжи.

В результате проведенного скрининга микроорганизмов — продуцентов лигнин-разрушающих ферментов — наибольшая активность при биоконверсии растительного субстрата была отмечена у культуры *Streptomyces mersei* в условиях глубинного культивирования на солевой среде с добавками 5–10% растительных отходов. В про-

цессе роста этой культуры произошло изменение состава полимеров растительных отходов: содержание целлюлозы увеличилось на 42,9%, а содержание гемицеллюлозы и лигнина уменьшилось на 21,9 и 53,7%, соответственно.

Ключевой фермент, участвующий в деградации лигнина, — лигниназа. Однако общепринятой методики определения лигниназной активности пока не существует. Поэтому о наличии у культуры *S. mersei* лигнолитического комплекса ферментов можно судить по выявлению лакказной и пероксидазной активностей.

В фильтрате культуральной жидкости *S. mersei* определяли целлюлолитическую, ксиланазную, лакказную и пероксидазную активности. Результаты представлены на рисунке 1.

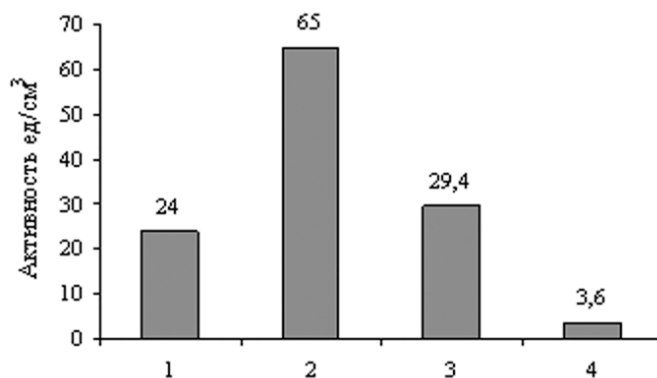


Рис. 1. Активности культуры *Streptomyces mersei*. 1 — целлюлолитическая, 2 — ксиланазная, 3 — лакказная, 4 — пероксидазная активности

Из рисунка 1 видно, что культура *S. mersei*, наряду с ксиланазной активностью, необходимой для разрушения ГМЦ, обладает лакказной и пероксидазной активностями. Поэтому далее подбирали оптимальные способы и условия осаждения комплекса лигнолитических ферментов.

Выделение комплекса ферментов из культуральной жидкости актиномицета проводили высококонцентрированными растворами солей (метод фракционного высаливания) и органическими растворителями.

Известно, что ферменты лигнолитического комплекса имеют разные изоэлектрические точки (ИЭТ): лакказа — рН 3,9, лигниназы — рН 4,1–4,8, пероксидазы — рН 3,5–4,3. В связи с этим выделение лигнин-разрушающего препарата проводили при рН 4,0.

Процесс высаливания ферментов зависит от степени гидрофобности белковой молекулы. Чем выше концентрация соли, тем быстрее происходит образование осадка. В качестве осадителя использовали $(NH_4)_2SO_4$.

Для определения оптимальной концентрации высаливающего агента процесс проводили при температуре 20 °С, рН 4,0. Высаливающий агент был взят в концентрациях 70, 80, 90 и 100% от полного насыщения. При этом более полное осаждение активного белка было достигнуто при концентрации $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 70% от полного насыщения и составило 1,7 г/дм³. Выход препарата при концентрациях высаливающего агента 80, 90 и 100% от полного насыщения составил 1,3, 1,5 и 1,0 г/дм³, соответственно.

Для определения температурного оптимума процесса высаливание активного белка проводили при 5, 20 и 35 °С. Было установлено, что оптимальная температура высаливания — 20 °С, при которой выход препарата составил 1,7 г/дм³. Выход препарата при 5 и 35 °С составил 1,1 и 1,5 г/дм³, соответственно.

Для определения оптимальной длительности процесса высаливания осаждение ферментного препарата осуществляли в течение 30–90 мин.

Оптимальная длительность высаливания составляет 90 мин., при этом выход препарата — 1,7 г/дм³.

В результате проведенных экспериментов было найдено, что оптимальными параметрами процесса высаливания являются: концентрация высаливающего агента — 70% от полного насыщения, температура — 20 °С, длительность высаливания — 90 мин. Максимальный выход ферментного препарата при этом составляет 1,7 г/дм³.

В качестве органических осадителей использовались: этиловый, изопропиловый спирты, бутанол и ацетон. Осаждение проводили при рН 4,0 и температуре 5 °С. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

Осаждение ферментов органическими растворителями

Растворитель	Выход фермента, г/дм ³			
	1 : 1	2 : 1	3 : 1	4 : 1
Этанол	1,7	2,3	3,2	2,8
Ацетон	1,6	2,0	2,7	2,9
Изопропанол	1,7	1,9	2,5	2,4
Бутанол	—	—	—	—

Из таблицы 1 видно, что наиболее эффективно осаждение культуральной жидкости *S. mersei* этанолом в соотношении 3:1; при этом выход препарата составил 3,2 г/дм³.

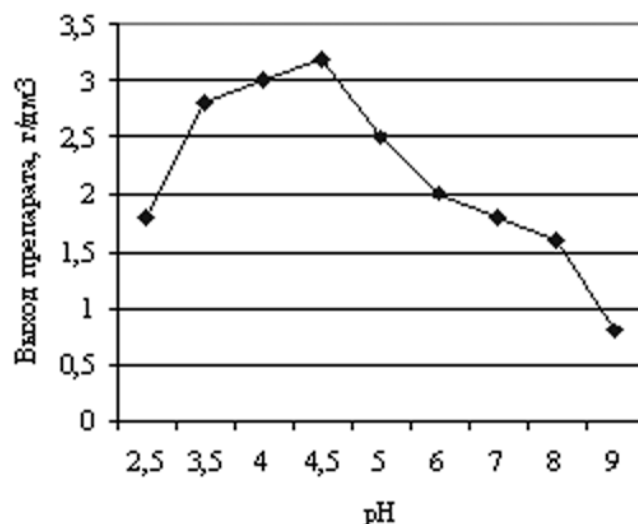


Рис. 2. Влияние рН среды на выход ферментного препарата

На рисунке 2 представлена зависимость выхода препарата от рН среды. Максимальный выход препарата наблюдался при рН 4,5 и составил 3,2 г/дм³. Поэтому последующее осаждение ферментов проводили при данном значении рН.

Таким образом, эффективным способом получения ферментного препарата является осаждение активного белка из культуральной жидкости органическим растворителем — этанолом, так как в этом случае выход препарата был в два раза выше, чем при осаждении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, и составлял 3,2 г/дм³. При этом упрощается технологический процесс за счет отсутствия стадии очистки препарата от соли.

В культуральной жидкости *S. mersei* и в выделенном из нее ферментном препарате определяли лакказную и пероксидазную активности.

Лакказная и пероксидазная активности культуральной жидкости составили (ед./мл) — 29,4 и 3,6, соответственно; препарата (ед./г) — 8080 и 1000, соответственно.

Выделенный ферментный препарат использовали для получения концентрата пищевых волокон с повышенным содержанием целлюлозы (КПВЦ). Обработка растительного сырья ферментным препаратом дала возможность получить КПВЦ следующего состава: целлюлоза — 87,0%, гемицеллюлоза — 11,0%, лигнин — 2,0%.

Полученный КПВЦ может быть использован при производстве пищевых продуктов диетического (лечебного) и лечебно-профилактического назначения, в частности, хлебобулочных изделий, для профилактики

и лечения таких заболеваний, как нарушение обмена веществ (ожирение), гипертония, атеросклероз, сахарный диабет.

Литература

1. Нечаев А.П., Траубенберг С.Е., Кочеткова А.А. и др. Пищевая химия / Под ред. А.П. Нечаева. — СПб.: ГИОРД, 2001. — 592 с.
2. Дудкин М.С., Щелкунов Л.Ф. Новые продукты питания. — М.: МАИК «Наука», 1998 — 304 с.
3. Грачева И.М., Кривова А.Ю. Технология ферментных препаратов. 3-е изд., перераб. и доп. — М.: Изд-во «Элевар», 2000. — 512 с.: илл. — (Учебники и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений).
4. Кислухина О.В. Ферменты в производстве пищи и кормов. — М.: ДеЛи принт, 2002. — 336 с.
5. Волочатова И.В., Медведева С.А., Беловежец Л.А. Перспективы использования микроорганизмов для ускоренного компостирования древесных отходов / В кн.: Материалы Российской научно-практической конференции «Оценка современного состояния микробиологических исследований в Восточно-Сибирском регионе». — Иркутск, 2002. — С. 199–201.
6. Саловарова В.П., Козлов Ю.П. Эколого-биотехнологические основы конверсии растительных субстратов: Учеб. пособие. — М.: Изд-во РУДН, 2001. — 331 с.: илл.

ISOLATION OF LIGNIN-DEGRADING MICROBIAL ENZYME FOR PRODUCTION OF FOOD FIBERS CONCENTRATE WITH HIGH CONTENT OF CELLULOSE

V.V. MITEREVA

Moscow State University of Food Production

In the work task was to develop a method for lignin-degrading microbial enzyme, which allows to process waste wood in order to obtain the preparation of food fibers with high content of cellulose. It turned out to enzyme isolated from *Streptomyces mersei* by an original technique of the author.

Keywords: lignin, lignin-degrading microbial enzyme, cellulose, food fibers.

ПРОИЗВОДСТВО И ПРИМЕНЕНИЕ НОВОЙ ФОРМЫ БИОПРЕПАРАТА В РЕСПУБЛИКЕ ТАТАРСТАН ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКИ ЧИСТОЙ ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Р.П. ИБАТУЛЛИНА^{1,2*}, Ф.К. АЛИМОВА¹, Д.И. ТАЗЕТДИНОВА¹, Р.И. ТУХБАТОВА¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет,

² ООО «НПИ «Биопрепараты», Казань, Республика Татарстан

Исучено комплексное влияние новых форм биопрепаратов на агрохимические и микробиологические показатели почвы. Показан значительный благоприятный эффект, который оказывает микробиологический препарат производства ООО «НПИ «Биопрепараты» на структуру и активность почвенного микробного сообщества.

Ключевые слова: биопрепараты, микробные сообщества, азотфиксирующие бактерии.

Бактериальные удобрения и средства по защите растений от грибных и бактериальных болезней, произведенные на основе высокоспецифичных, наиболее приспособленных штаммов микроорганизмов, в совокупности образуют специфическую форму биопрепаратов.

Биоудобрения включают в свой состав азотфиксирующие бактерии, способные усваивать атмосферный — молекулярный азот, переводить его в форму, легкодоступную для растений, и аккумулировать его в ризосфере растений и в почве. Формирование азотфиксирующих растительно-микробных ассоциаций определяется взаимодействиями между растениями, микробными популяциями и факторами среды. При этом создается целостная система, способная направлять часть энергии фотосинтеза на процесс превращения атмосферного азота в доступные для растений соединения. Биологический источник азота может обеспечивать до 70% потребности растений в данном элементе питания. Кроме того, бактерии, входящие в состав биопрепаратов, способны стимулировать рост и развитие растений, что позволяет ускорить созревание на 12–15 дней. Они также защищают растения от вредителей, синтезируя более 100

различных антибиотиков, подавляя жизнедеятельность болезнетворных бактерий и грибов. На этом свойстве основано применение биопрепаратов в качестве регуляторов роста и средств защиты растений, абсолютно безвредных для окружающей среды, — в отличие от химических аналогов [1].

Биопрепарат «Мизорин» был произведен на базе ООО «НПИ «Биопрепараты» на основе различных видов и штаммов неспоровых бактерий, выделенных из ризосферы и ризопланы растений на субстрате-носителе золонит. Он входит в группу земледобрильных препаратов под коммерческим названием «Фармат». Титр препарата 2,5–9,0 млрд. жизнеспособных клеток на 1 мл/г препарата. Механизм действия биопрепарата: ризосферные бактерии не образуют видимых глазом клубеньков, но, заселяя прикорневую зону растений и поверхность корней, вытесняют болезнетворные бактерии, лишая их пространства и пищи. Бактерии, входящие в состав биопрепаратов, колонизируют корни сельскохозяйственных культур и, образуя с ними «ассоциативный симбиоз», способны выполнять ряд функций, полезных для растений. Препарат нетоксичен, не обладает канцерогенным, тератогенным и кумулятивным действием, экологически безопасен, не содержит солей тяжелых металлов, яиц гельминтов и патогенной микрофлоры, пожаро- и взрывобезопасен.

Опытная культура — ячмень сорта «Нур» — была обработана биопрепаратом в дозе 300 г/га. Обработку семян производили непосредственно перед посевом в помещении под навесом, избегая прямых солнечных лучей, машинами для протравливания семян по технологии, аналогичной протравливанию. При обработке использо-

© 2010 г. Ибатуллина Р.П., Алимова Ф.К., Тазетдинова Д.И., Тухбатова Р.И.

* Автор для переписки:

Ибатуллина Римма Петровна,

мл. н. с. кафедры биохимии

Казанского (Приволжского) федерального университета,

директор ООО «Научно-производственный институт

«Биопрепараты»

420008 Казань, ул. Кремлевская, 18

Тел.: +7 (917) 857-72-44

вали шнековый погрузчик и ленточный транспортер. В начале транспортера устанавливали емкость с раствором биопрепарата и лейкой поливали семена.

Площадь опытного участка 22 га. Почва — серая лесная, тяжелосуглинистая, рН — 7,6–7,7. Предшественник — яровая пшеница. Под культуру вносилась соответствующая стартовая доза минеральных удобрений (аммиачная селитра 1,5 ц/га).

Для анализа были отобраны образцы почвы с полей ООО «Яна тормыш», где выращивался яровой ячмень сорта «Нур», Балтасинского района, Республика Татарстан. Контролем служила почва, где выращивали семена, необработанные биопрепаратом.

Лабораторные испытания действия микробиологических препаратов проводили в лаборатории сельскохозяйственной биохимии и биотехнологии Казанского (Приволжского) федерального университета и в агрохимической лаборатории на базе ООО Тепличного комбината «Майский» (с. Осиново, Казань).

Агрохимический анализ почвы проводили объемным методом (1:2) [2].

Количество микроорганизмов учитывали прямым микроскопическим методом [3]. Учет общей биомассы бактерий и грибов производили на основании данных прямой микроскопии. Исходя из среднего размера бактериальной клетки — 0,1 мкм, биомасса одной клетки приблизительно равна 10^{-13} г, что в пересчете на сухое вещество составит $0,2 \times 10^{-13}$ г.

Выделение и учет бактерий осуществляли методом посева из разведений на селективные среды. Для обнаружения отдельных физиологических групп микроорганизмов использовали специальные среды:

- Микроорганизмы, использующие органические формы азота, выявляли на МПА.
- Микроорганизмы, использующие минеральные формы азота, выявляли на КГА.

- Actinomyцеты выявляли на среде Гаузе.
- Аэробные азотфиксаторы и олигонитрофилы учитывали на среде Эшби.
- Микроскопические грибы обнаруживали на кислой среде Чапека.
- Олигокарбофилы выявляли на голодном агаре (ГА).

Целлюлозоразрушающие микроорганизмы выявляли на среде Гетчинсона [4, 5].

Под влиянием биопрепарата «Мизорин», производства ООО «НПИ «Биопрепараты» рН почвы смещается от щелочного (7,7) в сторону нейтрального (7,2). Содержание азотистых веществ в опыте на порядок выше по сравнению с контролем. Также в опыте в большем количестве содержатся все необходимые для полноценного роста и развития растений микро- и макроэлементы, такие как К, Р, Na, Ca, Mg и другие (табл. 1).

Для более точной количественной характеристики состояния микробной системы необходимо использовать как прямой учет, так и чашечный метод. Данные о численности грибов по посеву основаны на подсчете общего числа колоний на питательной среде, а колония может быть образована как спорой, так и обрывком мицелия. Более точную характеристику дает визуальное выявление с помощью прямой микроскопии.

Результаты подсчета микроорганизмов чашечным методом и методом люминесцентной микроскопии представлены в таблице 2.

Известно, что в природной среде происходит закономерная смена структур сообществ живых организмов, которая называется сукцессией. «Молодая» система характеризуется преобладанием г-стратегов. Со временем вступает все больше экологических факторов, поскольку сама среда в результате развития организмов становится более разнообразной.

Таблица 1

Содержание химических элементов и их соединений в образцах почвы

Образец	ЕС, мСм/см	рН	Содержание элементов, мг/л								
			NO ₃	NH ₄	NO ₃ +NH ₄	К	Р	Ca	Mg	Na	SO ₄
Опыт	0,27	7,2	15,4	1,4	16,8	12,6	1,3	61,2	12,4	15,0	125,1
Контроль	0,28	7,7	10,5	0,77	11,3	4,5	0,4	64,4	6,9	14,5	125,3

Общее содержание микроорганизмов в образцах почв

Образец	Показатель обилия по данным посева на МПА, млн./г почвы (Р)		Показатель обилия по данным микроскопии, млн./г почвы (М)		Показатель обилия К=М/Р	
	Количество	Биомасса, мл/г	Количество	Биомасса, мл/г	Количество	Биомасса, мл/г
Опыт	$23,9 \times 10^5$	$4,78 \times 10^{-8}$	$12,8 \times 10^7$	$49,92 \times 10^{-7}$	54	1745
Контроль	$14,3 \times 10^5$	$2,86 \times 10^{-8}$	$11,8 \times 10^7$	$46,02 \times 10^{-7}$	83	1609

Возрастание показателя обилия (К) может указывать на поздние этапы сукцессии, для которых характерна низкая скорость роста микроорганизмов. Соответственно низкое значение К — это индикатор начальных этапов сукцессии («молодая экосистема») с более высоким темпом размножения.

Наибольшее количество бактерий в почве отмечается в опыте (табл. 3). Весной значительная часть спор в такой почве прорастает и переходит в состояние вегетативных клеток. Чем активнее размножение последних, тем больше выделяется спор, учтенных на среде МПА. В какой-то мере это указывает на более энергично происходящие процессы минерализации органического вещества весной. Почва в это время более обеспечена разными формами минеральных питательных веществ.

Среди всех видов спорообразующих бактерий в наибольшем количестве выявляется *B. mesentericus*. Это кожисто-складчатые и слизисто-складчатые формы. Плоско-морщинистые, диффузные и гладкие формы выявляются редко. *B. mesentericus* (кожисто-складчатых форм) обладает сильно выраженными антагонистическими свойствами по отношению к другим спорным формам бактерий. *B. mesentericus*, обнаруженная в наших исследованиях, относится к бациллярному населению, размножающемуся в почвах с высоким содержанием азота. Заметное уменьшение численности этого микроорганизма свидетельствует о снижении содержания доступных форм азота в почве. Аналогичное явление наблюдается и по другим представителям бациллярного населения. Почвенные бациллы относятся к зимогенной микрофлоре, отражающей ход микробиологических процессов в переработке свежего органического вещества.

В контроле численность *B. mesentericus* и *B. megaterium* значительно ниже, что указывает на обеднен-

ность этой почвы лабильными формами органического вещества.

Наиболее активное размножение спорообразующих бактерий в почве зависит от содержания в ней влаги. Динамика численности и видового состава спорообразующих бактерий может объективно отражать биологическое состояние почвы.

Таблица 3

Учет микроорганизмов почвы методом посева на твердые питательные среды

Среда	Контроль	Опыт
МПА (общ.)	$28,9 \times 10^5$	$34,6 \times 10^3$
МПА (СО*)	$12,5 \times 10^4$	$14,4 \times 10^5$
КГА	$53,4 \times 10^7$	$35,7 \times 10^7$
Гаузе	$7,1 \times 10^4$	$7,8 \times 10^5$
Чапека	$23,1 \times 10^6$	$37,9 \times 10^5$
Эшби	$5,9 \times 10^4$	$20,9 \times 10^3$
Гетчинсона	$44,7 \times 10^4$	$75,9 \times 10^3$
ГА	$8,5 \times 10^3$	$24,2 \times 10^3$

Примечание: * СО — спорообразующие бактерии

Количество актиномицетов выявляли на среде Гаузе. Численность актиномицетов в опыте была на порядок выше, чем в контроле, что говорит о замедлении процессов минерализации без биопрепарата. Групповое разнообразие актиномицетов было невысокое. Снижение концентрации и обеднение группового состава актиномицетов связано с угнетением биологической активности, ослаблением мобилизации азота в ней.

Распространение представителей групп *Chromogenus*, *Griseus* в контроле свидетельствует о физиологических свойствах их приспособляемости к не-

благоприятным условиям, таким как иссушение почвы, накопление токсических веществ.

Наибольшая численность азотфиксирующих бактерий род (р.) *Azotobacter* в опыте указывает на наличие достаточного количества влаги, уровня рН, доступного органического вещества, отсутствие грибов-антагонистов. В процессах азотфиксации, помимо р. *Azotobacter*, участвует и *Clostridium pasterianum*. Количество последнего является показателем доступности растительных остатков и содержания кислорода в почве. Обычно в отсутствие р. *Azotobacter* азотфиксация дублируется *Clostridium pasterianum*, который чувствителен к изменению внешних условий.

По сравнению с другими группами микроорганизмов наиболее чувствительными к уровню влажности оказались целлюлозоразрушающие микроорганизмы. Интенсивность развития последних зависит от влажности и наличия растительных остатков.

Основными разрушителями целлюлозы в почве являются актиномицеты и бактерии (в меньшей степени — грибы), которые чувствительны к содержанию доступных форм азота. Так, например, появление осенью грибов с мощным ферментативным аппаратом указывает на то, что в процессе разложения целлюлозы доминирующую роль в осенний период играют грибы. Весной и летом же разложение целлюлозы идет за счет бактерий и актиномицетов. Ослабление интенсивности разложения целлюлозы в почве летом свидетельствует не только о снижении активности целлюлозоразрушающих микроорганизмов, но и об угнетении напряженности общего хода микробиологических процессов.

