

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

Научно-практический журнал

Основан в 2005 году

Главный редактор

Р.Г. Василев

Редакционная коллегия

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

Редакционный совет

В.А. Быков (Москва), В.Г. Дебабов (Москва), С.Х. Дегтярев (Новосибирск),
В.В. Зверев (Москва), В.Т. Иванов (Москва), Л.В. Калакуцкий (Пушино),
М.П. Кирпичников (Москва), А.И. Мирошников (Москва),
Т.В. Овчинникова (Москва), А.Н. Панин (Москва), В.О. Попов (Москва),
А.Н. Решетилов (Пушино), К.Г. Скрыбин (Москва), 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

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@mail.ru

Издается при поддержке

Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

ISSN 1996-4741

© Информационно-аналитический центр
медико-социальных проблем, 2013.

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

К читателям. *Р.Г. Василев* 4

Оригинальные статьи

Новый липид-транспортный белок из укропа огородного *Anethum graveolens* L.
Д.Н. Мельникова, Е.И. Финкина, С.В. Баландин, Т.В. Овчинникова 5

MteI-ПЦР-анализ – новый метод определения статуса метилирования GC-богатых регуляторных
участков генов-онкосупрессоров человека.
М.А. Абдурашитов, А.Н. Куксова, А.Г. Акишев, Е.В. Землянская, С.Х. Дегтярев 15

Электрохимическая методика прямой регистрации непрямимированного синтеза ДНК.
А.Н. Решетилев, Л.А. Железняк 24

Изучение накопления липидов штаммом дрожжей *Yarrowia lipolytica* с инактивированным геном,
кодирующим пероксисомальный транспортер аденозинтрифосфорной кислоты.
Е.Ю. Юзбашева, Т.В. Юзбашев, Е.Б. Мостова, Н.И. Перковская, С.П. Синецкий 30

Клонирование системы рестрикции-модификации *BpuNI* из *Bacillus pumilus* N4.
*В.С. Дедков, Д.А. Гончар, В.А. Чернухин, М.А. Абдурашитов, Е.Н. Ломаковская,
Н.М. Шинкаренко, С.Х. Дегтярев* 40

Обзоры

Концепция модульной энергоустановки на основе возобновляемых источников энергии с системой
водородного аккумулирования энергии.
О.Л. Амосова, В.В. Бутылин, Р.Г. Василев, В.В. Тепляков 48

Современные технологии получения биодизеля.
П.М. Готовцев, М.А. Ломоносова, В.В. Бутылин, Е.Б. Мостова, Н.И. Перковская 54

Золошлаковые отвалы объектов тепло- и электрогенерации как источники ценных металлов
и редкоземельных элементов.

А.Г. Булаев, Т.Ф. Кондратьева 62

Возможные технологии сбора микроводорослей методом флокуляции с использованием
биофлокулянтов.
П.М. Готовцев, М.А. Ломоносова, В.В. Бутылин, К.В. Горин 75

Страницы истории

Юбилейные даты 2013 года в генетике и молекулярной биологии
(материал подготовлен *В.С. Воробьевым*) 81

Правила для авторов 94

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. *R.G. Vasilov* 4

Original articles

A novel lipid transfer protein from the dill *Anethum graveolens* L.
D.N. Melnikova, E.I. Finkina, S.V. Balandin, T.V. Ovchinnikova 5

MteI-PCR assay – a new method of methylation status determination for GC-rich regulatory regions
of human tumor suppressor genes.

M.A. Abdurashitov, A.N. Kuksova, A.G. Akishev, E.V. Zemlyanskaya, S.Kh. Degtyarev 15

Electrochemical methods of direct detection of DNA synthesis without added primer.
A.N. Reshetilov, L.A. Zheleznaya 24

The study of lipid accumulation *Yarrowia lipolytica* yeast strain with an inactivated gene
encoding peroxisomal transporter adenosine triphosphate.