Установлено, что плесневые грибы являются ксерофитами и способны развиваться в тех же условиях, что и актиномицеты и бактерии. Развитие плесневых грибов обусловлено не только влажностью, но и поступлением органических веществ, аэрацией, температурой, кислотностью.

Поэтому эта группа микроорганизмов в большей степени, чем другие, сосредоточивается в верхних слоях. Большую роль в определении численности микроскопических грибов играют антагонистические отношения с другими микроорганизмами в борьбе за источники питания.

Определение соотношения численности микроскопических грибов с другими группами микроорганизмов в почве исследуемых горизонтов в динамике показало, что они составляют меньшую часть микробного населения — всего 1–11%. Хотя биомасса их может превосходить бактериальную.

Комплексы типичных видов, выделенных на основе пространственной и временной частоты встречаемости, представлены в таблице 4.

Таблица 4

Учет микромицетов в почвенных образцах

Род	Частота встречаемости в почве, %	
	Опыт	Контроль
<i>Penicillium</i>	100	100
<i>Aspergillus</i>	100	100
<i>Mucor</i>	47	75
<i>Alternaria</i>	19	35
<i>Trichoderma</i>	51	32

Результаты прямого микроскопирования позволили выявить наличие мицелиальной стадии грибов в опыте, что указывает на активно метаболизирующую фазу развития.

В контроле грибы в основном были представлены покоящимися формами. Снижение степени сходства между исследуемыми образцами почв также является показателем антропогенного воздействия. Так, скашивание зеленой массы растений вызывает изменение количества и вида доступного органического вещества, что ведет к резким изменениям в структуре микромицетов и появлению видов микромицетов, обладающих мощным ферментативным аппаратом, способствующим утилизации труднодоступных форм органики (целлюлозы) — *Trichoderma*.

Следовательно, анализ почвы позволил выявить в контроле сравнительно высокое содержание возбудителей альтернариоза (*Alternaria*), плесневения, почвоутомления и токсикога *Mucor*, *Aspergillus*. Эти сапрофитные плесневые грибы постоянно присутствуют в почве, заселяют поверхность органов растения и являются причиной снижения иммунитета.

В опыте преобладали другие микромицеты (*Penicillium*, *Trichoderma*), способные разлагать белковые соединения, труднодоступные углеродосодержащие вещества, необходимые для полноценного роста и созревания культурных растений.

Отмечается участие отдельных видов в образовании перегноя и борьбе с возбудителями заболеваний растений. Уменьшение численности микроорганизмов, ассимилирующих минеральный азот, свидетельствует о падении плодородия почвы.

Так, в опыте количество микроорганизмов, ассимилирующих минеральный азот, было выше на порядок, по сравнению с контролем.

При оценке влияния биопрепарата на урожайность ячменя сорта «Нур» в опытном варианте было установлено, что этот показатель равен 54,2 ц/га: эта величина на 20,8 ц/га больше, чем в контроле.

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о значительном благоприятном эффекте, который оказывает микробиологический препарат производства ООО «НПИ «Биопрепараты» на структуру и активность почвенного микробного сообщества, урожайность культуры.

Многообразие активных форм микроорганизмов, присутствующих в опыте, безусловно, положительно влияет на качественный и количественный состав почвы, содержание в ней легкоусвояемых растением минеральных и органических веществ, гуминовых кислот, кислорода.

Литература

1. Государственный доклад «О состоянии природных ресурсов и об охране окружающей среды Республики Татарстан в 2005 году» // Мин-во экологии и прир. рес. РТ. – Казань, 2006.
2. Мельников Л.В. и др. Органические компоненты глино-металлоорганического комплекса почв лесостепи (теоретические и экспериментальные аспекты изучения). – Казань: Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова (Ленина), 2007. – 248 с.
3. Андreyuk E.И., Иутинская Г.А., Дульгеров А.Н. Почвенные микроорганизмы и интенсивное земледелие. – Киев: Наук. думка, 1988. – 192 с.
4. Методы почвенной микробиологии и биохимии: Учебное пособие / Под ред. Д.Г. Звягинцева. – М.: Изд-во МГУ, 1991. – 312 с.
5. Микроорганизмы и охрана почв / Под ред Д.Г. Звягинцева. – М.: Изд-во МГУ. – 1989. – 206 с.

PRODUCTION AND USE OF NEW FORMS OF BIOLOGICAL PREPARATION IN REPUBLIC OF TATARSTAN FOR THE CREATION OF CLEAN FOOD

R.P. IBATULLINA^{1,2}, F.K. ALIMOVA¹, D.I. TAZETDINOVA¹, R.I. TUHBA TOVA¹

¹ Kazan (Volga) Federal University,

² LLC «NPI «Biopreparaty», Kazan, Tatarstan Republic

Studied the combined effect of new forms of biological products on the agro-chemical and microbiological soil. Shows a significant beneficial effect, which has a microbiological agent of LLC «NPI «Biopreparaty» on the structure and activity of soil microbial community.

Keywords: biopreparations, microbial communities, nitrogen-fixing bacteria.

ПОИСК ВАРИАБЕЛЬНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ У ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОЙ АНЕМИИ ЦЫПЛЯТ, СПОСОБНЫХ ВЛИЯТЬ НА РЕАЛИЗАЦИЮ ПАТОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА ВИРУСА

Н.А. СЕЛИВЕРСТОВА*

ГНУ «Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока РАСХН»,
р.п. Краснообск Новосибирской области

Осуществляли компьютерное моделирование условий, происходящих в клетке при воздействии на нее вируса инфекционной анемии цыплят (ИАЦ). В геномной ДНК вируса ИАЦ с количеством пар нуклеотидов 2299 выявлено два тандемных повтора, длиной 21 п.н. каждый, 4 CpG островка. Размеры островков колеблются от 195 до 992 пар нуклеотидов. При анализе геномной ДНК вируса инфекционной анемии цыплят были найдены 2 промоторные последовательности. Промотор № 1 находится на протяженности от 157 до 407 п.о., промотор № 2 — 895—1145 п.о. Обнаруженные VNTR входят в состав некодирующей ДНК, что снижает вероятность функционально значимых мутаций.

Ключевые слова: инфекционная анемия цыплят, промоторная последовательность, CpG островки, переменные тандемные повторы.

Введение

Инфекционная анемия кур — высоко контагиозное, хроническое заболевание молодых птиц, проявляющееся у цыплят с 2—4-недельного возраста, характеризующееся апластической анемией и генерализованной лимфоидной атрофией [3].

Вирус ИАЦ принадлежит к семейству *Circoviridae*, роду *Gyrovirus*. Он — мелкий, с диаметром частиц 23—25 нм. Геном имеет кольцевую однонитевую ДНК, которая реплицируется в инфицированных клетках посредством кольцевого посредника. Главным транскриптом генома инфекционной анемии цыплят является мРНК, кодирующая 3 типа белков: VP1, VP2, VP3.

Целью работы является компьютерное моделирование условий, происходящих в клетке, которые могут инициировать или подавлять деструкцию клетки, возникающую при воздействии на нее вируса ИА.

Материалы и методы

Исследования проводились в лаборатории болезней птиц ГНУ «Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока РАСХН».

© 2010 г. Селиверстова Н.А.

* **Автор для переписки:**

Селиверстова Наталья Андреевна

аспирант лаборатории болезней птиц ГНУ ИЭВСиДВ

Тел./факс: 348-39-31; E-mail: 348-39-31@mail.ru,

Материалом нашего исследования является нуклеотидная последовательность геномной ДНК вируса ИАЦ с количеством пар нуклеотидов 2299, депонированная в «GenBank».

Методы исследования: для определения количества и локализации тандемных повторов была использована программа «Tandem repeats finder».

Анализ распределения CpG островков внутри генома проводили с использованием программы «CpG PLOT». При анализе структуры распределения CpG островков руководствовались следующими критериями: Observed/Expected ratio > 0,60, процент C + G > 50,00, длина > 200 п.н.

Для поиска промоторов использовали программу «Proscan: Version 1.7» (BIMAS).

Результаты и обсуждение

Тандемные повторы, variable number tandem repeats (VNTR) — последовательности повторяющихся фрагментов ДНК. Они представляют собой участки ДНК, содержащие несколько последовательно монотонно повторяющихся нуклеотидных сайтов произвольного состава. Их наличие показано у различных организмов [4]. Характерной особенностью VNTR является различное число повторов (аллелей), которое наследуется в соответствии с законами генетики, может различаться у разных штаммов вируса и являться их уникальной генетической характеристикой.

В исследуемой нами нуклеотидной последовательности генома вируса ИАЦ было обнаружено два tandemных повтора со следующей последовательностью нуклеотидов CGTACAGGGGGGTACGTCATC и CGTACAGGGGGGTACGTCACG (табл. 1).

Известно, что CpG островки являются геномным регионом, состоящим из часто встречающихся CpG участков, но количество CpG островков в определенной нуклеотидной последовательности ограничено. Около 40% промоторов располагаются вблизи CpG островка

[2], а 70% промоторов включают в себя CpG островки, находящиеся в нуклеотидной последовательности. В CpG островках «р» — это фосфодиэфирная связь, которая находится между цитозином и гуанином, определяющимися как С и G в каждой одноцепочечной или двухцепочечной последовательности. Разные CpG сайты в кодирующих регионах гена являются частью промотора. CpG островки зачастую находятся близко к сайту старта транскрипции [1]. Локализация CpG островков внутри генома показано в таблице 2.

Таблица 1

Вариабельные tandemные повторы у вируса инфекционной анемии цыплят

№	Местоположение VNTR (осн.)	Количество оснований в периоде	Количество копий	Общий размер	A	C	G	T
1	144–204	21	2,9	21	19	22	39	18
2	219–259	21	2,9	21	19	24	41	14

Таблица 2

Локализация CpG островков внутри генома вируса ИАЦ

№ островка	Размер островка (п.о.)	Начало-конец
1	992	(50–1041)
2	278	(1078–1355)
3	279	(1476–1754)
4	195	(1914–2108)

Из таблицы 2 видно, что геномная ДНК вируса ИАЦ имеет 4 CpG островка. Размеры островков колеблются от 195 до 992 пар нуклеотидов.

Строение генов характеризуется наличием экзон-интронной структуры. В состав первичного транскрипта — пре-мРНК входят как экзоны, так и интроны (некодирующие районы). В процессе сплайсинга интроны вырезаются из пре-мРНК. Оставшиеся же части — экзоны — объединяются в зрелую мРНК, которая может транслироваться в белок.

Необходимыми и одними из самых функционально важных районов гена являются регуляторные районы. Промотор — это основной регуляторный район гена. Он служит ключевым элементом ДНК, необходимым для РНК-полимераза II-зависимой транскрипции, и локализован вблизи сайта старта транскрипции [5].

При анализе геномной ДНК вируса инфекционной анемии цыплят были найдены две промоторные последовательности. Промотор № 1 находится на протяженности от 157 до 407 п.о., а промотор № 2 — на протяженности 895–1145 п.о.

Оба промотора входят в состав CpG островков, В связи с этим метилирование геномной ДНК цирковируса может изменять экспрессию генов, контролируемых данными промоторами.

Следовательно, представляет интерес изучение факторов, влияющих на интенсивность процессов метилирования геномной ДНК. Например, некоторые гиповитаминозы (дефицит фолиевой кислоты), неопластическая трансформация способны приводить к деметилированию ДНК и соответственно потенциально влиять на патогенность цирковируса.

Обнаруженные VNTR входят в состав некодирующей ДНК, что снижает вероятность функционально значимых мутаций.

С другой стороны, мы наблюдали преимущественно единичные нуклеотидные замены, а не изменения числа VNTR повторов, что позволяет предполагать, что изменение размеров геномной ДНК вируса может иметь функциональное значение, снижающее эффективность воспроизводства вируса в системе паразит-хозяин.

Заключение

В работе обнаружены промоторы, локализуемые в составе CpG островков. Таким образом, у вируса инфекционной анемии цыплят в геномной ДНК существуют мишени для модулирования экспрессии вирусных генов под воздействием метилирования CpG островков.

Литература

1. Донченко А.С., Юшков Ю.Г., Афонюшкин В.Н. и др. Поиск генов-кандидатов вируса болезни Марека способных повышать его патогенность при деметилировании промоторов // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. — 2009. — № 1. — С. 73–75.
2. Fatemi M., Rao M.M., Jeong S. et al. Footprinting of mammalian promoters: use of a CpG DNA methyltransferase revealing nucleosome positions at a single molecule level // Nucleic Acids Res. — 2005. — Vol. 33(20). — e176.
3. Gelderblom H., Kling S., Lurz R., Tischer I., von Buelow V. Morphological characterization of chicken anaemia agent (CAA) // Arch. Virol. — 1989. — Vol. 109. — P. 115–120.
4. Haber J.E., Louis E.J. Minisatellite origins in yeast and humans // Genomics. — 1998. — Vol. 48. — N 1. — P. 132–135.
5. Prestidge D.S. Predicting Pol II promoter sequences using transcription factor binding sites // J. Mol. Biol. — 1995. — Vol. 23. — P. 923–932.

SEARCH VARIABLE GENETIC ELEMENTS IN THE VIRUS INFECTIOUS ANEMIA CHICKENS THAT MAY AFFECT THE IMPLEMENTATION OF THE PATHOGENIC POTENTIAL OF THE VIRUS

N.A. SELIVERSTOVA

SSI «Institute of Experimental Veterinary of Siberia and the Far East of Academy of Agricultural Sciences»,
Krasnoobsk Novosibirsk region

Computer simulation of conditions that occur in the cell under the action of the infectious chicken anemia virus was carried out. In the genomic DNA of infectious anemia virus from chickens of 2299 bp revealed two tandem repeats, length of 21 bp each, 4 CpG island. Size of the islands range from 195 to 992 base pairs. In the analysis of genomic DNA of the chicken anemia virus were found two promoter sequences. Promoter N 1 is the length from 157–407 bp, promoter N 2 — 895–1145 bp. VNTR discovered part of the non-coding DNA that reduces the likelihood of a functionally-relevant mutations.

Keywords: chicken anemia virus, promoter sequences, CpG island, variable number tandem repeats.

ГЛУБИННЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПОСЕВНЫХ КУЛЬТУР ВАКЦИННОГО ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ШТАММА СИБИРЕЯЗВЕННОГО МИКРОБА

А.Н. ШЕВЦОВ, В.В. ФОКИНА*, И.В. ДАРМОВ, И.Н. СЕДЕЛЬНИКОВ

ФГУ «48 Центральный научно-исследовательский институт
Министерства обороны Российской Федерации», Киров

Приведена технология приготовления посевной культуры штамма *B. anthracis* СТИ-1 на аппарате-культиваторе АК-0,012. Дана сравнительная характеристика посевных культур, приготовленных глубинным способом и способом поверхностного выращивания на плотной питательной среде. Показаны преимущества глубинного способа приготовления посевной культуры при производстве сибиреязвенных вакцин.

Ключевые слова: посевная культура, глубинное культивирование, *B. anthracis*, аппарат-культиватор, плотная питательная среда.

Введение

В технологии ряда биологических препаратов, в том числе и на основе различных штаммов сибиреязвенного микроба, первой производственной стадией является приготовление посевных культур. Схема получения посевных культур индивидуальна, состоит, как правило, из нескольких этапов и строится таким образом, чтобы обеспечить необходимую посевную дозу, вводимую в питательную среду аппарата-культиватора [1].

В настоящее время в технологии изготовления противосибиреязвенных вакцинных препаратов применяют посевные культуры производственного штамма, приготовленные на плотных питательных средах (поверхностный способ выращивания). Этот способ состоит из двух основных этапов:

- получение вегетативной формы сибиреязвенного микроба в жидкой питательной среде;
- получение споровой формы на плотной питательной среде.

Именно вторая лабораторная стадия в наибольшей степени нуждается в совершенствовании, что связано с рядом важнейших технологических особенностей и недостатков.

Главными из недостатков поверхностного способа выращивания являются такие, как трудоемкость и длительность процесса, отсутствие средств и его контроля, низкая продуктивность и необходимость использования большого числа инокуляторов, что существенно повышает риск контаминации посевных культур посторонней микрофлорой. Поэтому задача совершенствования технологии выращивания посевных культур приобретает все большую актуальность.

Перспективность и необходимость применения метода глубинного культивирования для получения посевных культур не вызывают сомнения, учитывая условия серийного промышленного производства сибиреязвенных вакцин.

На сегодняшний день глубинный способ приготовления посевных культур успешно используют при получении ряда биопрепаратов [2, 3].

Целью работы являлась оценка возможности использования посевных культур сибиреязвенного микроба, используемых в технологии сибиреязвенных вакцин.

Материалы и методы

Для приготовления одной серии регламентной посевной культуры сибиреязвенного производственного штамма *B. anthracis* СТИ-1 (коллекция ГИСК им. Л.А. Тарасевича, инв. № 35) поверхностным способом маточную эталонную культуру засеивали в 20 флаконов вместимостью 100 мл, содержащих по 50 мл бульона на основе перевара Хоттингера. Культуру выращивали в течение 22 ± 2 ч при температуре 33 ± 1 °С в статических

© 2010 г. Шевцов А.Н., Фокина В.В.,
Дармов И.В., Седельников И.Н.

* Автор для переписки:

Фокина В.В.

ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России»,
610017 Киров, ул. Лепсе, д. 52, кв. 36,

Тел.: 88332381527

условиях. Затем осуществляли пересев на агаризированную среду на основе перевара Хоттингера, причем брали не менее 100 стеклянных матрасов, для чего требуется более 30 л плотной питательной среды. Через 4–5 суток после термостатирования при температуре 33 ± 1 °С в статических условиях, после проверки матрасной культуры на полноту спорообразования (наличие не менее 90% нормально окрашенных спор по Циллю – Нильсену), производили смыв матрасной культуры. В итоге количество споровой культуры в 30%-ном водном растворе глицерола составило примерно 400–600 мл с концентрацией спор $4\text{--}5$ млрд·мл⁻¹, что соответствовало 28–54 посевным дозам для культиватора БИОР 0,25 при получении живой, химической или комбинированной сибиреязвенных вакцин.

Для приготовления экспериментальной посевной культуры глубинным способом использовали аппарат-культиватор АК-0,012. Предварительно ферментер стерилизовали в автоклаве по режиму 129 ± 1 °С в течение 45 мин. Затем в культиватор с соблюдением правил асептики вводили 6 л жидкой питательной среды, приготовленной на основе 1% солянокислого гидролизата рыбной кормовой муки.

В питательную среду дополнительно вводили 50% раствор глюкозы, 10% раствор хлористого кальция и 2,5% раствор сернокислого марганца. Аппарат засеивали маточной эталонной культурой штамма *B. anthracis* СТИ-1 (коллекция ГИСК им. Л.А. Тарасевича, инв. № 35). Процесс культивирования осуществляли при температуре 33 ± 1 °С в течение 36–48 часов, при аэрировании стерильным воздухом объем на объем питательной среды в минуту и перемешивании 300 оборотов в минуту.

Полноту спорообразования посевной культуры оценивали микроскопически в мазках, окрашенных по Циллю – Нильсену, в дискретно отобранных пробах. При наличии в мазках не менее 90% спор, нормально окрашенных по Циллю – Нильсену, проводилось концентрирование нативной культуры с отмывкой дистиллированной водой на установке микрофльтрации «Сартокон-мини» («Владисарт», Россия) с использованием мембранных модулей с диаметром пор 0,2 мкм.

При исследовании динамики накопления протективного антигена и нативной споровой суспензии при исследовании разных посевных культур определяли титр антигена с монорецепторной кроличьей сывороткой в реакции диффузной преципитации в агаровом геле, рН среды, концентрацию глюкозы с О-толуидином и биомассу с использованием спектрофотометра.

Результаты

Новым способом с помощью глубинного культивирования в лабораторных ферментерах было приготовлено 3 экспериментальных серии жидких, стабилизированных 30% раствором глицерина, посевных культур производственного вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1. В качестве контроля использовали регламентную посевную культуру, приготовленную поверхностным способом, папортизированную отделом биологического контроля. Посевные культуры закладывали на хранение при температуре 4 ± 2 °С. Характеристики посевных культур на момент приготовления и после 3 лет хранения представлены в таблице 1.

Проведенные экспериментальные исследования показали, что посевные культуры, полученные глубинным способом, как свежеприготовленные, так и хранившиеся в течение трех лет, полностью соответствует требованиям нормативно-технической документации. Кроме того, необходимо отметить, что значения показателей общей и биологической концентрации спор в мл, превосходит в 3–3,5 раза значения аналогичных показателей посевной культуры, приготовленной на плотной питательной среде по регламентной технологии.

Применение стадии отмывки споровой суспензии в ходе концентрирования в значительной степени уменьшает количество балластных веществ в готовой посевной культуре, что, в свою очередь, повышает ее качество. Использование нового способа получения посевной культуры позволяет приготовить 500–600 мл этой культуры с концентрацией спор $\leq 15\text{--}20$ млрд·мл⁻¹, что составляет 134–214 посевных доз для промышленного ферментера БИОР-0,25.

При приготовлении одной серии посевной культуры сибиреязвенного микроба поверхностным способом затрачивают не менее 5–6 суток. Необходимо также отметить, что особенно часто контаминация посевной культуры сибиреязвенного микроба посторонней микрофлорой часто происходит на лабораторной стадии, где для выращивания микроорганизмов используют различные стеклянные емкости, что в сочетании с несовершенством методических приемов работы не позволяет достаточно надежно обеспечить стерильность процесса. По мнению ряда авторов [1, 3–5] наиболее вероятными причинами контаминации микробных культур является нарушение герметичности инокуляторов (чаще одного из них), отклонение от заданных режимов стерилизации используемых стеклянных емкостей, питательной среды и дополнительных растворов, вводимых в питательную среду. К способствующим загрязнению посевной культуры причинам следует отнести пересев материала из

Таблица 1

Сравнительная характеристика посевных культур вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1

Наименование показателя, ед. измерения	Требования нормативно-технической документации	Значение показателя свежеприготовленной посевной культуры, номер экспериментальной серии				Значение показателя посевной культуры, номер экспериментальной серии, через 3 года хранения			
		1	2	3	Регламентная (контроль)	1	2	3	Регламентная (контроль)
Общая концентрация спор, млрд·мл ⁻¹	5, не менее	20,3	21,7	28,8	6,0	20,0	19,5	26,8	5,2
Биологическая концентрация спор, млрд·мл ⁻¹	-	17,2	18,9	19,4	4,7	16,1	17,2	18,4	3,5
Содержание спор, нормально воспринимающих окраску по Цилю-Нильсену, процент	90, не менее	98	97	98	96	97	98	96	95
Индекс иммунитета в тесте пассивной защиты морских свинок, усл. ед.	1·10 ⁴ , не менее	12·10 ⁴	15·10 ⁴	20·10 ⁴	13·10 ⁴	10·10 ⁴	17·10 ⁴	18·10 ⁴	11·10 ⁴
Содержание посторонних микроорганизмов	Не содержать посторонних микроорганизмов	Не содержит							
Специфическая безопасность	Безопасна	Безопасна							
Процент гибели белых мышей при подкожном введении им 1 млн. спор	50, не менее	75	68	72	70	80	65	60	74
Чувствительность к сибиреязвенному бактериофагу	Чувствительна	Чувствительна							
Характер роста в жидкой питательной среде	Образует легко разбивающийся осадок в виде «комочка ваты» без помутнения бульона	Образует легко разбивающийся осадок в виде «комочка ваты» без помутнения бульона							
Характер роста изолированных колоний на плотной питательной среде	Колонии R и RO-формы	Колонии R и RO-формы							

нескольких емкостей в одну и многоэтапность ее приготовления. Посевная культура этой стадии обычно характеризуется низкими выходами биомассы и большой вариабельностью биологических и физико-химических характеристик (из 300 мл питательной среды получается 5–6 мл суспензии с концентрацией спор не более 6 млрд·мл⁻¹).

Большой части вышеуказанных недостатков лишен глубинный способ приготовления посевной культуры в аппаратах-культиваторах, при котором процесс культивирования тщательно исследуется и становится все более управляемым. Ферментеры оснащаются контрольно-измерительной аппаратурой с автоматическим регулированием.

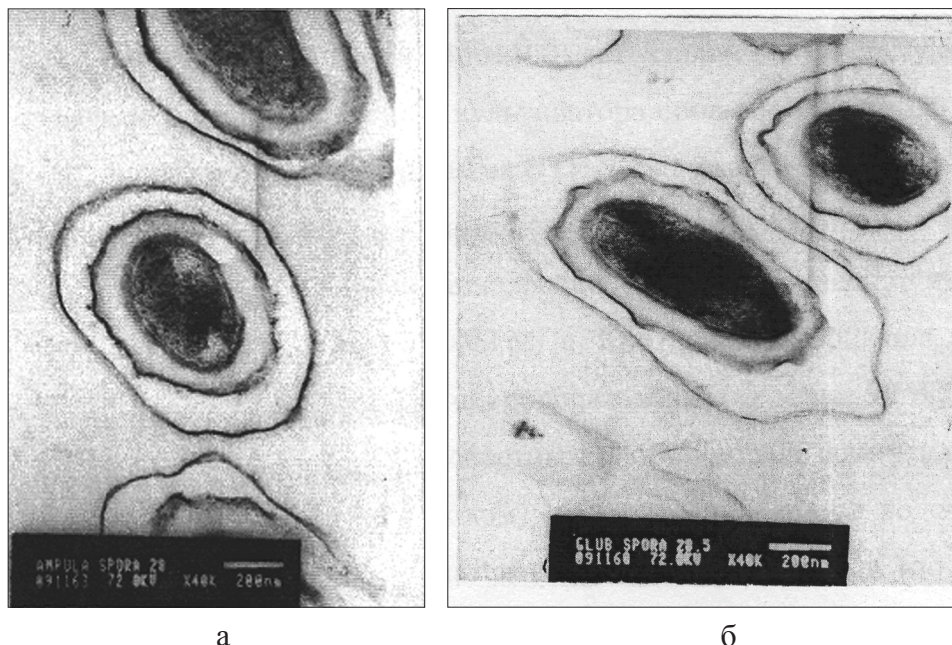


Рис. 1. Ультратонкий срез спор посевной культуры, приготовленной глубинным методом (а) и на плотной питательной среде (б)

Дополнительно было проведено сравнительное электронно-микроскопическое исследование ультратонких срезов спор посевных культур производственного штамма *B. anthracis* СТИ-1, приготовленных различными способами выращивания (рис. 1). Показано, что экзоспориум, споровые оболочки, кортекс, спороплазма и нуклеоид спор, полученных путем глубинного выращивания в аппарате-культиваторе и на поверхности агаризованной питательной среды, не различаются по ультраструктурной организации.

В ходе дальнейших исследований (табл. 2, 3) было установлено, что использование новой посевной культуры для получения протективного антигена и нативной споровой культуры использованного штамма *B. anthracis* СТИ-1 позволяет получить качественные полуфабрикаты для приготовления живой, химической и комбинированной сибиреязвенных вакцин, так как по всем основным показателям качества не было обнаружено достоверных отличий от препаратов, приготовленных по существующей технологии.

Таблица 2

Сравнительная характеристика различных посевных культур штамма *B. anthracis* СТИ-1 при получении протективного антигена ($X \pm I_{95}$, n=3)

Наименование показателя, ед. измерения	Время выращивания регламентной посевной культуры, в ч			Время выращивания экспериментальной посевной культуры, в ч		
	0	8	12–14	0	8	12–14
Водородный показатель, ед. рН	8,9±0,2	8,9±0,3	8,1±0,3	9,0±0,3	7,9±0,2	7,7±0,5
Концентрация клеток, ед. экстинкции	н/о	1800±200	2800±250	н/о	1700±350	2600±300
Содержание глюкозы, г·л ⁻¹	6,7±0,2	3,2±0,4	0,1±0,1	6,2±0,3	2,8±0,3	0
Антигенная активность в реакции диффузной преципитации, εА·мл ⁻¹	н/о	0	100	н/о	0	100

Примечание: «н/о» — не определяли

Сравнительная характеристика различных посевных культур штамма *B. anthracis* СТИ-1 при получении нативной споровой суспензии ($X \pm I_{95}$, n=3)

Посевная-культура	Наименование показателя, ед. измерения										
	Водородный показатель на срок культивирования в ч, ед. рН			Содержание глюкозы на срок культивирования в ч, г·л ⁻¹			Концентрация клеток на срок культивирования в ч, ед. экстинкции		Общая концентрация спор на 38–44 ч культивирования, млрд·мл ⁻¹	Биологическая концентрация спор 38–44 ч культивирования, млрд·мл ⁻¹	Полнота спорообразования, процент
	0	20	40	0	8	16	8	20			
Регламентная	8,5± 0,2	7,35± 0,2	8,5± 0,3	0,28± 0,2	0,15± 0,3	0	2060± 210	8680± 230	1,72± 0,12	1,35± 0,21	95± 3
Экспериментальная	8,3± 0,3	7,47± 0,4	8,87± 0,2	0,25± 0,4	0,18± 0,1	0	3350± 240	9880± 220	1,85± 0,16	1,66± 0,15	97± 4

Заключение

Таким образом, проведенные исследования показали возможность замены двухэтапного получения посевной культуры (вегетативной бульонной и матрасной споровой) на посевную культуру, получаемую глубинным способом в лабораторном ферментере, что позволило:

- управлять процессом культивирования;
- сократить продолжительность приготовления с 136 до 48 часов;
- повысить количество посевных доз и концентрацию спор в мл (≤ 2 раза);
- уменьшить вероятность контаминации посевной культуры посторонней микрофлорой на этапах приготовления;
- сократить расход питательной среды ≤ 5 раз.

Литература

1. Биотехнология / Под ред. ак. РАСХН Е.С. Воронина. – М.: ГИОРД, 2005. – 762 с.
2. Мухачев С.Г., Александровская Ю.П., Катков Д.В., Верхорубов В.П. Изменение кислотности культуральной жидкости при выращивании инокулята и посевного материала в производстве лизина // Биотехнология. – 2007. – № 1. – С. 65–74.
3. Шевелуха В.С., Калашикова Е.А., Кочиева Е.Э. и др. Сельскохозяйственная биотехнология. – М.: Высшая школа, 2008. – 710 с.
4. Бирюков В.В. Основы промышленной биотехнологии. – М.: Колос, 2004. – 296 с.
5. Гапонов К.П. Процессы и аппараты микробиологических производств. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981. – 240 с.

SUBMERGED METHOD OF PREPARING INOCULATION CULTURES OF PRODUCTION VACCINE *B. ANTHRACIS* STRAIN

A.N. SHEVTSOV, V.V. FOKINA, I.V. DARMOV, I.N. SEDELNIKOVA

Federal State Establishment «Russian Federation Ministry of Defense 48 Research Institute», Kirov

A method of preparing inoculates of the strain *B. anthracis* STI-1 with AC-0,012 cultivation apparatus is shown. The comparative trial of inoculation cultures prepared by the submerged method against the ones prepared by superficial solid cultivation was performed. The advantages of the submerged method of the inoculates' preparation by production of antianthraxis vaccines are revealed.

Keywords: inoculation culture, submerged cultivation, *B. anthracis*, cultivation apparatus, solid nutrient medium.

ПОЛУЧЕНИЕ ОБРАЗЦОВ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ДЛЯ БИОСКРИНИНГА: ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ И ПОЛИМЕРНЫХ КОМПОНЕНТОВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

А.В. КУЧИН*

Институт химии Коми научного центра Уральского отделения РАН, Сыктывкар

Автор представляет обзор исследований по биоскринингу молекул-кандидатов для создания на основе изопреноидов субстанций препаратов, обладающих антиоксидантным, противоопухолевым, антитромбоцитарным, противовирусным и адаптогенным действием. Сырьевой базой для получения таких препаратов служила древесная зелень хвойных, из которой методом эмульсионной экстракции выделяют фармакологически активные вещества и соединения для промышленного применения: насыщенные спирты, полиненасыщенные спирты и карбонильные соединения, соли тритерпеновых кислот.

Ключевые слова: изопреноиды, синтетические природные соединения, фармакологическая активность, древесная зелень хвойных.

В Институте химии Коми научного центра Уральского отделения (ИЦ УрО) РАН ведется работа по созданию на основе изопреноидов субстанций препаратов, обладающих антиоксидантной и противоопухолевой активностью, комплексным влиянием на сосудистотромбоцитарный гемостаз, противовирусным и адаптогенным действием.

Обширные лесные ресурсы Северо-Восточной Европейской части Российской Федерации открывают большие возможности для их промышленного использования, включая глубокую переработку. В этом отношении перспективна древесная зелень хвойных, из которой с помощью метода эмульсионной экстракции можно выделять фармакологически активные вещества и получать широкий спектр соединений для промышленного применения: насыщенные спирты, полиненасыщенные спирты и карбонильные соединения, соли тритерпеновых кислот.

Исследователями Кировской государственной медицинской академии было изучено влияние экстрактов пихты на грызунов. Установлено, что экстрактивные

вещества пихты обладают адаптогенным и стресс-протективным действием на животных.

Был создан из древесной зелени пихты природный фунгицид и стимулятор роста растений — биопрепарат «Вэрва». Он содержит биологически активные вещества, обладает стимулирующим рост и защитным действием в зонах с неблагоприятными климатическими условиями. Кроме того, препарат позволяет увеличить урожай на 25–40%, стимулирует рост растений, сокращает период созревания, защищает от заражений.

Показано также, что нейтральные вещества и кислые компоненты, выделяемые водно-щелочным экстрагированием из древесной зелени пихты, обладают адаптогенными свойствами. Проявление адаптогенного эффекта фракций экстракта хвои наблюдается в диапазоне дозирок $(1-20) \times 10^{-5}$ мг/кг массы тела животного. Специфика манифестации адаптогенных свойств зависит от видовой принадлежности биомодели, от типа неблагоприятного воздействия на организм животного и от уровня биологической интеграции, на котором исследовались параметры реакции.

Во Всероссийском НИИ ветеринарного птицеводства РАСХН (Санкт-Петербург) было проведено исследование антивирусных свойств экстрактов пихты на цыплятах и куриных эмбрионах. Было констатировано, что экстракт пихты не токсичен для суточных цыплят и развивающихся куриных эмбрионов. Выявлено выраженное вируцидное действие экстрактивных веществ пихты против вирусов гриппа птиц и ньюкаслской болезни.

© 2010 г. Кучин А.В.

* **Автор для переписки:**

Кучин Александр Васильевич

член-корреспондент РАН, д.х.н., профессор,
директор Института химии Коми ИЦ УрО РАН
167982 Сыктывкар, ул. Первомайская, 48.

Тел./факс: (8212) 21-84-77, (8212) 21-99-16

E-mail: kutchin-av@chemi.komisc.ru

Известно, что замещенные фенолы: инол, эмоксиллин, пробукол, витамин K_1 , коэнзим Q (убихинон $n=10$), альфа-токоферол — обладают радиопротективными, гепатопротективными, антиоксидантными, противоопухолевыми свойствами, оказывают противовоспалительное действие. Были проведены физиологические испытания 4-метил-2-изоборнилфенола, 2-метил-6-изоборнилфенола, гидрохлорид 2-(дибутил-амино)метил-4-метил-6-изоборнилфенола, 4-метил-2,6-диизоборнилфенола, пентоксифиллина. Были изучены следующие виды активности:

- антиоксидантная,
- адаптогенная,
- гемореологическая,
- антитромбоцитарная,
- антитромбогенная,
- влияние на мозговой кровоток.

Определен диапазон эффективных адаптогенных и нетоксических доз препаратов терпенофенолов и аминотерпенофенолов.

Следует отметить, что активация свободнорадикальных процессов играет важную роль в запуске реакций «ишемического каскада» в тканях мозга, что обосновывает рациональность применения антиоксидантов в качестве одной из терапевтических стратегий при лечении ишемических поражений головного мозга. Такими свойствами обладают пространственно-затрудненные фенолы, в особенности содержащие объемные заместители в о-положении к фенольному гидроксилу. Констатировано улучшение показателей гемодинамики под влиянием 4-метил-2,6-диизоборнилфенола (снижение артериального давления, повышение мозгового кровотока), а диборнол обладает антирадикальной, гемореологической, нейропротективной, антигипоксической, антитромбогенной активностью.

Статистика свидетельствует, что острые нарушения мозгового кровообращения (инсульт) занимают второе место среди причин смертности населения и первое — среди причин первичной инвалидизации. Поэтому актуальным является применение в терапии нарушений мозгового кровообращения нейропротективных средств, обеспечивающих метаболическую защиту головного мозга, к которым относятся антиоксиданты и антигипоксанты. В связи с этим поиски потенциальных молекул-кандидатов с такими свойствами имеют хорошие перспективы.

Разрабатываются и другие аспекты лечебного применения низкомолекулярных и полимерных компонентов растительного происхождения. Так, например, объектом

изучения являются нейтральные компоненты древесной зелени: камфен, борнеол, альфа-пинен, полипренол $m=12-16$. Полипренолы, представляющие собой полиненасыщенные спирты растительного происхождения, составляют в тканях растений 0,05–2% от веса сырья. Они обладают противовоспалительной, противовирусной, иммуномодулирующей активностью. Сходные свойства проявляют и полиненасыщенные спирты животного происхождения — долихолы.

Показано, что природные монотерпены (борнеол, миртенол, вербенон) обнаруживают бактерицидную активность.

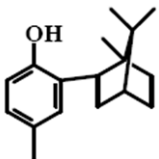
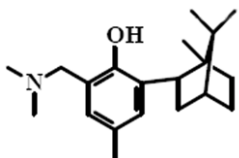
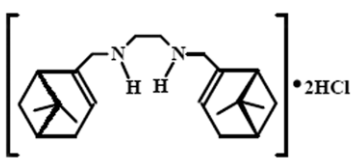
Было осуществлено исследование противовирусной эффективности природных фенолов и других химиопрепаратов. При этом использовался метод подавления образования специфического гемагглютинина (ГА) вируса гриппа. Экспериментальные химиопрепараты сравнивали с современными широко применяемыми противовирусными лекарственными средствами: арбидолом, тамифлю, ремантадином. Результаты исследования приведены в таблице 1.

Интересно отметить, что два из трех экспериментальных препаратов в больших дозах (50 мкг/мл) обладают высоким коэффициентом подавления образования специфического гемагглютинина вируса гриппа (100%), сходным с таковым, например, ремантадина и тамифлю в оптимальных дозах. Третий препарат — 4-метил-2-изоборнилфенол — в наибольшей дозе 50 мкг/мл приводит к коэффициенту подавления 75%. Что характерно — все три исследованных в данной серии препарата обеспечивали коэффициент подавления образования специфического гемагглютинина вируса гриппа даже в дозах 5,0 мкг/мл на 50–75%, а 0,5 мкг/мл — не ниже 50% (сходный с последним значением эффект достигается при использовании оптимальной дозы арбидола).

Был также проведен цикл работ по изучению потенциальных противоопухолевых препаратов для комплексного лечения с использованием борнейтронзахватной терапии. Была продемонстрирована способность карборанил хлорина накапливаться в прививной опухоли (саркома M1), а также его фототоксичность по отношению к клеткам этой опухоли. Результаты опубликованы в журнале «Bioorganic & Medicinal Chemistry», 2009, Vol. 17, P. 1297–1306.

Отдельно следует остановиться на блоке работ, связанных с применением целлюлозы как основы для создания средств профилактики и лечения тромботических состояний. Она имеет растительное происхождение и представляет собой линейный 1–4 связанный полиса-

Эффективность химиопрепаратов по подавлению образования специфического гемагглютинаина вируса гриппа

Препарат	Доза препарата, мкг/мл	Уровень гемагглютинаина (обратная величина)	Коэффициент подавления ГА, процент
	50,0	4	75
	5,0	4	75
	0,5	8	50
	50,0	0	100
	5,0	4	75
	0,5	8	50
	50,0	0	100
	5,0	8	50
	0,5	8	50
Арбидол	25,0	8	50
Тамифлю	100,0	0	100
Ремантадин	50,0	0	100
Контроль (без препарата)		16	—

харид регулярного строения, нерастворимый в воде, с молекулярной массой свыше 100000 (в природном виде).

Преимуществами целлюлозы перед другими полимерами природного и синтетического происхождения являются биосовместимость, доступность, отсутствие белкового загрязнения, относительная дешевизна.

Стратегия модификации природной целлюлозы с молекулярной массой более 100000 сводится к ее деструкции до фрагментов с молекулярной массой менее

20000, а уже потом осуществляется химическая модификация в заданном направлении.

Наиболее разработан путь получения сульфатированных производных целлюлозы, содержащих дополнительные группы (карбоксиметильные, амидоэтильные и фосфатные).

На рисунке 1 представлен пример такой модификации, приводящей к синтезу сульфатированных производных.

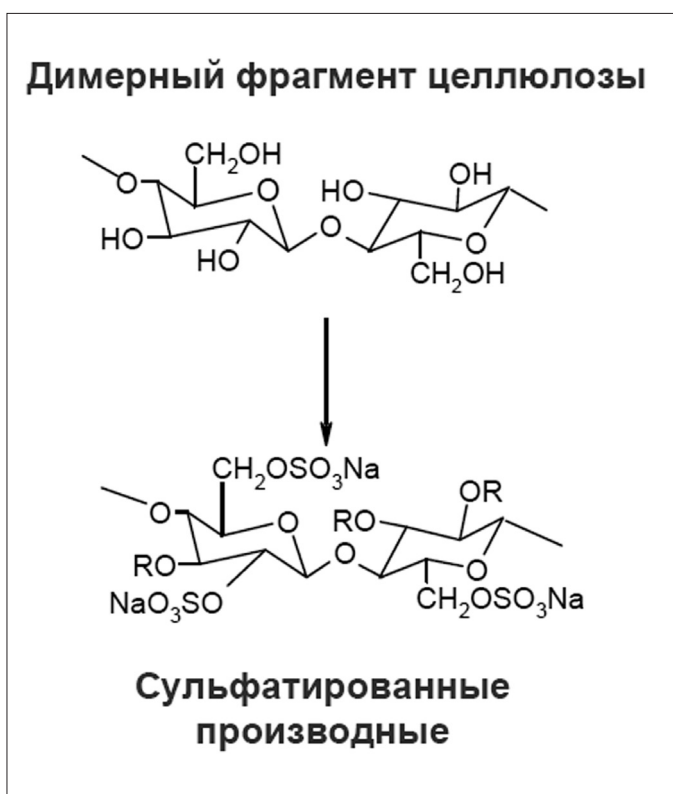


Рис. 1. Сульфатированные производные целлюлозы, содержащие дополнительные группы (карбоксиметильные, амидоэтильные и фосфатные). R = SO_3Na (сульфат целлюлозы); CH_2COONa (сульфат КМЦ); $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$ (сульфат амидоэтилцелл.); $\text{PO}(\text{ONa})_2$ (сульфат фосфата целл.)

В рамках данного раздела работы было проведено изучение влияния образцов сульфатированной целлюлозы на изменение времени свертывания плазмы крови человека. Для расчета специфических антитромбиновой (антифактор IIa, alla) и антифактор Ха (аХа) активностей использовали калибровочную кривую 5-го Международного стандарта нефракционного гепарина (NIBSC). Применялись коагулологические тесты активированного частичного тромбопластинового времени (аЧТВ, влияние на внутренний путь свертывания крови человека), РеаКлот НПО «Ренам» (влияние на активность фактора Ха).

Были определены анти IIa (тромбиновая) активность и активность фактора Ха при воздействии всех вышеуказанных сульфатированных производных целлюлозы. При этом результаты свидетельствовали о позитивном фармакологическом эффекте указанных сульфатированных производных. Был также получен конъюгат аминотерпенофенола (АМТФ) и сульфатированного полисахарида.

Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине».

Материалы доклада на II Международном конгрессе «ЕвразияБио-2010» (Москва, 12–15 апреля 2010 г.)

OBTAINING SAMPLES OF SYNTHETIC NATURAL COMPOUNDS FOR BIOSCREENING: PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF LOW MOLECULAR WEIGHT AND POLYMER COMPONENTS OF PLANT ORIGIN

A.V. KUCHIN

Institute of Chemistry, Komi Scientific Center, Ural Branch of RAS, Syktyvkar

The author presents an overview of research on bioscreening molecular candidates to create on the basis of isoprenoid substances, drugs that have antioxidant, anticancer, antiplatelet, antiviral and adaptogenic action. Resource base for these drugs served as a wood green conifers, from which the method of extraction of emulsion release of pharmacologically active agents and compounds for industrial applications: saturated alcohols, polyunsaturated alcohols and carbonyl compounds, salts of triterpene acids.

Keywords: isoprenoids, synthetic natural compounds, pharmacological activity, wood green conifers.

ПЕРСониФИЦИРОВАННАЯ МЕДИЦИНА: ВОЗМОЖНОСТИ И ДЕЙСТВИТЕЛЬНОСТЬ

В.С. БАРАНОВ*

НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта СЗО РАМН, Санкт-Петербург

Представлен обзор современных данных о персонифицированной медицине в мире и о перспективах ее развития в России.

Ключевые слова: персонализированная медицина, генетический паспорт, генетическая карта репродуктивного здоровья, геномные технологии.

Прогресс науки в последние 20–30 лет открыл совершенно новые возможности для медицины. Прежде всего, следует сказать о персонифицированной (или параллельно используемом синонимичном термине «персонализированной») медицине.

Персонифицированная предиктивная медицина (ППМ) основана на углубленном анализе индивидуального генома и последующем использовании его уникальных особенностей для сохранения здоровья, предупреждения болезней и улучшения качества жизни. Она вбирает в себя интегральную информацию из таких направлений, как нутригеномика, токсикогеномика, геномика старения, спортивная геномика, фармакогеномика, дерматогеномика, психогеномика, кардиогеномика, онкогеномика и др.

Персонифицированная предиктивная медицина характеризуется следующими главными чертами:

1. Раздел молекулярной медицины, направленный на лечение и профилактику частых сочетанных (мультифакторных) заболеваний (МФЗ) на основе уникальных индивидуальных особенностей генома каждого человека.

2. Отличительные особенности ППМ:

- индивидуальный характер (персонифицированная);
- профилактическая направленность (предиктивная).

3. Методическую основу современной ППМ составляет тестирование генов-маркеров, ассоциированных с МФЗ, так называемых генов предрасположенности (кандидатных генов).

4. Возможность создания генетического паспорта — индивидуальной базы ДНК-данных, отражающей уникальные генетические особенности каждого человека, его предрасположенность к тем или иным наследственным заболеваниям и МФЗ.

Необходимо привести конкретные формы, в которые облакаются современные методические возможности медицины, базирующиеся на достижениях генетики. Вначале представим пример «генетического» паспорта, который является неотъемлемой базовой частью ППМ (рис. 1).

Информация, помещенная в данном паспорте, является строго конфиденциальной. В нем представлены такие блоки, как первичное медико-генетическое консультирование, кариотип, индивидуальный генетический номер, досимптоматическая диагностика, диагностика гетерозиготного носительства, тестирование наследственной «предрасположенности». Обязательны заключительное медико-генетическое консультирование, информация для врача и пациента, практические рекомендации. Ясно, что генетический паспорт будущего станет гораздо совершеннее, основанный на анализе полного генома и постгеномных технологиях.

Очень важную миссию выполняет внедрение генетических подходов в практику лечебно-профилактических учреждений, занимающихся охраной здоровья матери и ребенка и сохранением репродуктивного здоровья населения в целом. Речь идет о генетической карте репродуктивного здоровья, помещенной на рисунке 2.

Ее составные части таковы:

- медико-генетическое консультирование супружеской пары,

© 2010 г. Баранов В.С.

* **Автор для переписки:**

Баранов Владислав Сергеевич
член-корреспондент РАМН, д.м.н., профессор,
заведующий лабораторией пренатальной диагностики
наследственных и врожденных заболеваний Института
акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта СЗО РАМН
199034 Санкт-Петербург, Менделеевская линия, 3
E-mail: baranov@vb2475.spb.edu



Рис. 1. Образец «генетического» паспорта

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КАРТА РЕПРОДУКТИВНОГО ЗДОРОВЬЯ

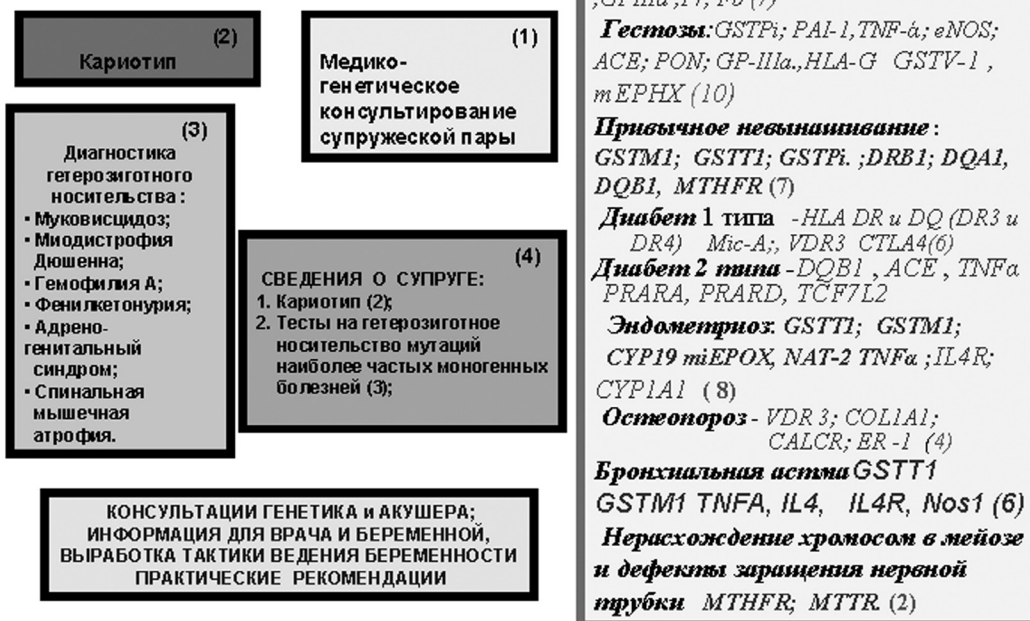


Рис. 2. Генетическая карта репродуктивного здоровья

- кариотип,
- диагностика гетерозиготного носительства,
- сведения о супруге,
- тестирование наследственной «предрасположенности».

В эту карту также заносятся данные консультации генетика и акушера, информация для врача и беременной, выработка тактики ведения беременности, практические рекомендации.

Нельзя сказать, что обсуждаемое новое перспективное направление триумфально шествует вперед, не имея проблем и противоречий. Основные проблемы ППМ сводятся к следующему:

1. Достоверность результатов генетического тестирования наследственной предрасположенности.
2. Выявление всех главных генов, ассоциированных с конкретным сочетанным (мультифакторным) заболеванием.
3. Адекватная интерпретация результатов генетического тестирования для лечащих врачей.

Внедрение метода полногеномного скрининга ассоциаций (Genome Wide Association Studies – GWAS)

позволит в значительной мере решить первые две проблемы, а решение третьей в большей степени зависит от реализации общей программы повышения квалификации медицинского персонала в сфере высоких технологий, улучшения его образовательного уровня в целом. На рисунке 3 изображена карта генов, полученная с помощью метода GWAS (показаны связи с 658 заболеваниями).

За рубежом активно ведутся исследования по интеграции генетической и клинической информации. Создаются специализированные центры: NCBI – National Center Biotechnological Information, European Bioinformatic Institute. Осуществляются целевые программы: Human Variome Project (HVP), Collaboration, Education & Test Translation (CETT) – www.cettprogram.org. Формируются соответствующие базы данных: LSD – Locus Specific Databases. Функционируют сайты: United Kingdom Genetic Testing Network – www.ukgtn.nhs.uk; ВОЗ – www.who.int/genomics/en. Разрабатываются компьютерные программы для оценки результатов генетического тестирования (ГТ). Готовятся также соответствующие кадры, способные истолковывать результаты ГТ.

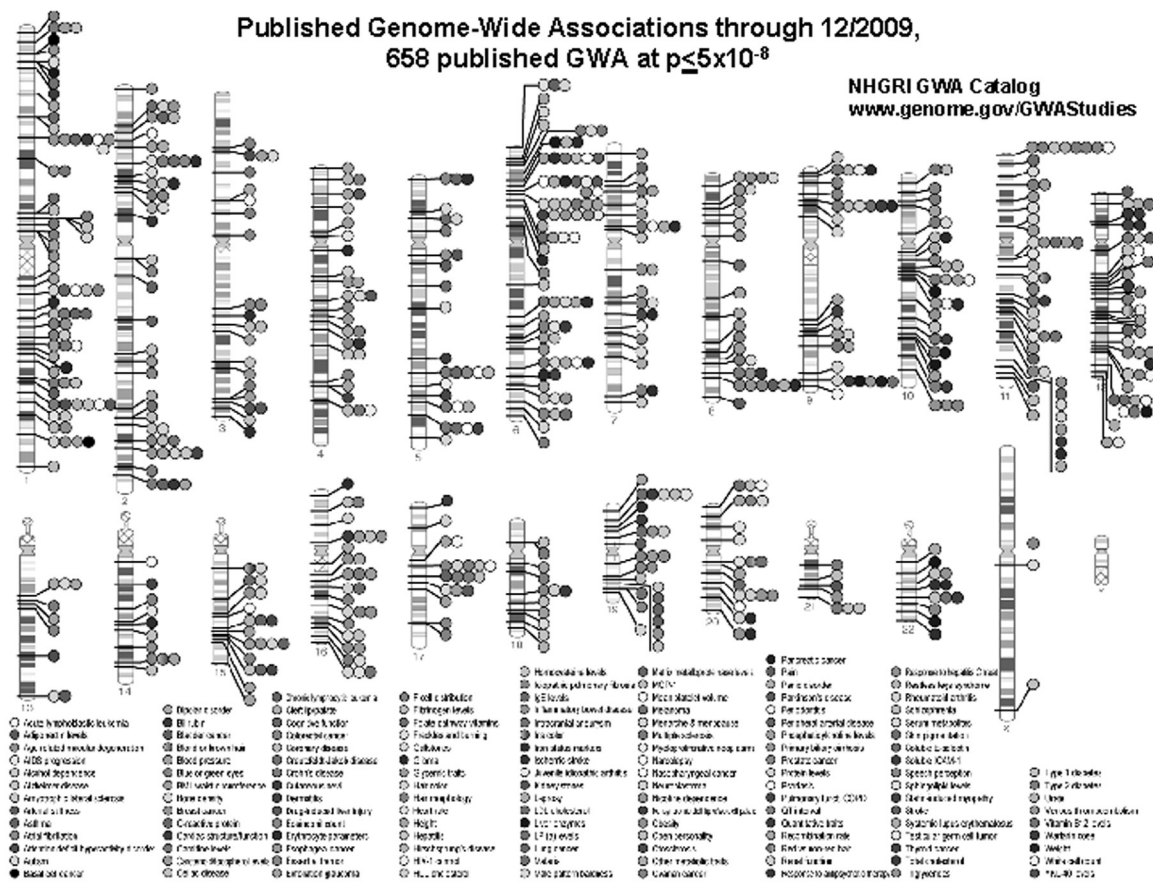


Рис. 3. Карта генов, связанных с заболеваниями, полученная методом GWAS

Кроме того, создаются клинически ориентированные базы данных Genotype & Phenotype Networks, ведется разработка панелей ГТ для каждого МФЗ с учетом популяционных особенностей полиморфизма генов-кандидатов, осуществляется целенаправленная деятельность по автоматизация процессов ГТ, унификации его методов, внедрению ГТ в службу клинических лабораторий.

Реальные успехи персонифицированной предиктивной медицины в мире можно продемонстрировать на ряде существенных результатов, полученных в последнее время:

- При помощи метода GWAS к 2010 году просканированы более 100 МФЗ, идентифицированы сотни новых генов-маркеров многих частых сочетанных заболеваний.

- Успешно внедряются в клинику фармакогенетические тесты для оптимизации дозировки варфарина, тиопурина, цитостатических и других препаратов.

- Получен чип на все экзоны 12 генов-кандидатов гипертрофической кардиомиопатии (Fokstunen et al., 2008).

- Сформирована панель на 8-полиморфных сайтах 7 генов (FV, FII, ACE, MTHFR, SERP1nL1, GPI3A, APOE), достоверно ассоциированных с инсультом, и предлагаются рекомендации для лечащих врачей (Versano A. et al., 2008).

- Создаются микрочипы и проходят клинические испытания панели генов-кандидатов на наследственную предрасположенность к болезни Крона, целиакии, раку простаты, диабету, ожирению, бронхиальной астме, остеопорозу, акушерско-гинекологической и онкологической патологии и др.

На фоне столь впечатляющих успехов зарубежной науки весьма трудно давать общую оценку состояния внедрения новейших достижений в отечественную медицинскую генетику, не прибегая к терминологии незабвенного фильма Бортко — о «суровых годах». А они, «суровые будни» персонифицированной предиктивной медицины в России выглядят так:

- отсутствуют общедоступные отечественные базы данных типа генотип-фенотип (генетический профиль заболевания);

- нет репрезентативных (>1000 образцов ДНК) унифицированных банков пациентов с точным диагнозом;

- отсутствуют центры для проведения общегеномного скрининга ассоциаций, анализа числа копийных вариантов (Copy Number Variation — CNV) и исследования экспрессионных профилей;

- ведется слабая подготовка врачей в вопросах медицинской генетики и персонифицированной (предиктивной) медицины;

- не создано компьютерных программ для оценки результатов генетического тестирования;

- отсутствуют программы оценки отдаленных результатов проспективного генетического тестирования наследственной предрасположенности.

Все ли здесь обстоит так безнадежно? Ведь в нашей стране очень сильны научные школы в этой области, идущие от С.Н. Давиденкова, Н.В. Тимофеева-Ресовского, А.А. Прокофьевой-Бельговской к Н.П. Бочкову, В.И. Иванову, их последователям и др. Имеются активно работающие научные центры медицинской генетики в Москве, Томске, Санкт-Петербурге, центр по этногеномике в Уфе и др. На мой взгляд, возможные пути прогресса ППМ в России могут лежать в следующем аспекте:

1. Сравнение уже известных панелей генов МФЗ из различных регионов Российской Федерации с таковыми, полученными методом полногеномного скрининга тех же МФЗ в странах Западной Европы и в США.

2. Тестирование на отечественных коллекциях ДНК больных главных генов-кандидатов этих МФЗ, ранее выявленных в ведущих мировых центрах.

3. Создание репрезентативных (>1000 образцов) банков ДНК больных по каждому частому МФЗ и соответствующих им по регионам групп контроля.

4. Формирование отечественных центров по внедрению методов идентификации генов-кандидатов, ассоциированных с МФЗ, анализу CNV и исследованию экспрессионных профилей.

Подытоживая вышесказанное, надо еще раз подчеркнуть наиболее важные моменты:

- Методологическую основу персонифицированной предиктивной медицины составляют представления о функциональных генетических модулях, генетическом полиморфизме и генах предрасположенности.

- Основными отличительными особенностями ППМ являются индивидуальность и профилактическая направленность.

- Индивидуальный банк ДНК-данных (генетический паспорт) — естественный продукт прогресса современной генетики и медицины, его внедрение требует детальной клинической, юридической и этической проработки.

- Главная задача современной медицины — внедрение достижений ППМ в практику здравоохранения, в клиническое мышление всех врачей.

В заключение хотелось бы задаться вопросом, как генетика может изменить медицину через 50 лет. Заниматься прогнозами — рискованное и неблагодарное дело, поэтому лучше всего в подобных случаях обратиться к высказываниям авторитетных специалистов. Вот что сказал один из них, Фрэнсис Коллинз, директор Национального института исследований генома человека Национальных институтов здоровья США: «Мы будем иметь индивидуализированную, превентивную медицинскую помощь, основанную на персональных оценках риска, полученных на основе анализа ДНК. К этому времени каждый человек будет иметь информа-

цию о полной нуклеотидной последовательности своего генома. Стоимость секвенирования индивидуального генома будет меньше 1000 US\$. Эта информация будет неотъемлемой частью нашей медицинской карты.

Почти все медицинские назначения будут учитывать наши генетические особенности» (Collins F.S., TIME, the Future of Life, 2003).

Материалы доклада на II Международном конгрессе «ЕвразияБио-2010» (Москва, 12–15 апреля 2010 г.)

PERSONALIZED MEDICINE: OPPORTUNITIES AND REALITIES

V.S. BARANOV

D.O. Ott Institute of Obstetrics and Gynecology. NWB RAMS, St. Petersburg

Provides an overview of recent data on personalized medicine in the world and its development prospects in Russia.

Keywords: personalized medicine, genetic passport, a genetic map of reproductive health, genomic technologies.

СИСТЕМА БИОЛОГИЧЕСКОГО СКРИНИНГА ВО ФРАНЦИИ: СТРАТЕГИИ И ТЕНДЕНЦИИ

ВЕХАРИ САКАНЯН*

ProtNeteomix и Нантский университет, Франция

Представлены данные французских специалистов в области разработки новых лекарственных препаратов с использованием биологического скрининга.

Ключевые слова: разработка лекарственных препаратов, биологический скрининг.

Прогресс медико-биологических наук создал возможность для разработки принципиально новых лекарственных препаратов, в том числе ориентированных на мишень. Особенно это касается расшифровки генома человека, открывшей перспективы для лечения многих заболеваний и формирования так называемой персонализированной медицины.

В настоящее время открытие и разработка лекарств (Drug Discovery & Development — DDD) базируются на следующих принципах:

- В качестве активных действующих агентов служат малые молекулы, антитела, белки, пептиды, ДНК/РНК.
- Источниками являются природа или лабораторный химический или биологический синтез.
- Необходимые компоненты для разработки лекарства: молекула и мишень.
- Механизм воздействия: торможение или активация функции мишени.
- Принцип поиска молекул может быть направленным или случайным.

В связи с тем, что сейчас стоимость разработки лекарственных средств достигла критического уровня, грозящего существованию самой фармацевтической индустрии, встает острая необходимость поиска новых путей. Если в 1982 году стоимость создания препара-

та равнялась 80 млн. долл., то в 2007 г. — 1,3 млрд. долл. (среднегодовой темп роста в сложных процентах: Compound Annual Growth Rate [CAGR] — 14%). Согласно прогнозам, в 2015 году она достигнет 2,0 млрд. долл. (CAGR — 5%). Остановить рост затратного процесса можно через повышение эффективности научных исследований и внедрение инновационных технологий в фарминдустрию.

В контексте обсуждаемой проблемы большое значение приобретают вопросы методологии. Молекулярно-биологический уровень познания функций организма идет все более вглубь. В развитие геномного подхода созданы постгеномные технологии: протеомика, метаболомика, биоинформатика и т.д. Число таких «омик» («omics») с прогрессом науки будет нарастать, что предоставит в распоряжение врачей XXI века огромный объем биологической информации. Появились также методы высокопроизводительного скрининга (High-Throughput Screening — HTS). Все эти новейшие методы характеризуются возможностью широкомасштабного изучения биологических процессов, одновременного анализа многих мишеней, оценки разных параметров в одном эксперименте.

В Европе стратегия скрининга молекул включает в себя такие составные части, как:

1. **Европейская программа FP7** (the Seventh Framework Programme) — в нее входят проекты высокопроизводительного скрининга для поиска белковых биомаркеров заболеваний, эффективности и безопасности.

2. **Программа IMI** (Innovative Medicine Initiative) — она состоит из десяти приоритетных направлений в медицине, затрагивающих актуальные вопросы технического и методологического характера. Объем финансирования на уровне 10 млн. евро в течение пяти лет. Акцент делается на технологии следующих поколений.

© 2010 г. Вехари Саканян

* **Автор для переписки:**

Vehary Sakanyan

Dr. of Microbiology, Professor of University of Nante,

ProtNeteomix,

29 Avenue Provence 44700, ORVAULT, France

Tel.: (0033) 02 51 12 56 20

Fax: 33-(0)2 51 12 56 26

E-mail: v.sakanyan@protneteomix.com;

Vehary.Sakanyan@univ-nantes.fr

3. **Национальные программы** — ANR и др.

4. **Программы фармацевтических компаний DDD** — открытие и разработка новых лекарств.

5. **Европейские конференции** по высокопроизводительному скринингу, библиотекам химических соединений, ADMET, high-content screening и др.

В стратегии скрининга молекул Франции содержатся три направления:

- междисциплинарная исследовательская программа (Programme Interdisciplinaire Recherche — PIR);
- Национальный центр научных исследований (Centre National de la Recherche Scientifique — CNRS) и национальная химиотека: 40000 молекул;
- химиотека жизненно важных молекул: 800 молекул.

В процессе скрининга молекул во Франции используются четыре вида платформ: биотехнологические платформы, платформа просеивания, фенотипическая платформа, платформа ADMET. Их конечной целью является научная и производственная оценка перспективности медицинского применения.

Методы высокопроизводительного скрининга основаны на комплексном использовании подходов и методов. Осуществляются четыре типа скрининга: микроаналитический, виртуальный, биохимический, клеточный. Среди методов — иммуноанализ, масс-спектрометрия, двугибридная система, количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР), микроанализ, геномика, протеомика, метаболомика и др. Нароботка лекарственных препаратов производится из натуральных продуктов или путем химического синтеза. В целом методология базируется на достижениях химической биологии и так называемой «покетомики» («pocketomics» — от «pocket»: карман, мешок, гнездо).

Исследователи Payne D.J. et al. (2006) в журнале «Nat. Rev. Drug Disc.» привели интересные данные о высокопроизводительном скрининге антибактериальных агентов. Так, например, компания GlaxoSmithKline (GSK) за период 1995–2001 гг. осуществила 70 HTS-скринингов, из них 67 с использованием мишень-ориентированных и 3 — клеточных подходов. Только в пяти случаях был достигнут позитивный результат, то есть подобрана 1 подходящая молекула-кандидат на 14 HTS; причем, ни одного подходящего кандидата против РВР-2' (пенициллин-связывающего белка) *Staphylococcus aureus*.

Другие компании в 1996–2004 гг. провели 125 HTS-скринингов 60 различных антибактериальных

мишеней. Оказалось, что не было обнаружено новых молекул для портфеля антибактериальных препаратов, предназначенных для промышленного производства. Авторы исследования делают заключение о том, что перспективных молекул-кандидатов, предложенных за 4 года, больше, чем за предыдущие 20 лет.

На основании анализа классического скрининга можно сделать обобщающие выводы:

- важно не количество молекул в химиотеке, а число потенциальных фармакофоров;
- степень чистоты синтезированных молекул определяет качество химиотек и достоверность обнаружения активной молекулы, специфической к данной мишени;
- частой причиной неправильной интерпретации результатов является агрегация малых молекул в растворе, провоцирующая локальное повреждение белка-мишени;
- необходим учет экономических и экологических факторов, в том числе возможность масштабного синтеза, и стоимость конечной молекулы;
- обязательно предвидение побочных эффектов на обработанные клетки, ткани, на организм в целом.

При создании новых лекарственных препаратов рассматриваются три варианта взаимодействия «покетомики» и эффективности лекарств:

1. Лиганд-связывающий сайт с лекарственной эффективностью (здесь имеется карман на белковой поверхности, который высокоаффинно и специфично связывается с малыми, подобными лекарствам молекулами).
2. Сайт-ловушка — карман на белковой поверхности, который идентифицируется с помощью компьютерной техники и не соответствует известному лиганд-связывающему сайту(ам).
3. Лиганд-несвязывающий сайт — карман на белковой поверхности, который не может высокоаффинно и специфично связываться с малыми, подобными лекарствам молекулами.

Надежным способом прямого обнаружения кандидатов на лекарства служит масштабный скрининг библиотек химических соединений (химиотек) на чипах для выявления молекул с терапевтическим эффектом.

Согласно данным Uttamchandani M. et al., 2006 — журнал «Mol. BioSyst.», существуют три метода приготовления чипов малых молекул:

- прямая иммобилизация,
- фотоактивация,
- синтез in situ.

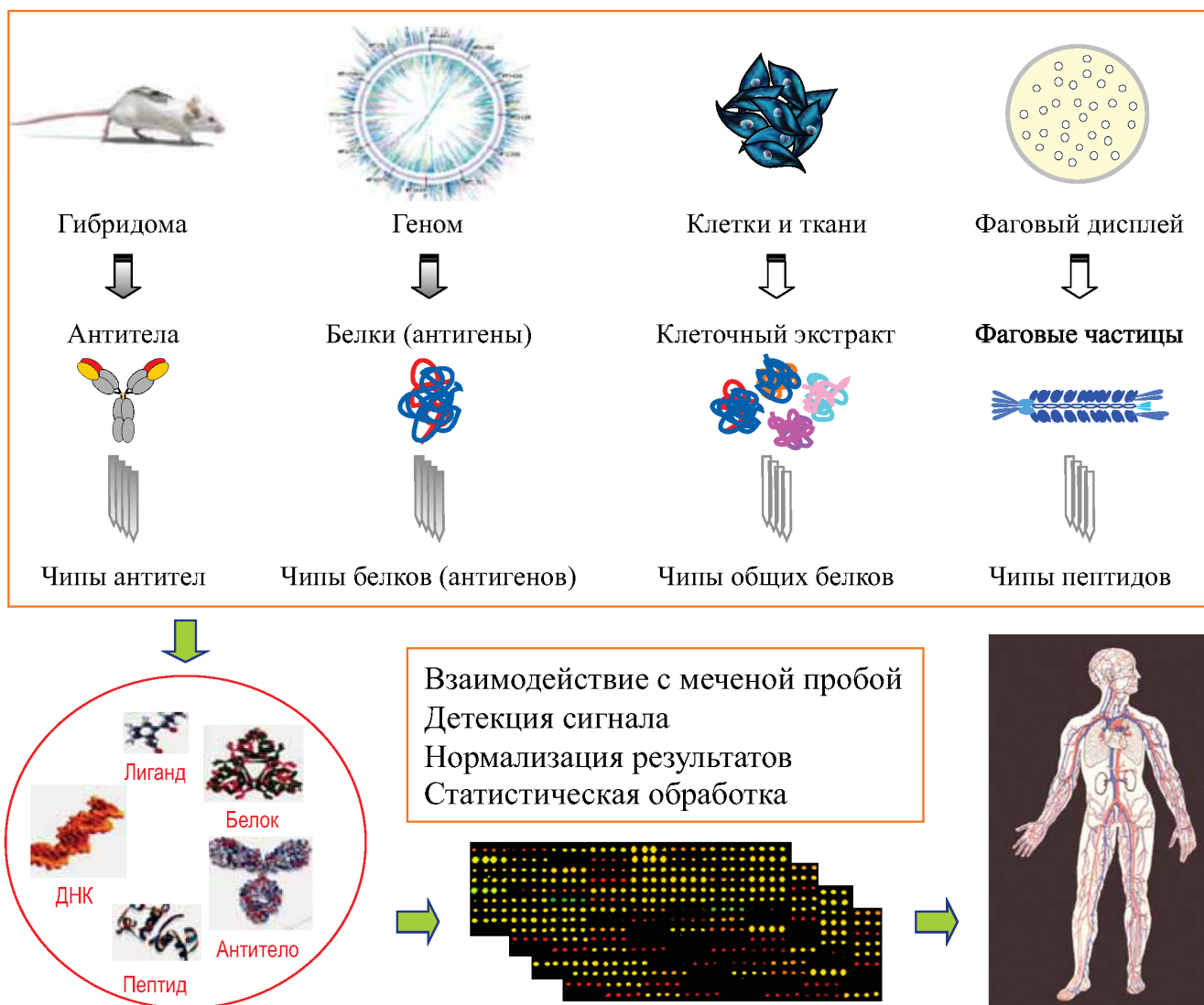


Рис. 1. Технология белковых чипов

Процедура использования чипов малых молекул проходит в несколько этапов. Так, при изучении внеклеточной части белков ErbB осуществляется метка флуоресцентным красителем околоинфракрасного спектра (800 нм), проводятся неконкурентный и конкурентный анализ, нормализация и анализ.

При поиске антибактериальных молекул применяют флуоресценцию в околоинфракрасном спектре (700–800 нм). Мишень — каталитический сайт РВР (penicillin binding proteins). Здесь проводится иммобилизация молекул, при этом возможно прямое обнаружение взаимодействующих молекул, обеспечивается чувствительность детекции. В целом это универсальный и дешевый метод скрининга.

При поиске противоопухолевых молекул-кандидатов мишенью служит интерфейс белок — белок рецепторов ErbB.

Общая схема технологии белковых чипов представлена на рисунке 1.

Комплексное использование биочипов, биологического скрининга и подходов фармкомпаний DDD дает возможность получить следующие результаты:

- осуществить анализ химиотек и отбор молекул;
- улучшить молекулы-кандидаты;
- определить эффект молекул: профиль экспрессии и формирования белков;
- обеспечить поиск биомаркеров;
- определить токсичность лекарственных средств;
- оценить иммунный ответ;
- проводить поиск вакцин.

Биочип-платформа для программ компаний DDD состоит из этапов выделения и очистки белков, биоконъюгации, неконкурентного и конкурентного связывания, нормализации и анализа.

При сравнении биочипов и экономики проектов DDD достигаются такие результаты:

- сокращение длительности этапов открытия лекарств от скрининга химикатов до оптимизации молекул-кандидатов;
- предсказание токсичности молекул-кандидатов на ранних этапах проекта до предклинических испытаний;
- замена модели животных на подходы *in vitro*;

- фармакогеномика и фармакопротеомика при клинических испытаниях разработанных лекарственных препаратов;
- снижение затрат на разработку лекарства, повышение рентабельности проектов DDD.

Материалы доклада на II Международном конгрессе «ЕвразияБио-2010» (Москва, 12–15 апреля 2010 г.)

THE SYSTEM OF BIOLOGICAL SCREENING IN FRANCE: STRATEGIES AND TRENDS

VEHARY SAKANYAN

ProtNeteomics and University of Nantes, France

The data of the French specialists in the development of new drugs using biological screening are presented.
Keywords: drug discovery and development, biological screening.

БИОТЕХНОЛОГИЯ В ИТАЛИИ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ, В ОСОБЕННОСТИ В ОБЛАСТИ БЕЛОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

ФАБИО ФАВА^{1*}, ЛЕОНАРДО САНТИ²

¹ Болонский университет, Болонья;

² Национальный комитет биобезопасности, биотехнологии и наук о жизни
при председателе Совета министров Италии, Рим, Италия

Проводится анализ биоиндустрии в Италии. Акцент делается на состояние и перспективы развития белой биотехнологии, в том числе на основе платформы «ITSusChem», разработанной компанией SusChem во взаимодействии с другими фирмами, междууниверситетскими консорциумами, научными ассоциациями, финансовыми структурами. Осуществляется прогноз развития данного направления до 2020 года.

Ключевые слова: биотехнология, программы развития, Италия.

Согласно данным Blossom & Company, *Biotechnology in Italy, The Financial Perspective (2009)*, в итальянской биотехнологической промышленности в 2005–2008 гг. работало 260 компаний, что примерно в 5 раз превышает уровень 1981–1985 гг. (всего 49). Из них предоставлением услуг и производством оборудования занимаются 70% компаний, а научными разработками в области биотехнологии — 30%. В стране ныне существует 16 биотехнопарков и несколько научно-исследовательских центров. Примечательно, что около 80% промышленных предприятий, технопарков и научно-исследовательских центров находятся в Северной Италии.

Из общего количества биотехнологических бизнес-структур 86% составляют малые и средние предприятия, то есть те, в которых трудятся менее 250 человек. Общий товарооборот в них за год — 27 млн. евро. Что касается распределения по секторам биотехнологии, то в медицине функционируют 73% предприятий, в сельском хозяйстве — 14%. Вопросами охраны окружающей среды занимаются 9% компаний, биоинформатики — 4%.

Число лиц, работающих в сфере биоиндустрии, в 2008 году было равно приблизительно 41000 (в обла-

сти научных исследований — 8850). На долю крупных, средних и малых предприятий в 2008 году приходилось — 14500 млн. евро товарооборота (данные Blossom & Company — CRESIT 2009).

В настоящее время в Италии ряд отраслей промышленности требует внедрения инновационных подходов. Среди них: 1) химическая промышленность, в которой в 2008 году товарооборот был 57000 млн. евро, число компаний — 3600, количество работников — 125900; 2) текстильная промышленность (та, в которой используются химические волокна и продукты) — в ней в 2006 году товарооборот был 5000 млн. евро, число компаний — 6385, количество работников — 37000. На оба сектора отрицательно влияют низкая экологическая устойчивость, высокая стоимость производства, низкий рост рынка и нестабильность покупателей. Они нуждаются в инновациях, чтобы сохранялись их устойчивость, портфель продуктов и конкурентоспособность.

Пищевая промышленность (второй индустриальный сектор в Италии, с товарооборотом 115000 млн. евро, 36000 малых и средних предприятий и 390000 занятых на производстве) нуждается в решениях, направленных на улучшение ее устойчивости, то есть в разработке стратегий валоризации 25 млн. тонн/год побочных продуктов, излишков, отходов и стоков.

Следует подчеркнуть потенциальные возможности белой биотехнологии (ББ). ББ использует ферменты и/или микроорганизмы в биореакторе для производства следующих продуктов:

- некоторые обычные химические препараты и материалы (например, ванилин, цефалексин, полиэфир)

© 2010 г. Фабио Фава, Леонардо Санти

* Автор для переписки:

Fabio Fava

Ph.D., Professor of Industrial & Environmental Biotechnology,
Coordinator of the Industrial Biotechnology section of IT-SusChem
Faculty of Engineering. Alma Mater Studiorum — University
of Bologna, DICASM, Via Terracini, 28, I-40131. Bologna, Italy
E-mail: fabio.fava@unibo.it

и т.д.), получаемые с помощью технологий с большей устойчивостью, то есть с уменьшением потребления энергии и воды, генерации отходов и CO₂;

- новые соединения, не получаемые химическим путем (например, хиральные соединения, новые I и II метаболиты, гормоны, вакцины и др.);

- ряд химических препаратов биологического происхождения, материалы и топливо из биомассы, которые уменьшают зависимость современной индустрии от дорогостоящих и загрязняющих минеральных источников.

Таким образом, ББ вносит значительный вклад в повышение стабильности и конкурентоспособности современной химической, текстильной и энергетической промышленности. Кроме того, если побочные продукты, отходы, остатки и сточные воды пищевой промышленности адаптируются к проблеме пищевого сырья, то это обеспечивает также решение проблемы устойчивости пищевой индустрии.

Итальянская компания «SusChem» разработала платформу «ITSusChem» подъема белой биотехнологии в Италии. Платформа была поддержана в марте 2008 года при содействии CRUT в сотрудничестве с Federchimica, Assobiotec, Federambiente, CNR, ENEA, S.R.A., SCI, девяти межвузовских консорциумов, несколько ассоциаций, центров превосходства, банков и т.д.

В платформе дается анализ ББ-индустрии в Италии. Рассмотрено 44 предприятия, из них малые и средние предприятия — 70%, дочерние компании — 15%. 80% предприятий производят монопродукты, с небольшим числом работников, занятых научными исследованиями. 75% предприятий расположены в Северной Италии. Сектор ББ в Италии фрагментирован: производятся ферменты/микроорганизмы (16%), биотопливо (18%), биопластики (10%), тонкая химия (42%). Однако отмечается значительный рост количества компаний, занимающихся научно-исследовательскими работами. Некоторые национальные SpA компании (например, Novamont, ENT, Mossi Ghisolfi и др.) постепенно внедряют в свои производства биотехнологические ноу-хау.

В Италии реализуются около 130 научно-исследовательских проектов (Research & Development — R&D) в области ББ. Из них 95% представляют собой национальные проекты, 5% — проекты ЕС (COST, LIFE, IP и др., FP5 и FP6). 80% национальных биотехнологических проектов финансируются через государственные фонды (90% средств поступает от министерств — через PRIN, FIRB, FISIR, POR, CNR, 10% — от регионов), а 20% — через частные фонды.

Исследовательские проекты сгруппированы в пять направлений:

- новые или улучшенные биокатализаторы и/или биореакторы/биопроцессы (29,2%);

- новые стратегии и инструменты для интегральной валоризации (с использованием biorefinery) биомассы и побочных продуктов, отходов, стоков и остатков пищевой индустрии (16,7%);

- производство тонкой химии, метаболитов, ароматизаторов, гетерологических белков, ферментов и микробов (включая пробиотики) (25%);

- биополимеры и волокна из биомассы и побочные продукты пищевой индустрии (16,7%);

- производство биогаза, биоэтанола и биодизеля из биомассы и побочных продуктов, отходов, стоков, остатков пищевой промышленности (12,5%).

В платформе содержится стратегия научных исследований для подъема сектора белой биотехнологии в Италии. На основе особенностей итальянского сектора ББ, социоэкономических потребностей страны и приоритетов научных исследований в области ББ, определенных на уровне ЕС, для сферы белой биотехнологии в Италии избраны такие направления, в которые будут вкладываться ресурсы:

- развитие новых/улучшенных промышленных биокатализаторов и биопроцессов для национальной химической индустрии с целью производства инновационных и/или более чистых, безопасных, экономически более эффективных продуктов;

- развитие инновационных/улучшенных интегративных стратегий/(био)процессов — концепция biorefinery — для валоризации национальной биомассы и побочных продуктов, отходов, остатков, сточных вод сельскохозяйственной и пищевой индустрии;

- развитие новых знаний/биопроцессов для производства биоалкоголя и улучшения существующих технологий производства биометана из национальной биомассы и побочных продуктов, отходов, остатков и сточных воды агропромышленности.

Платформа «IT-SusChem» подчиняется: 1) главным итальянским министерствам и научным управлениям; 2) некоторым DGs (Department of General Services) Европейской комиссии, ETP-SusChem и связанным ETPs (European Technology Platforms).

При реализации указанной платформы предусмотрено взаимодействие с другими итальянскими технологическими платформами, осуществляемыми в рамках биоэкономики, основанной на знаниях, — Knowledge Based BioEconomy (KBBE). В их число входят: ITP

GAH, ITAPABRE, Forest-Based Sector: Technology Platform Italia, BIOFUELS ITALIA, Italian Food for Life, Italian Technology Platform: Plants for the Future.

Материалы доклада на II Международном конгрессе «ЕвразияБио-2010» (Москва, 12–15 апреля 2010 г.)

BIOTECHNOLOGY IN ITALY: STATE-OF-THE-ART AND PROSPECTS, IN PARTICULAR IN THE AREA OF WHITE BIOTECHNOLOGY

FABIO FAVA¹, LEONARDO SANTI²

¹ University of Bologna;

*² National Committee for Biosafety, Biotechnology and Life Sciences
of the Italian Presidency of Council of Ministers, Roma, Italy*

The analysis of bioindustry in Italy. Emphasis was placed on the state and prospects of white biotechnology, including those based on the platform «ITSusChem», developed by SusChem in collaboration with other firms, inter-university consortia, scientific associations, financial institutions. The predicting the development of this area until 2020 was given.

Keywords: biotechnology, development programmes, Italy.

РЫНОК БИОПЛАСТИКОВ – ТЕКУЩАЯ СИТУАЦИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ (PRO-VIP 2009)

ЛИ ШЕН, МАРТИН ПАТЕЛЬ*

Институт Коперника, Утрехтский университет, Нидерланды

Обзор современного состояния рынка биопластиков в мире. Приводятся сводные статистические данные по объемам производства различных видов биопластиков и географическому распределению этих производств. Анализируется динамика рынка биопластиков на протяжении последнего десятилетия и дается прогноз его развития на период до 2020 года.

Ключевые слова: биопластики, мировой рынок, обзор, прогноз.

В настоящее время ежегодное производство биомассы в мире составляет 170×10^9 метрических тонн ($1 \text{ т} = 1000 \text{ кг}$), из них человеком используется 6×10^9 т в год. В пределах последней величины 62% идет на пищу, 5% предназначено для непищевого применения (одежда, химические препараты), а остальные 33% — это древесина для производства энергии, бумаги, мебели и строительства.

В работе будут рассмотрены место и значение биопластиков. Биопластики определяются как произведенные человеком органические макромолекулы, происходящие из биологических источников и используемые для изготовления пластика и волокон (без бумаги и дерева).

На рисунке 1 приведены данные о биodeградируемости различных полимеров (пластиков).

В мире производится 20 млн. т биопродуктов, из них 75% — полимеры из крахмала (непищевые, нетопливные), 20% — целлюлозные полимеры, 5% — алкидные полимеры. Для сравнения: мировой объем продукции из бумаги и дерева составляет 365 млн. т, а биопластиков — всего 0,36 млн. т (это данные 2007 года). То есть последние находятся на начальных стадиях развития. Информация приведена на основании следующих источников: статистика FAO (2008), AAF (2009), CIRFS (2008), обзор компании «Ерпое» и др.

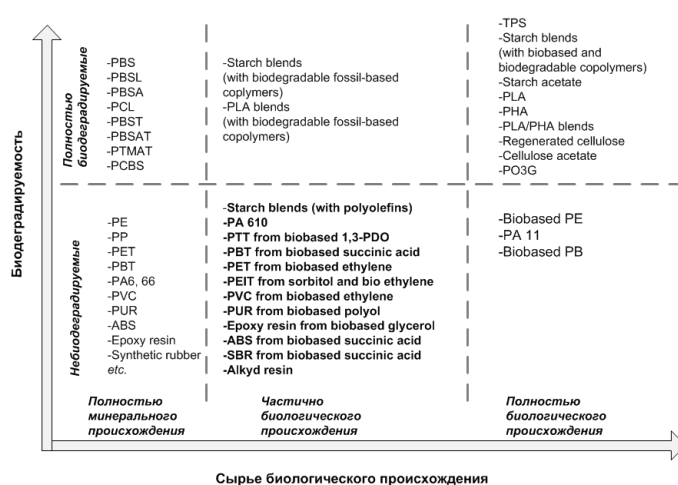


Рис. 1. Сравнительный анализ биodeградируемости разных полимеров

Представляет интерес сравнительный анализ объема производства биопластиков в 2003 и 2007 гг. В 2003 году их было произведено 100 килотонн, включая пластики из крахмала (25%) и полимер PLA (76%). В 2007 году объем биопластиковой продукции возрос до 360 килотонн. Соотношение различных видов биопластиков представлено на рисунке 2 (2007 г.).

Существуют статистические данные и по географическому распределению в динамике между 2003 и 2007 гг. Если в 2003 году из 0,1 млн. т биопластиков 84% производилось в США, 15% — в Европе, 1% — в Азиатско-Тихоокеанском регионе, то в 2007 году из мирового объема 0,36 млн. т в США стали выпускать 33% биопластиков, в Европе — 36%, в Азиатско-Тихоокеанском регионе — 29% и появился новый производитель — Южная Америка, на долю которой пришелся 1% продукции.

Специалистами в последнее время проведены расчеты технических возможностей замещения произ-

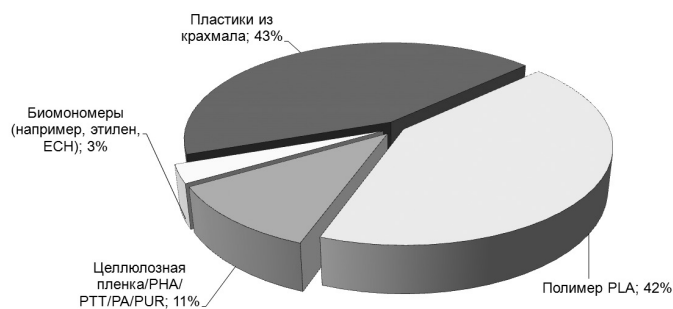


Рис. 2. Соотношение объемов производства разных биопластиков в 2007 г.

видимых сейчас полимеров их аналогами биологического происхождения. Общая величина ежегодного потребления полимеров в мире составляет — 230 млн. т (по данным 2000, 2004, 2007 гг.). Технический потенциал замещения биополимерами — 205 млн. т в год, то есть 90%. Конкретные данные по отдельным полимерам помещены в таблице 1.

Имеются данные и по техническому потенциалу замещения применительно к волокнам (табл. 2).

Из таблицы 2 видно, что общий объем ежегодного потребления волокон в мире равен примерно 41 млн. т (данные 2007 г.). Такой объем может быть замещен волокнами биологического происхождения в размере — 35,5 млн. т (то есть на 87%).

Проекты, основанные на обзоре компании «Ерпое» и сценариях PRO-BIP 2009, включают в себя:

- сбор данных: опросник, открыто доступные объявления компании, личные сообщения;
- сбор информации по проектам:
- проект, основанный на «Сообщениях компании»;
- проект, основанный «Прогнозах компании»;
- проекты, основанные на наших собственных сценариях: PRO-BIP 2009 BAU, HIGH и LOW сценарии.

Таблица 1

Потенциал замещения обычных полимеров биопроизводными (тыс. т)

	PE-LD	PE-HD	PP	PVC	PS	PET	PUR	PA	ABS'	PC	PBT	PMMA
Общее потребление	37100	30700	44900	35280	16105	15498	12285	2730	7455	3150	954	1400
Технически замещаемые объемы	37100	30700	44900	35280	7731	15498	12039	1911	7455	630	954	266

Таблица 1 (продолжение)

	Другие полиакрилаты	Эпоксидные смолы	Синтетический каучук	Другие	Всего	% замещения
Общее потребление	660	1150	10889	6930	227186	100
Технически замещаемые объемы	660	863	8711	0	204698	90

Таблица 2

Потенциал замещения традиционных волокон биопроизводными (тыс. т)

	PET	PA	Акрилаты	Другие синтетики	Целлюлозные	Всего	% замещения
Мировое потребление волокон в 2007 г. *	30804	3836	2407	575	3081	40703	106
Технически замещаемые объемы	30804	3836	361	0	462	35463	87

* Источник: JSTA (2008)

Прогноз о перспективах производства биопластиков до 2020 года, основанный на сообщениях компании, дает цифру 3,45 млн. т в год (промежуточные значения обозначаются для 2009 года — около 0,9 млн. т, для 2013 года — около 2,3 млн. т). Во всех предсказываемых ежегодных объемах преобладают биопластики из крахмала, полимеры PLA, PHA, биоэтилен.

Составлен прогноз и по географическому распределению ежегодного производства в 2020 году (рис. 3).

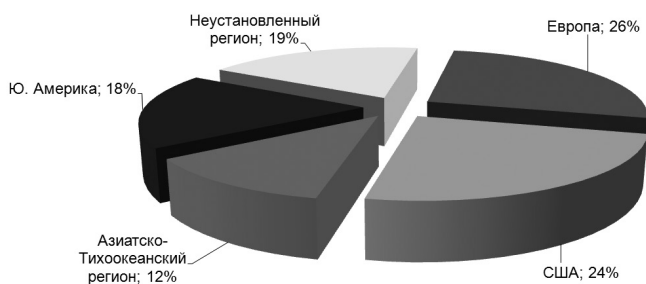


Рис. 3. Географическое распределение производства биопластиков в 2020 году (прогноз)

Согласно сценариям PRO-BIP 2009, даются такие прогностические рекомендации. В качестве ключевых факторов, влияющих на развитие производства биопластиков, рассматриваются: технические барьеры, объем потребления, конкурентная стоимость, доступность сырьевого материала. В качестве приоритетных

биопластиков названы крахмал, PLA, биополимер PE, эпоксидные смолы биологического происхождения. Выдвигаются три сценария развития производства биопластиков:

- BAU — Business-as-usual, стабильный рост;
- HIGH — значительный быстрый рост;
- LOW — умеренный рост.

В целом прогнозы, предложенные разными коллективами, примерно совпадают и свидетельствуют о привлекательности рынка биопластиков.

Таким образом, резюмируя все вышесказанное, надо обратить внимание на следующие существенные факты:

- биопродукты являются перспективным направлением;
- технический потенциал замещения обычных полимеров биопластиками (включая волокна) составляет 90% (≈ 240 млн. т);
- динамика роста объема производства биопластиков такова: 2003 г. — 0,1 млн. т; 2007 г. — 0,36 млн. т; 2020 г. — 3,0–3,5 млн. т;
- наиболее значимые биопластики: пластики из крахмала, PLA, биополимер PE, эпоксидные смолы.

Материалы доклада на II Международном конгрессе «ЕвразияБио-2010» (Москва, 12–15 апреля 2010 г.)

BIOPLASTICS MARKET – CURRENT SITUATION AND PROSPECTS (PRO-BIP 2009)

LI SHEN, MARTIN PATEL

Copernicus Institute, Utrecht University, Netherlands

Review of bioplastics market in the world. Provides summary statistics on the volume of production of various types of bioplastics and geographical distribution of these industries. The dynamics of bioplastics market in the last decade, and given a forecast of its development up to 2020.

Keywords: bioplastics, a global market, survey, forecast.

ОСНОВАННЫЙ НА БИОВОДОРОДНОЙ ЭНЕРГИИ САМОДОСТАТОЧНЫЙ ПОДХОД К СОЗДАНИЮ АВТОНОМНОГО ДОМА

ШАНГ-ЮАН ЧЕН*

*Департамент архитектуры, Исследовательский центр энергии и ресурсов
имени профессора Чию-Юэ Лина, Фэнг Chia Университет, Тайвань*

Рассматривается вопрос о технологии создания и эксплуатации автономного дома, основанной на использовании биоэнергетики (биоводорода). Концепция такого дома базируется на принципах: применение альтернативной энергии, обеспечивающей самодостаточность; на компьютеризированном энергетическом контроле для поддержания благоприятной среды обитания; на включении в конструкцию активных архитектурных элементов с целью исправления ряда недостатков пассивных домов.

Ключевые слова: автономный дом, биоэнергетика, биоводород.

Сообщение состоит из трех частей: 1) введение в проблему автономного дома; 2) исследовательские группы по биоводороду в Тайване; 3) описание автономного дома.

Во вводной части необходимо осветить возможности современной зеленой энергетической технологии для реализации основанного на биоводородной энергии самодостаточного подхода. Речь идет об идее так называемого «автономного дома». Она особенно актуальна в связи с парниковым эффектом и глобальным энергетическим кризисом, поскольку использование достижений зеленой технологии снижает экологическую нагрузку, дает возможность получать автономную энергию, что-бы создавать устойчивую, удобную жилищную среду. Указанный дом характеризуют две главные особенности:

- самодостаточный энергетический цикл;
- автономный энергетический контроль для поддержания благоприятной среды обитания.

Автономный дом сочетает в себе энергосберегающий, уменьшающий выделение углерода пассивный дизайн с активными элементами для поддержания комфортной окружающей среды.

Настоящее сообщение пропагандирует основанный на биоводородной энергии автономный дом, потребляющий альтернативную энергию, в сочетании с датчиками окружающей среды, компьютерными технологиями и активными

архитектурными элементами для исправления некоторых из функциональных недостатков пассивных домов.

Во второй части сообщения приводятся данные о научно-исследовательских группах в Тайване, разрабатывающих проблему биоводорода. В них входит научный коллектив Фэнг Chia Университета (FCU), работающий в тесном контакте с группами NCKU и NCHU. Среди исследователей, занимающихся биоводородом, следует особо отметить профессора Чию-Юэ Лина, работающего на кафедре инжиниринга окружающей среды Фэнг Chia Университета.

Центральным направлением деятельности указанной главной научной группы является анаэробная ферментация для выработки биоводорода. Организационной формой служат три секции, каждая из которых занимается самостоятельной темой и которые вместе охватывают всю последовательную цепь анаэробной ферментации при генерации БиоН₂. Секцией А «Технология обогащения культур» руководит профессор Чию-Юэ Лин (Lin C.Y.), секцией В «Высокоскоростной трехфазный реактор» — профессор Ву и Пинг-Джей Лин (Wu Sh.Y., Lin P.J.), секцией С «Молекулярно-биологические технологии» — профессор Ханг (Hung C.H.) К числу реальных практических достижений этой группы следует отнести разработку высокоскоростной темновой пилотной системы для производства биоводорода, которая является базовым узлом автономного дома.

Третья, основная часть сообщения посвящена подробному изложению механизмов функционирования и структуры автономного дома. Как уже отмечалось выше, в этом доме осуществляются две главные функции:

- цикл самодостаточности, основанный на технологии производства биоводорода CSABR

© 2010 г. Шанг-Юан Чен

* Автор для переписки:

Shang-Yuan Chen

Assistant Professor, Department of Architecture
and Prof. Chiu-Yue Lin's Research Center

for Energy & Resources,

Feng Chia University, Taiwan

(Continuously Stirred Anaerobic Bioreactor) и на двустадийной системе анаэробной ферментации биомассы;

- автономный энергетический контроль, обеспечиваемый тепловой вентиляционной башней.

Автономный дом представляет собой строение, которое может функционировать независимо от поддержки и служб общих систем жизнеобеспечения.

В архитектурном аспекте «автономия» выражается в самодостаточности и автономном контроле.

На макроуровне автономный дом базируется на трех функциональных блоках: архитектурный дизайн, устойчивое окружение, энергообеспечение.

Микроэлементы автономного дома проецируются на данные блоки и включают в себя: автономное окружение; автономное жизнеобеспечение; автономный дом (принципы пассивного дизайна, активное оборудование). Цикл самодостаточности обеспечивается такими элементами, как преобразование и форма энергии (энергия и деятельность, соответствие между входом и выходом, методы эксплуатации); система поддержки здания; технико-экономическая оценка. Устойчивое окружение и энергообеспечение опираются на следующие элементы: зеленая энергия (солнечная энергия, энергия ветра, энергия биомассы, гидроэнергия, интеграция); видение и цели; факторы выбора; технико-экономическая оценка.

В автономном доме, основанном на биоводороде, должен осуществляться самодостаточный цикл, включающий в себя выработку энергии, ее накопление, контроль распределения, энергопотребление, кругооборот (recycling), удаление отходов, повторное использование. Общая схема этого процесса, создающего систему поддержки всего здания, представлена на рисунке 1.

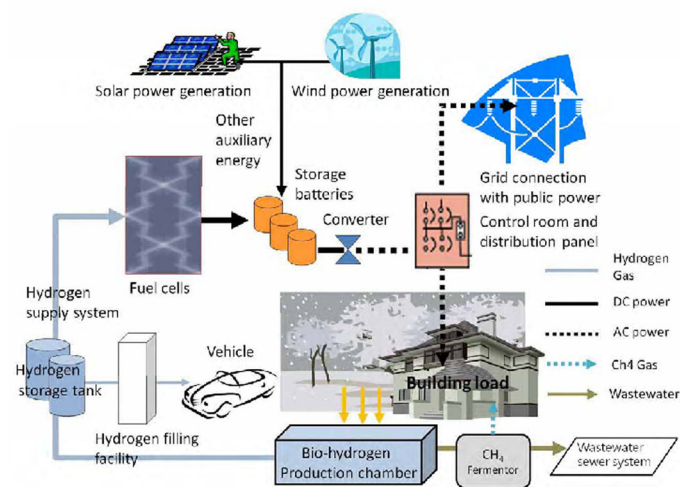


Рис. 1. Система поддержки автономного здания

Технология получения биоводорода использует систему CSABR. Она прошла десятилетний период совершенствования: от экспериментального образца объемом 150 мл в 1998–2000 гг. к высокоскоростному реактору по производству БиоН₂ объемом 10 л в 2005 году вплоть до пилотной системы объемом 400 л в 2008 г. Последняя и является ключевой структурой автономного дома.

Сырьем для производства биоэнергии служит пищевой материал (гексоза, сахароза, крахмал, зерно) и непищевые материалы (органические сточные воды, сельскохозяйственные отходы, другие материалы). Ведется постоянный поиск более дешевых и высокоэффективных биоэнергетических технологий с большим объемом и скоростью наработки биотоплива. Схема пилотной системы темновой ферментации для получения биоводорода изображена на рисунке 2.

Общий вид данной системы в натуре приведен на фотографии (рис. 3).

В предлагаемой системе важным узлом является линия для получения электричества из биоводорода с помощью топливных элементов (fuel cells) на установке темновой ферментации сахарозы (рис. 4).

На приведенной на рисунке 4 схеме видны три блока: I – система производства биоводорода, II – блок очистки Н₂, III – блок топливных элементов.

При технико-экономической оценке описанного проекта автономного дома для отдельной семьи на первый план выходит определение уровня энергопотребления. Показано, что при инсталляции вышеуказанной системы генерации биоводорода в доме нужно достигнуть мощности 3 кВт, что удовлетворит все потребности жизнеобеспечения. Из статистических исследований в Тайване известно, что за последние пять лет для энергообеспечения одного домашнего хозяйства в среднем необходимо было выделять 3–4 кВт. Было рассчитано, что производящий БиоН₂ танк для ферментации объемом 3,2 м³ может выработать 3 кВт электроэнергии.

Оборудование для производства биоводорода состоит из пяти главных компонентов: субстратный танк, питательный танк, ферментатор, сепаратор и очиститель. Их объемы образуют пропорцию 2:2:1:1:1, соответственно. Отсюда минимальный объем помещения, необходимого для всей установки, должен быть в 7 раз больше такового ферментатора, то есть 3,2 × 7 = 22,4 м³. В свою очередь, площадь помещения должна быть порядка 15 м² из расчета вертикального клиренса 2,5 м. Вместе с проходами и другим оборудованием общая площадь помещения для биоводородной установки составляет примерно 20 м².

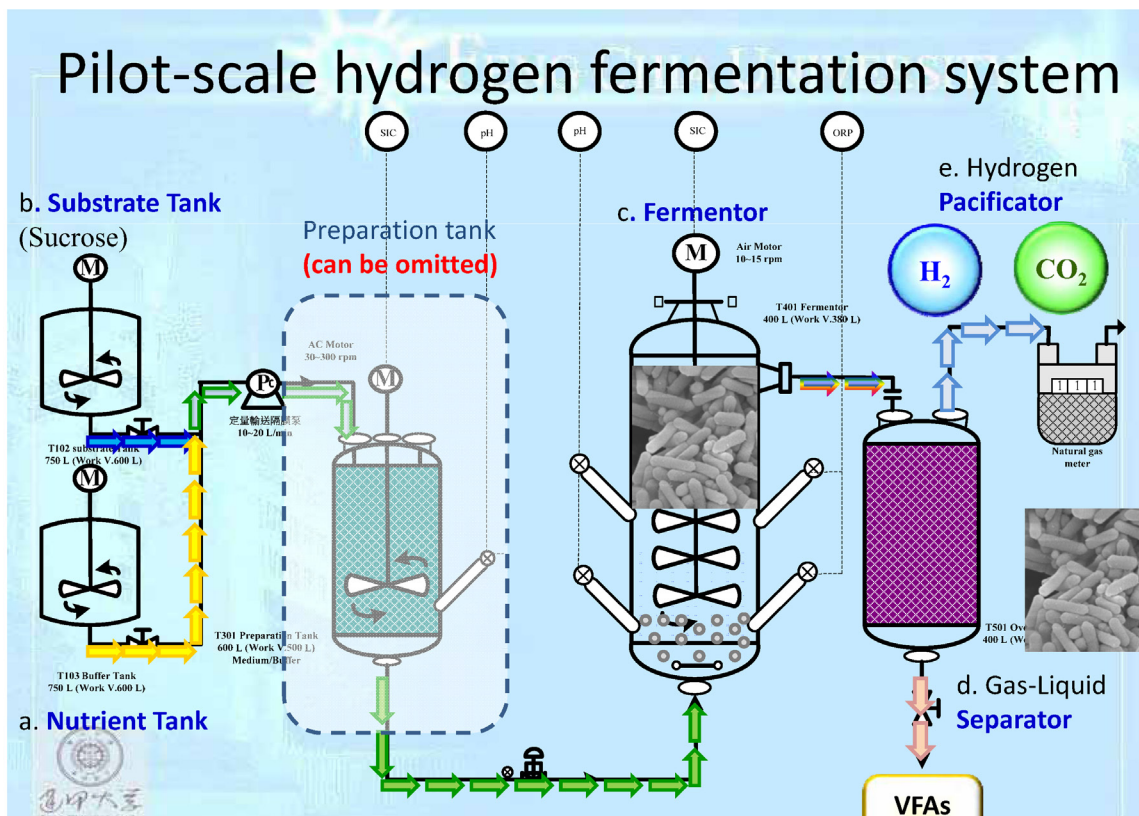


Рис. 2. Пилотная система для производства биоводорода



Рис. 3. Общий вид пилотной системы для производства БиоH₂

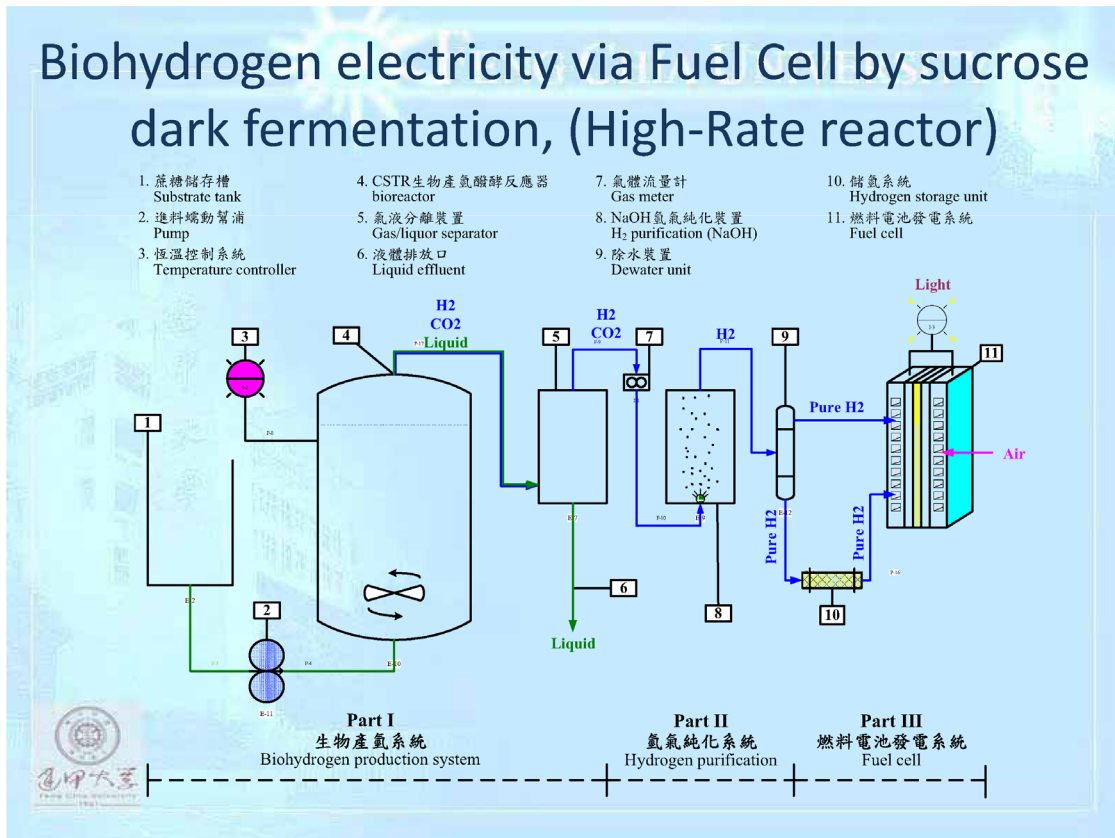


Рис. 4. Схема получения электричества из БиоН₂ с помощью топливных элементов

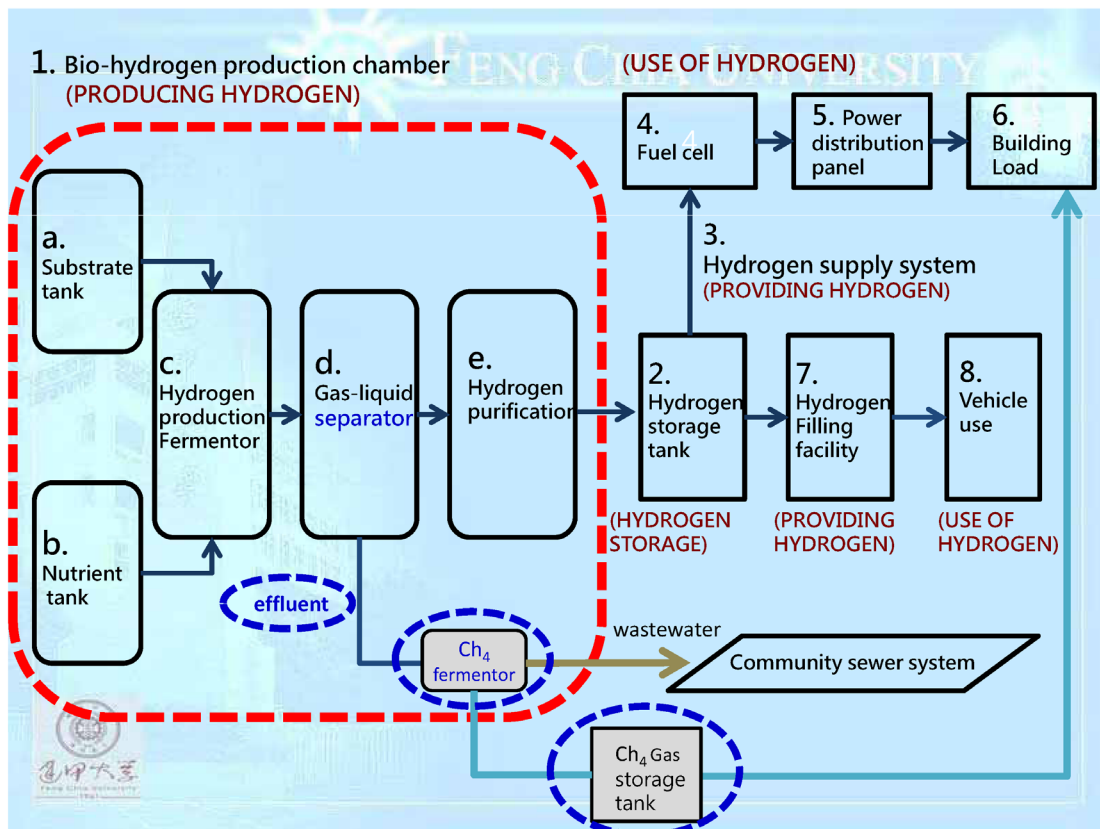


Рис. 5. Схема очистки сточных вод в автономном доме

Другие расчетные объемы оборудования для автономного дома таковы. Коммерческий аппарат с топливными элементами на 3 кВт имеет объем 0,33 м³. Танки для хранения биоводорода, генерированного в течение трех дней, занимают объем 1,68 м³. Количество накапливаемого сырья составляет около 76 кг сахарозы в день на одно хозяйство (дом).

Одним из значимых элементов автономного дома является система деградации сточных вод, которая также включена в энергетический цикл домашнего хозяйства. Для этих целей применяется метановый ферментатор, способный осуществить снижение органических примесей в сточных водах на 95%, что определяется по уровню биологического потребления кислорода (БПК). Использование такого подхода дает возможность снизить БПК до величины менее 500 мг/л. Обычные значения БПК в общей системе необработанных сточных вод — 300–500 мг/л. Схема данного процесса изображена на рисунке 5.

Благодаря такому подходу достигается двоякая цель: с одной стороны, проводится очистка сточных вод автономного дома и слив их в общую канализационную систему, а с другой — выработанный метан из стоков может быть использован для нужд поддержки здания.

В заключительной части сообщения будет рассмотрен вопрос об автономном энергетическом контроле. В соответствии с принципами автономии энергии автоном-

ный дом должен наряду с пассивными элементами здания использовать и активные устройства. Последние применяются для улучшения функционирования пассивного здания, повышения качества автономного контроля потребления энергии и поддержания комфортной жилищной среды. С этой целью сконструирована лестничная клетка в виде тепловой вентиляционной башни. На каждом этаже имеется отверстие, соединенное с этой башней и снабженное воздуходвижкой, регулирующей движение теплого воздуха. На вершине башни установлен датчик давления и смонтирован дополнительный вентилятор. С помощью данных приспособлений обеспечивается стабильное положительное давление в башне по сравнению с внешней средой. Несмотря на относительную простоту подобного устройства обеспечение автономного контроля представляет собой довольно сложную задачу в связи со многими факторами: изменение скорости и направления ветра, время года, погода, стихийные бедствия и т.д.

Уже имеются попытки практической реализации вышеизложенных идей и подходов. Так, например, находится в стадии строительства автономный дом доктора Сана (Dr. Sun), которое планируется закончить в 2010 году.

Материалы доклада на II Международном конгрессе «ЕвразияБио-2010» (12–15 апреля 2010 года)

A BIO-HYDROGEN BASED ENERGY SELF-SUFFICIENT APPROACH FOR THE AUTONOMOUS HOUSE

SHANG-YUAN CHEN

*Department of Architecture and Prof. Chiu-Yue Lin's Research Center for Energy & Resources,
Feng Chia University, Taiwan*

The question of technology development and exploitation of autonomous home based on the use of bioenergy (biohydrogen). The concept of this home based on the following principles: an use of alternative energy, ensuring self-sufficiency; a computerized energy monitoring to maintain a favorable habitat; an inclusion of active architectural elements in the construction in order to remedy some shortcomings of passive houses.

Keywords: autonomous house, bioenergetics, biohydrogen.

БИОКАТАЛИЗАТОРЫ ДЛЯ КЛЮЧЕВЫХ СТАДИЙ СОВРЕМЕННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ПРОИЗВОДСТВА САХАРИСТЫХ КРАХМАЛОПРОДУКТОВ

Г.А. КОВАЛЕНКО*

Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН, Новосибирск

Представлены материалы по созданию отечественных производств глюкозо-фруктозных сиропов. Предложен способ «сухой» декстринизации крахмала путем механо-химической активации смеси крахмала с амилазой. Разработаны гетерогенный биокатализатор для стадии осахаривания крахмала «Глюкоамилаза на Сибуните» и гетерогенный биокатализатор для стадии изомеризации глюкозы «Рекомбинантный штамм-продуцент в SiO_2 » (проведены ресурсные испытания в лабораторном масштабе). Предложена схема переработки крахмальной суспензии в патоки различного углеводного состава и сиропы (глюкозные и глюкозо-фруктозные) с участием гетерогенных биокатализаторов и вихревых реакторов.

Ключевые слова: биотехнология, биокатализаторы, сахаристые крахмалопродукты, глюкозо-фруктозные сиропы.

В настоящее время на рынке востребованы следующие продукты из возобновляемого растительного сырья:

- крахмал;
- белок (клейковина, глютен);
- сахаристые крахмалопродукты (патоки различного углеводного состава — карамельная, мальтозная; сладкие сиропы — глюкозный, глюкозо-фруктозный).

Сахаристые крахмалопродукты широко применяются в пищевой промышленности: винодельческая и пивоваренная, спиртовая, продукты «быстрого питания». По данным зарубежных источников, область применения сахаристых крахмалопродуктов такова: безалкогольные продукты — 90–100%, консервы — 70%, кондитерские изделия — 50%, молочные продукты — 35%, продукты хлебопекарной промышленности — 25%.

Нужно указать на то, что в последнее время отмечается значительный рост мирового потребления глюкозо-фруктозных сиропов (рис. 1). В 2010 году будет пройден рубеж более 15 млн. т в год, а в ближайшие годы (2015 г.) — более 18 млн. т.

Крупнейшим производителем и потребителем крахмалопродуктов является США: в этой стране их потребление на душу населения составляет — 50 кг/год. В таких государствах, как Канада, Германия, Франция,

Дания, Нидерланды, Япония, Тайланд, цифра достигает более 20 кг/год. Россия пока имеет величину 0,2 кг/год.

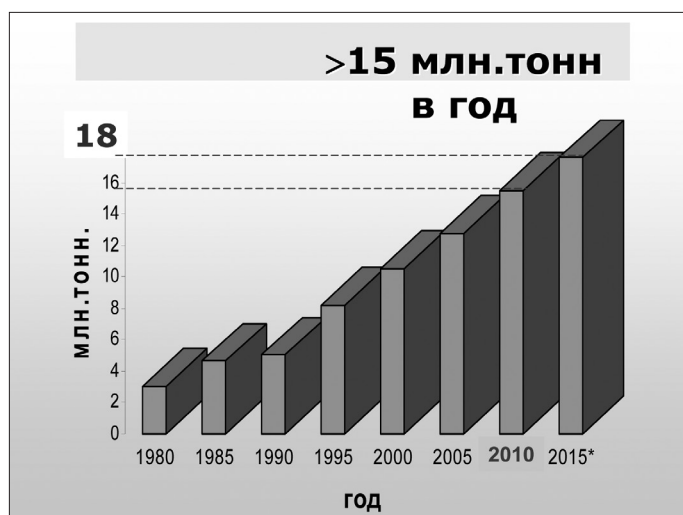


Рис. 1. Рост мирового потребления глюкозо-фруктозных сиропов

ВОЗ одобрен ряд синтетических (интенсивных) подсластителей, К их числу относятся:

- ацесульфам К (коэффициент сладости — в 130–200 раз слаще сахарозы, допустимая суточная норма 15 мг/кг);
- аспартам (в 200 раз слаще сахарозы, норма 40 мг/кг);
- цикламат (в 30 раз слаще сахарозы, норма 11 мг/кг);
- сахарин (в 300–500 раз слаще сахарозы, норма 5 мг/кг);
- сукралоза (в 600 раз слаще сахарозы, норма 15 мг/кг).

Следует подчеркнуть, что в 2005 году на III съезде Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова в Москве была утверждена Национальная программа «Развитие биотехнологии в Российской Федерации на 2006–2015 гг.». В эту программу в число приоритетных проектов (наряду с сохранением коллекций микроорганизмов, производством альтернативного моторного топлива, переводом химической промышленности на возобновляемое сырье) включен проект «Организация производства глюкозо-фруктозных сиропов» из крахмалосодержащего растительного сырья. А в 2008 году на V съезде Общества биотехнологов России была принята «Концепция стратегии развития биотехнологической отрасли промышленности на 2008–2020 гг.», в которой была поставлена конкретная задача к 2020 году достичь уровня производства глюкозо-фруктозных сиропов не менее 1 млн. т (материал размещен на сайте Общества биотехнологов России <http://biorosinfo.ru/Vcongress/Strategia.pdf>).

В развитие данных решений специалисты Новосибирска и других регионов — представители фундаментальной науки (Институт катализа СО РАН), производств, бизнес-структур (ООО «ЛД Сиверс», «ОАО ГПК «Ефремовский», ООО ПО «Сиббиофарм») — выполнили определенную работу теоретического и практического плана с целью создания соответствующих отечественных технологий получения крахмалопродуктов.

Принципы современных технологий получения сахаристых крахмалопродуктов основаны на ферментативном гидролизе и изомеризации, обеспечивающих высокое качество конечных продуктов, отсутствие агрессивных сточных вод, энерго- и ресурсосбережение. Целесообразно напомнить о стадиях технологического процесса.

I стадия — разжижение крахмала (декстринизация). Она представляет собой гомогенную стадию, осуществляемую при температуре 80–90 °C и pH 6–7. Схема I стадии приведена на рисунке 2.

II стадия — осахаривание крахмала (гидролиз декстринов). Это — гомогенная и гетерогенная стадия, идущая при 50 °C и pH 4,5–5. Ее схема дана на рисунке 3. На ее выходе — глюкозные сиропы, глюкоза.

III стадия — изомеризация глюкозы. Она является гетерогенной стадией и реализуется при 60–70 °C, pH 7,5–8. Схема III стадии представлена на рисунке 4. На выходе — β-D-фруктоза.

Ниже будут представлены конкретные научно-технические разработки, вписанные в определенные звенья упомянутой технологической цепи. Надо заметить, что в мире налажено производство гетерогенных

биокатализаторов с глюкозоизомеразной активностью (с большим выходом продукции). Больше всего их производят в Дании NOVOZYME (42%), далее следуют Нидерланды (22%), США (18%). Япония (12%), Финляндия (6%). Наши отечественные возможности ниже.



Рис. 2. I стадия — разжижение крахмала (декстринизация).

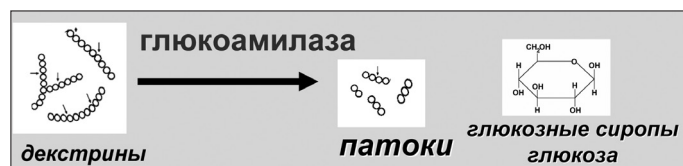


Рис. 3. II стадия — осахаривание крахмала (гидролиз декстринов).

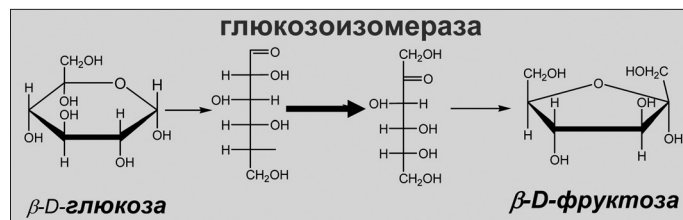


Рис. 4. III стадия — изомеризация глюкозы

Тем не менее авторами под эгидой Института катализа СО РАН налажено производство ферментов для I стадии разжижения крахмала. Это ферментный препарат аминсубтилин, состоящий из α-амилазы (1500), ксиланазы (< 100), β-глюканазы (< 500), целлюлазы (< 30), глюкоамилазы (< 100), протеазы (< 15). Институту предложено способ «сухой» декстринизации крахмала, состоящий из трех этапов:

- смешивание сухого крахмалосодержащего сырья (крахмал, мука, зерно) с сухим ферментным препаратом в дезинтеграторе (механо-химическая активация);
- полученную однородную массу заливают водой и нагревают до 80–85 °C, выдерживают 15–30 мин., кипятят 5 мин.;
- охлаждение полученных декстринов.

Способ защищен патентом РФ. Важным моментом является конструкция и эффективность дезинтегратора. В обсуждаемой работе применялся дезинтегратор производства АО «DESINTEGRAATOR TOOTMISE» (Таллин, Эстония).

Для II стадии осахаривания крахмала разработан биокатализатор, защищенный 3 патентами РФ (зарубежных аналогов нет). Его ключевым действующим агентом является глюкоамилаза на Сибуните «ГЛЮКОСИБ». Создан ферментный препарат «ГлюкоЛюкс», в состав которого входят глюкоамилаза (5000–5500), ксиланаза (≥ 1500), β -глюканаза (< 100), целлюлаза (< 400), α -амилаза (< 150). Этот препарат помещался на различные носители: нанопористые – Сибунит, КВУ, макропористые – сапропель, графит. Наиболее оптимальными свойствами обладает Сибунит.

Для достижения максимальной эффективности процесса биокатализа были апробированы реакторы разных типов: вихревые, роторно-инерционные, вихревые погружные. Эксперименты показали, что при использовании «Глюкоамилазы на Сибуните» в вихревом погружном реакторе обеспечивается продолжительность работы 700 ч ($2 t_{1/2}$); производительность процесса 7,6 кг продукта/час/1 кг катализатора; продуктивность катализатора 5,3 т глюкозы/кг.

Для осуществления III стадии осахаривания крахмала разработан гетерогенный биокатализатор с использованием бактерий в SiO_2 -ксерогеле ИЗО-ГЛЮКСИЛ (защищено 2 патентами РФ). В данном разделе ферментативно-активную субстанцию для приготовления биокатализатора получали из нерастущих клеток штаммов-продуцентов *Arthrobacter nicotianae* БИМ В-5-МГ-1 и рекомбинанта *E. coli* BL21 (DE3)/pET24bхyIA. Эти штаммы были созданы в Институте микробиологии НАН Республики Беларусь. Применяли золь-гель технологии (ксерогель диоксида кремния) включения целых нерастущих клеток микроорганизмов. Таким образом достигался оптимальный состав биокатализаторов на основе иммобилизованных клеток *Arthrobacter nicotianae*:

- микробная биомасса: 10–15%;
- Со в виде C_xO_y : 20–40%;
- SiO_2 : до 100%.

Состав зависит от таксономической принадлежности микроорганизма, используемого для приготовления биокатализатора. Так, при использовании рек-*E. coli* содержание кобальта и двуокиси кремния то же, что и при применении артробактера, только микробная биомасса достигает 40–60%.

В процессе исследования было проведено сравнение различных штаммов-продуцентов *Arthrobacter nicotianae* БИМ В-5-МГ-1 и рекомбинанта *E. coli* BL21 (DE3)/pET24bхyIA (табл. 1).

Таблица 1

Сравнительная характеристика биокатализаторов

	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	рек- <i>E. coli</i>
Стабильность, $t_{1/2}$, час	600	1400
Активность, мкмоль/мин./г	25	130

Из таблицы 1 ясно, что при использовании рекомбинантного штамма для приготовления гетерогенного биокатализатора стабильность повышается в ≥ 2 раза, активность повышается в ≥ 4 раз. Для реализации конечной задачи III стадии – получения фруктозы – необходимо ее удаление (вытеснение) из зоны реакции для предотвращения протекания обратной реакции изомеризации. Для этих целей подходят реактор с неподвижным слоем и кремне-ксерогель ИЗОГЛЮКОСИЛ. При таком сочетании обеспечивается продолжительность работы 2000 ч ($2 t_{1/2}$), производительность процесса 2 кг продукта/час/1 кг катализатора, продуктивность биокатализатора 1–2 т глюкозы/кг. Для сравнения потенциала этой установки Института катализа СО РАН – продуктивность промышленных аналогов составляет 1–4 т/кг.

Таким образом, в русле решения проблемы производства глюкозо-фруктозных сиропов коллективом авторов и соисполнителей настоящего исследования осуществлен ряд целенаправленных разработок.

1. Предложен способ «сухой» декстринизации крахмала путем механо-химической активации смеси крахмала с амилазой.

2. Разработан гетерогенный биокатализатор для стадии осахаривания крахмала «Глюкоамилаза на Сибуните» (проведены ресурсные испытания в лабораторном масштабе).

3. Разработан гетерогенный биокатализатор для стадии изомеризации глюкозы «Рекомбинантный штамм-продуцент в SiO_2 » (проведены ресурсные испытания в лабораторном масштабе).

4. Предложена схема переработки крахмальной суспензии в патоки различного углеводного состава и сиропы (глюкозные и глюкозо-фруктозные) с участием гетерогенных биокатализаторов и вихревых реакторов.

Надо отметить, что все носители и ферменты произведены в России. Штаммы-продуценты созданы в Республике Беларусь.

Материалы доклада на II Международном конгрессе «ЕвразиБио-2010» (Москва, 12–15 апреля 2010 г.)

BIOCATALYSTS FOR THE KEY STAGES OF THE MODERN TECHNOLOGIES OF PRODUCTION OF STARCH SUGAR

G.A. KOVALENKO

G.K. Boreskov Institute of Catalysis, Syberian Branch of RAS, Novosibirsk

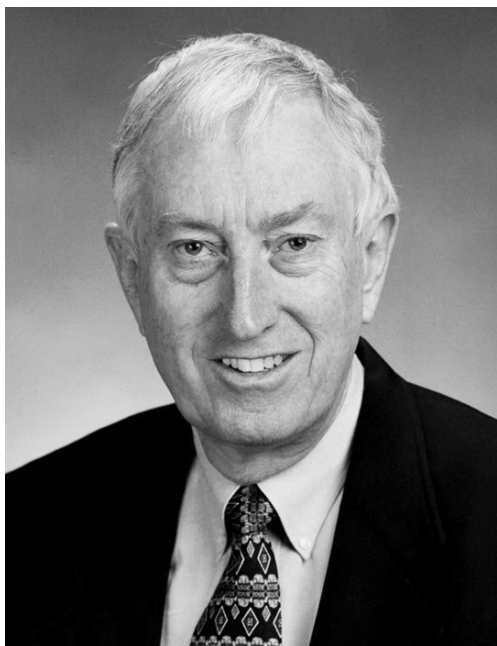
The materials on the creation of domestic production of glucose-fructose syrups. A method of «dry» dextrinisation starch by mechano-chemical activation of a mixture of starch with amylase. Developed a heterogeneous biocatalyst «Glucoamylase on Sibunit» for starch saccharification stage, and heterogeneous biocatalyst «Recombinant producer strains in SiO₂» for the stage of the isomerization of glucose (carried out life tests on a laboratory scale). We propose a scheme for processing of starch suspensions in molasses of different carbohydrate composition and syrups (glucose and glucose-fructose) with the participation of heterogeneous biocatalysts and vortex reactors.

Keywords: biotechnology, biocatalysts, sugary starch, glucose-fructose syrups.

К 70-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ АВСТРАЛИЙСКОГО ИММУНОЛОГА ПИТЕРА ДОГЕРТИ, ЛАУРЕАТА НОБЕЛЕВСКОЙ ПРЕМИИ

О.В. ВОРОБЬЕВА*

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России,
Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, Москва



В 2010 году исполняется 70 лет со дня рождения Питера Чарльза Догерти, австралийского иммунолога и патолога, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине. Это — один из 11 нобелевских лауреатов-австралийцев и пока единственный ветеринар.

Имеется превосходная автобиография ученого, помещенная на нобелевском сайте [12]. Она позволяет подробно проследить творческий путь этого интересного исследователя. Помогают в этом и его полуавтобиографическая книга «Руководство для начинающих: как получить Нобелевскую премию» (2005) [9] и другая биографическая литература.

Краткая биография. П. Догерти родился 15 октября 1940 года в Брисбене (Квинсленд, Австралия). Его предки эмигрировали в Австралию из Великобритании в середине XIX века. В детстве он испытал сильное влияние своих бабушек, одна из которых была набожной представительницей методистской церкви, другая — бывшей квакершей. Отец Эрик Догерти работал механиком телефонной станции, не имел достаточного образования и поэтому стремился реализовать свое alter ego в сыне, всячески способствуя его учебе. Мать Линда (урожденная Байфорд) была преподавателем музыки и всемерно развивала в сыне гуманитарные наклонности. Питер Догерти в соответствии с пожеланиями родителей посещал местную общую школу и методистскую церковь.

Однако 17-летний Питер принял самостоятельное решение посвятить себя естественным наукам, чтобы быть «человеком действия, а не философом». Это во многом случилось под влиянием визита во время дня открытых дверей в университетскую ветеринарную школу. Молодой Догерти решил стать ветеринаром и поступил в Квинслендский университет. В 1962 году он получил степень бакалавра ветеринарных наук, а в 1966 году — степень магистра ветеринарных наук. Позднее в 1970 году он защитил диссертацию на степень доктора философии в Эдинбургском университете (Шотландия).

П. Догерти не сразу пришел в науку. В 1963 году он был зачислен в штат Института по изучению животных в своем родном городе Брисбене, где проработал до 1967 г. Несколько лет ему пришлось служить практическим ветеринарным врачом, занимаясь выяснением причин смертности свиней и крупного рогатого скота от трихомоноза. Потом его перевели в ветеринарную лабораторию этого же института, где ему поручили заниматься изучением эпидемиологии лептоспироза крупного рогатого скота (это стало темой его магистерской диссертации). По роду занятий он нередко отправлялся

© 2010 г. Воробьева О.В.

* **Автор для переписки:**

Воробьева Ольга Вадимовна,
Общество биотехнологов России
им. Ю.А. Овчинникова

119071 Москва, Ленинский пр-т, 33

E-mail: ptashka095@rambler.ru, obr@biorosinfo.ru

на стажировки в столицу Мельбурн, где познакомился со своей будущей женой Пенни Стивенс.

Далее путь Догерти приобрел сугубо научный характер. В 1967–1971 гг. он был старшим научным сотрудником отдела экспериментальной патологии Moredun исследовательского института в Эдинбурге. Именно здесь он начал заниматься проблемами вирусной патологии, что впоследствии привело его к выдающимся результатам в этой области. Вначале австралийский стажер хотел изучать медленные инфекции у овец (болезнь «скрепи»), но потом сосредоточился на исследовании передаваемого клещами флавивируса. При изучении этой темы он сотрудничал с молодым ветеринаром Рейдом, который выполнял вирусологическую и серологическую части работы, а на долю Догерти пришлось светооптические и электронно-микроскопические исследования.

После стажировки в Шотландии ученый вернулся на родину, в Канберру, где поступил на должность научного сотрудника кафедры микробиологии Школы медицинских исследований Джона Куртина (John Curtin School of Medical Research – JCSMR) Австралийского национального университета и проработал с 1972 по 1975 гг. Здесь в 1973 году он познакомился со швейцарским исследователем Рольфом Мартином Цинкернагелем, прибывшим в Австралию по приглашению заведующего кафедрой микробиологии JCSMR Гордона Ады. Они быстро выполнили совместную работу, результаты которой были опубликованы в двух статьях в журнале «Nature» за 1974 год [22, 23], а также в журналах «Transplant. Rev.» в 1974 г., «Lancet» и «J. Immunol.» в 1975 г. (в 1975 г. вышла в свет их третья совместная статья в «Nature») [5, 6, 7, 8]. Надо сказать, что еще в 1973 году оба исследователя напечатали работу методического характера по этой теме в «J. Exp. Med.» [21]. Статьи имели успех и вызвали интерес среди специалистов, что впоследствии привело к награждению их Нобелевской премией.

Столь неожиданный счастливый дебют неизвестных доселе авторов не остался незамеченным. 34-летний Догерти приглашается на должность доцента (а затем профессора) в Уистаровский институт (Филадельфия, США). В этом качестве он трудился в США с 1975 по 1982 г. Соавтору Цинкернагелю в 1976 году предложили место профессора на медицинском факультете Цюрихского университета.

По истечении шести лет Догерти вновь возвращается в Австралию, в Канберру, теперь уже на высокую и почетную должность профессора и руководителя кафедры экспериментальной патологии Школы меди-

цинских исследований Джона Куртина Австралийского национального университета (1982–1988 гг.).

В 1988 году он становится руководителем кафедры иммунологии Детского исследовательского госпиталя Сент-Джуд в Мемфисе (Штат Теннесси, США), а с 1992 года — адъюнкт-профессором кафедр патологии и педиатрии Университета Теннесси.

В настоящее время в основном трудится в Университете Мельбурна (Виктория).

Суть открытия. Изучая, как Т-лимфоциты защищают мышью от вируса лимфоцитарного хориоменингита, Питер Догерти и Рольф Цинкернагель открыли, что Т-клетка распознает чужеродный вирусный антиген на инфицированной клетке в комплексе с молекулой главного комплекса гистосовместимости (МНС). Они показали, что Т-клетки (киллеры) мышью, зараженных вирусом, убивают только инфицированные клетки-мишени, экспрессирующие те же самые антигены МНС класса I, что и в организме животных — хозяев клеток-киллеров, но не таковые, экспрессирующие отличный аллель МНС. В их экспериментах было выявлено, что цитотоксические Т-клетки мышью лизируют только вирус-инфицированные клетки-мишени, если эффекторные клетки и клетки-мишени H2-совместимы.

Схема ключевого опыта Догерти и Цинкернагеля такова. На первом этапе мышью линии «а» заражают вирусом «х». На втором этапе Т-клетки мышью активируются вирус-инфицированными клетками и начинают атаковать их. На третьем этапе Т-клетки-киллеры изолируют и смешивают с различными вирус-инфицированными клетками в тканевой культуре. В рамках этого этапа осуществляют три серии экспериментальных процедур:

- неправильное сочетание: правильный вирусный антиген (х), однако неправильная молекула МНС (b) — атаки киллеров нет;

- опять неправильное сочетание: правильная молекула МНС (a), однако неправильный вирусный антиген (y) — атаки киллеров нет;

- наконец, правильное сочетание — вирусный антиген (х) и молекула МНС (a) — приводит к атаке клеток-киллеров [19].

Таким образом, Т-клетки не распознают вирус непосредственно, а лишь в связи с молекулами МНС, то есть требуется одновременное присутствие на поверхности инфицированной вирусом клетки двух антигенов — вирусного (что ожидалось) и трансплантационного (МНС — для животных, HLA — для человека). В связи с этим утвердилось мнение, что МНС принимает участие не только в отторжении трансплантата и уничтожении

онкотрансформированных клеток, но и в нормальном иммунном ответе, в том числе на вирусную инфекцию.

Открытие явления МНС-рестрикции при Т-клеточном распознавании явилось важным шагом в изучении аутоиммунных заболеваний, трансплантационной иммунологии, создании вакцин и др. По сути дела, речь шла о формировании принципиально новой концепции узнавания «чужого в контексте своего», что стало центральным событием в иммунологии 70–80-х годов XX столетия. В упрощенном виде она гласила, что лимфоциты-киллеры уничтожают пораженные клетки только в собственном организме, а в чужом теряют свою активность.

Факты, полученные австралийским и швейцарским исследователями, не укладывались в теоретические представления того периода, сформированные главным образом учеными США, и понадобилось время, чтобы они были оценены по достоинству и общепризнаны. Несколько позже Догерти и Цинкернагель разработали две модели — единичное распознавание измененных тканей собственного организма и двойное распознавание «чужого» и «своего».

Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе открытия Догерти и Цинкернагеля, были выяснены позднее, в 80–90-е годы. Основное внимание было уделено взаимодействию молекул МНС (представляющих антиген), самого антигена и Т-клеточного рецептора на Т-клетке (главным образом, на цитотоксических Т-клетках). В результате с помощью методов кристаллографии была обнаружена тройственная структура указанных молекул. Алгоритмы взаимодействия коротких антигенных пептидов с молекулами МНС класса I были установлены Х.-Г. Раммензее с соавт., а взаимодействие пептидов с молекулами МНС класса II — Чарльзом Джеленуэем.

Награждение Нобелевской премией. В 1996 году П. Догерти и Р. Цинкернагель были награждены Нобелевской премией по физиологии и медицине «за открытия, касающиеся специфичности клеточно-опосредованной иммунной защиты» (рис. 1). Оба автора выступили с лекциями, объясняющими содержание и историю своих работ [10, 13, 25]. Следует указать на то, что это была последняя работа по иммунологии, отмеченная Нобелевской премией в XX веке.

П. Догерти в заключительной части своей лекции подчеркнул значение тонких методов исследования: использования радиоактивной метки ^{51}C и инбредных линий мышей. Во многом успеху дела способствовала спокойная обстановка австралийского университета, рас-



Рис. 1. Питер Догерти и Рольф Цинкернагель после получения Нобелевской премии (Стокгольм, декабрь 1996 г.)

полагающая к сосредоточенному думанию и общению с коллегами, а также активная поддержка руководителями молодых работников.

Кроме того, Догерти постоянно подчеркивал значение преемственности исследований, роль самостоятельной австралийской школы иммунологии и вирусологии в цепочке: Фрэнк Макфарлейн Бернет — Фрэнк Феннер — Гордон Ада. Он особо отмечал полезность уникальных вирусологических моделей, разработанных в Австралии: экстремелия (оспа мышей) — Фрэнк Феннер и лимфоцитарный хориоменингит — Фриц Леман-Грубе. Так что триумф начинающих исследователей был достигнут не на пустом месте.

Интересно, что Цинкернагель назвал «неожиданным» свое общее с Догерти открытие МНС-рестрикции. Догерти оказался восьмым в славном списке австралийцев, удостоенных столь высокой чести (ныне их 11 — одиннадцатой в 2009 году стала первая женщина Элизабет Блэкберн). Среди них такие знаменитые имена, как физиолог Джон Экклс, один из создателей пеницилина Ховард Флори, один из основателей современной иммунологии Фрэнк Макфарлейн Бернет и др. [3]. Безусловно, у Догерти вызывало особенную гордость то, что он попал в один ряд соотечественников вместе с выдающимся иммунологом Бернетом, Нобелевским лауреатом 1960 года, не только как его последователь и почитатель, но и как первооткрыватель.

Награды. Естественно, что, кроме получения Нобелевской премии, П. Догерти был общественно признан и награжден. В 1983 г. он стал членом Австралийской академии наук. В этом же году ему присудили премию Пауля Эрлиха (Германия). В 1986 году он получает премию международного фонда Gairdner. Очень важная веха

в его жизни — избрание в 1987 году членом Лондонского Королевского общества за 10 лет до присуждения Нобелевской премии: это очень высокий уровень признания. В 1993 г. его выбирают выпускником года Квинслендского университета. В 1995 году Догерти получил премию Альберта Ласкера за фундаментальные медицинские исследования. В 1997 году он был назван в Австралии человеком года (звание было учреждено в 1960 году и номер 1 получил Бернет). Является компаньоном ордена Австралии.

Дополнительные сведения. Надо отметить, что П. Догерти побывал в России в сентябре 2008 года и выступил с лекцией «How we deal with virus infections». Лекция состоялась в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН в рамках программы «Онкоиммунология» и представляла собой шестую мемориальную лекцию, посвященную памяти известного иммунолога Чарльза Джонуэя.

Биографические данные о П. Догерти приведены в ряде публикаций [2, 24] и в Интернет-источниках, включая интервью с ученым [1, 3, 4, 11, 12, 14, 15, 16, 18]. Наиболее полный список его работ содержит PubMed, где собраны 395 публикаций с 1966 по 2010 гг. [17].

Литература

1. *Догерти Питер* [Электронный ресурс]. Режим доступа: www.ru.wikipedia.org/wiki/Догерти_Питер: — Дата обращения: 31.07.2010.
2. *Марьянович А.Т., Князькин И.В.* Взрыв и цветение. Нобелевские премии по медицине 1901–2002. — СПб.: Изд-во ДЕАН, 2002. — С. 417–422.
3. Часть 4. Австралия сегодня [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.citizenship.gov.au/learn/cit_test/test_resource_book/_pdf/russian-non-test.pdf. — Дата обращения: 31.07.2010.
4. An interview with Peter C. Doherty from Australian Academy of Science [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.science.org.au/scientists/interviews/d/doherty.html>. — Дата обращения: 29.08.2010.
5. *Doherty P.C. and Zinkernagel R.M.* A biological role for the major histocompatibility antigens // *Lancet*. — 1975 Jun 28. — N 1(7922). — P. 1406–1409.
6. *Doherty P.C. and Zinkernagel R.M.* Capacity of sensitized thymus-derived lymphocytic choriomeningitis is restricted by the H-2 gene complex // *J. Immunol.* — 1975 Jan. — Vol. 114(1 Pt 1). — P. 30–33.
7. *Doherty P.C. and Zinkernagel R.M.* Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex // *Nature*. — 1975 Jul 3. — Vol. 256(5512). — P. 50–52.
8. *Doherty P.C. and Zinkernagel R.M.* T-cell-mediated immunopathology in viral infections // *Transplant Rev.* — 1974. — Vol. 19(0). — P. 89–120.
9. *Doherty P.C.* The Beginner's Guide to Winning the Nobel Prize. — Megunyah Press, Melbourne University Publishing, 2005 (также Columbia University Press, 2006).
10. *Doherty P.C.* The Nobel Lectures in Immunology. The Nobel Prize for Physiology or Medicine, 1996. Cell mediated immunity in virus infections // *Scand. J. Immunol.* — 1997 Dec. — Vol. 46(6). — P. 527–540.
11. Doherty Peter C. [Электронный ресурс]. Режим доступа: www.en.wikipedia.org/wiki/Peter_C_Doherty. — Дата обращения: 30.08.2010.
12. *Doherty Peter C.* Autobiography. The Nobel Prize in Physiology and Medicine, 1996. [Электронный ресурс]: Режим доступа: www.nobelprize.org/medicine/laureates/1996/doherty-autobio.html. — Дата обращения: 25.04.2010.
13. *Doherty Peter C.* Cell mediated immunity virus infections. Nobel lecture, December 8, 1996 / In: *Les Prix Nobel. The Nobel Prizes 1996*. Ed. Tore Fraengsmyr [Nobel Foundation], Stockholm, 1997. — P. 13–33.
14. History of Immunology / Taylor & Francis Group. — 23 p. [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.docstoc.com/docs/9027619/History_of_immunology. — Дата обращения: 12.09.2010.
15. Peter C. Doherty's page at St. Jude Children's Research Hospital http://www.stjude.org/stjude/v/index.jsp?vgnextoid=e5dd10e88ce70110VgnVCM1000001e0215acRCRD&vgnextchannel=7cc71436e3218010VgnVCM1000000e2015acRCRD&SearchUrl=search_results.jsp&QueryText=doherty.
16. *Wertheim M.* Winning a Nobel: easy as wrestling a pig // *Cosmos magazine*. — 2006 Oct. [Электронный ресурс]. Режим доступа: www.cosmosmagazine.com/node/719. — Дата обращения: 30.08.2010.
17. www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez. — Дата обращения: 30.08.2010.
18. www.nobelprize.org/medicine/laureates/1996/doherty-cv.html. — Дата обращения: 25.04.2010.
19. www.nobelprize.org/medicine/laureates/1996/doherty-experiment.html. — Дата обращения: 29.08.2010.
20. www.yakhnov.ru/go/note/2008/04/16/australian-nobel-laureates/ — Дата обращения: 31.07.2010.
21. *Zinkernagel R.M. and Doherty P.C.* Cytotoxic thymus-derived lymphocytes in cerebrospinal fluid of mice with lymphocytic choriomeningitis // *J. Exp. Med.* — 1973 Nov 1. — Vol. 138(5). — P. 1266–1269.
22. *Zinkernagel R.M. and Doherty P.C.* Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis // *Nature (Lond.)*. — 1974 Oct. 11. — Vol. 251(5475). — P. 547–548.

23. Zinkernagel R.M. and Doherty P.C. Restriction of in vitro T-cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system // *Nature (Lond.)*. – 1974 Apr 19. – Vol. 248(5450). – P. 701–702.
24. Zinkernagel R.M. and Doherty P.C. The discovery of MHC restriction // *Immunol. Today*. – 1997 Jan. – Vol. 18(1). – P. 14–17.
25. Zinkernagel R.M. Cellular immune recognition and the biological role of major transplantation antigens. Nobel lecture. December 8, 1996 / In: *Les Prix Nobel. The Nobel Prizes 1996*. Ed. Tore Fraengsmyr [Nobel Foundation], Stockholm, 1997. – P. 41–63.

Резюме. В связи с 70-летием со дня рождения анализируются жизнь и творчество Питера Догерти, известного австралийского иммунолога, лауреата Нобелевской премии. Ученый продолжает активно работать в институтах Австралии и США.

Ключевые слова: история науки, иммунология, главный комплекс гистосовместимости (МНС), Т-лимфоциты, МНС-рестрикция, вирусология, вирус-инфицированные клетки, биография, Питер Чарльз Догерти.

TO THE 70TH ANNIVERSARY OF THE AUSTRALIAN IMMUNOLOGIST PETER DOHERTY, THE NOBEL WINNER

O.V. VOROBYEVA

*Institute of Immunology of FMBA of Russia,
Yu.A. Ovchinnikov Society of biotechnologists of Russia, Moscow*

In connection with the 70th anniversary examines the life and work of Peter Doherty, the famous Australian immunologist, Nobel winner. The scientist continues to work actively in the institutions of Australia and the USA.

Keywords: history of science, immunology, major histocompatibility complex (MHC), T-lymphocytes, MHC-restriction, virology, virus-infected cells, biography, Peter Charles Doherty.

СОБЫТИЯ ПЕРВОЙ ПОЛОВИНЫ 2010 ГОДА

**Форум «Биотехнология и общество»
ассоциированное мероприятие
II Международного конгресса «ЕвразияБио»
(Москва, 12 апреля 2010 г.)**

В рамках Второго Международного конгресса «ЕвразияБио-2010» в Москве состоялся форум «Биотехнология и общество» (председатели — профессор Р.Г. Васильев, профессор В.Е. Лепский).

С докладами и краткими сообщениями выступило около 50 человек. Состоялась оживленная дискуссия по ряду острых вопросов, в том числе ГМО, биоэкополисы и т.д.

Участниками Форума была принята следующая РЕЗОЛЮЦИЯ:

Введение. По инициативе Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова и Клуба инновационного развития Института философии РАН 12 апреля 2010 года был проведен Форум «Биотехнология и общество». В Форуме приняли участие более 150 специалистов. К публикации принято свыше 40 текстов.

Основные цели и задачи Форума. Ознакомление широких кругов общественности с достижениями биотехнологии. Это особенно актуально в связи с периодически возникающими в обществе дискуссиями по поводу внедрения в практику новейших разработок в области медицинской, пищевой, сельскохозяйственной, промышленной, экологической биотехнологии. При этом общество зачастую не подготовлено к восприятию реальных научных достижений и склонно иногда верить мифам, нежели конкретным научно обоснованным фактам.

Программа Форума. Ведущие темы:

- Биотехнология в поиске новых форм устройства на планете (поиск альтернативных форм глобализации, создание сред квазиавтономных социальных образований).
- «Горячие проблемы» развития биотехнологии (биотехнология и общество).
- «Горячие проблемы» развития биотехнологии (биотехнология и человек).
- Биоэкополисы как базовый модуль автономных поселений.
- Механизмы развития взаимодействия государства, общества и бизнеса в инновационном развитии на основе биотехнологии.

Оценка сложившейся ситуации. Биотехнология — одно из самых важных направлений инновационного развития в XXI веке. Сегодня Россия отодвинута с лидирующих позиций в 70—80-е годы в седьмой десяток по уровню развития биоиндустрии, имея высший в мире потенциал для ее развития. Вопреки директивным документам руководства страны о стратегической роли биотехнологии, государство практически отстранилось от развития этой сферы высоких технологий. Разрушена крупнотоннажная индустрия биотехнологии. Функции координации и планирования инициативно взяли на себя общественные организации, а разработки — малый и средний бизнес. Без активного включения государства в процессы развития биотехнологии у России нет шансов стать одним из мировых лидеров.

В этих условиях особую важность приобретает разработка социогуманитарных технологий обеспечения процессов консолидации общества, государства и бизнеса, обеспечения гармонии между пользой и угрозами от внедрения биотехнологий, поиском локомотивов их развития.

Обсудив вышеуказанные темы, участники Форума рекомендуют:

1. Дальнейшее регулярное проведение данного мероприятия. Организовать постоянную площадку для диалога в сфере проблем «Биотехнология и общество», включить ее в состав программных мероприятий «Стратегии развития биотехнологической отрасли промышленности в Российской Федерации до 2020 года».

2. Опубликовать сборник материалов Форума.

3. Рекомендовать Обществу биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова и Клубу инновационного развития Института философии РАН:

- организовать работу по координации и методической поддержке инициативных автономных поселений («Биоэкополис»), широко использующих биотехнологию в организации своей жизнедеятельности;
- обобщить опыт разработки региональных программ по биотехнологии и обеспечить его широкое распространение;
- инициировать разработку совместно с международным сообществом «Кодекса биоэкономики» и расширить сферу работы комитетов по биоэтике;
- организовать разработку возможного прогнозистического сценария реализации движения к VI

-
- технологическому укладу при ведущей роли биотехнологии;
- интенсифицировать работу по ознакомлению общества с идеями и достижениями в сфере биотехнологии, оценке информированности общества и его отношения к различным направлениям внедрения биотехнологии. Инициировать медийный проект «Популярная биоэкономика» и другие информационные проекты;
 - разработать оптимальный вариант осуществления социогуманитарной экспертизы инновационных проектов в сфере высоких технологий.

ERRATUM

В № 2 за 2010 год на стр. 58 напечатано:

«Personalized» — «Профилактическая»,

«Preventive» — «Персонализированная».

Следует читать, переставив строки перевода:

«Personalized» — «Персонализированная»,

«Preventive» — «Профилактическая».

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.

ISSN 1996-4741



Подписано к печати 19.10.10
Формат 60/90¹/₈. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 4,5. Тираж 1000 экз.

ОБЩЕСТВО БИОТЕХНОЛОГОВ РОССИИ ИМ. Ю.А. ОВЧИННИКОВА

Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (ОБР) создано в 2003 году, 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 более 3000 членов.

ОБР является членом Европейской федерации биотехнологии и Федерации азиатских биотехнологических ассоциаций.

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

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

Членство в ОБР является бесплатным для физических лиц.

Контакты: Адрес: 119071 Москва, Ленинский пр-т, 33

Тел.: +7 (495) 648-09-13

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