E.J. Yuzbashev, T.V. Yuzbashev, E.B. Mostov, N.I. Perkovskaya, S.P. Sineoky 30

Cloning of BpuN4I restriction-modification system with application of the library dividing method.
*V.S. Dedkov, D.A. Gonchar, V.A. Chernukhin, M.A. Abdurashitov, E.N. Lomakovskaya,
N.M. Shinkarenko, S.Kh. Degtyarev* 40

Reviews

The concept of modular power plants based on renewable energy sources with hydrogen energy
storage system.

O.L. Amosova, V.V. Butylin, R.G. Vasilov, V.V. Teplyakov 48

Modern technologies for biodiesel.
P.M. Gotovtsev, M.A. Lomonosova, V.V. Butylin, E.B. Mostova, N.I. Perkovskaya 54

Ash and slag dumps of the objects heat and power generation as a source of precious metals
and rare earth elements.

A.G. Bulaev, T.F. Kondratyeva 62

Possible technologies for the collection of microalgae flocculation method using
bioflocculants.
P.M. Gotovtsev, M.A. Lomonosova, V.V. Butylin, K.V. Gorin 75

Pages of history

Anniversary dates 2013 in genetics and molecular biology
(material composed *V.S. Vorobyev*) 81

Rules for authors 94

К читателям

В третьем номере журнала собран ряд актуальных работ по молекулярной биологии. Группа исследователей из Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН под руководством д.х.н., профессора Т.В. Овчинниковой выделила новый липид-транспортирующий белок из укропа огородного, определила его полную аминокислотную последовательность и структуру полноразмерной кДНК.

А.Н. Решетиловым (Пушино на Оке) предложен метод регистрации реакции непраймированного синтеза ДНК с использованием биосенсорного преобразователя электрохимического типа.

Продолжена серия публикаций сотрудников компании «СибЭнзим» (Новосибирск): напечатаны две работы. В одной из них предложен новый метод Mtel-ПЦР-анализа GC-богатых участков ДНК, основанный на уникальной метилзависимой сайт-специфической ДНК-эндонуклеазе Mtel, имеющей протяженный высокометилированный сайт узнавания. Другая работа посвящена клонированию системы рестрикции-модификации *VruN41* из *Bacillus pumilus* N4.

Коллектив из ФГУП «ГосНИИГенетика» исследовал процесс накопления липидов штаммом дрожжей *Yarrowia lipolytica* с инактивированным геном, кодирующим пероксисомальный транспортер аденозинтрифосфорной кислоты.

Представлена подборка статей по биоэнергетике, подготовленных сотрудниками НИЦ «Курчатовский институт» (НТК биоэнергетики). Рассмотрены результаты современных исследований в области получения биодизеля методом переэтерификации. Проведена оценка значения методов флокуляции для сбора микроводорослей с целью выработки биотоплива. Разработана концепция технологической платформы модульной энергоустановки для получения возобновляемых источников энергии (совместно с Институтом нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН).

Т.Ф. Кондратьева (Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН) неоднократно выступала на страницах журнала со статьями по биогеотехнологии. На этот раз она вместе с коллегой А.Г. Булаевым проанализировала эффективность разработки кучной и чановой биотехнологий выщелачивания ценных металлов и редкоземельных элементов из зольно-шлаковых отходов на основе применения сообществ ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов.

В исторической рубрике помещены материалы в связи со 100-летием выхода в свет книги У. Бэтсона «Проблемы генетики».

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

НОВЫЙ ЛИПИД-ТРАНСПОРТИРУЮЩИЙ БЕЛОК ИЗ УКРОПА ОГОРОДНОГО *ANETHUM GRAVEOLENS L.*

Д.Н. МЕЛЬНИКОВА, Е.И. ФИНКИНА, С.В. БАЛАНДИН, Т.В. ОВЧИННИКОВА*

ФГБУН «Институт биоорганической химии
им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова» РАН, Москва

Новый липид-транспортирующий белок, обладающий противогрибковой активностью и названный Ag-LTP, выделен из листьев и стеблей укропа огородного *Anethum graveolens L.* Определены молекулярная масса Ag-LTP, его полная аминокислотная последовательность и структура полноразмерной кДНК. Создана генно-инженерная конструкция, позволяющая проводить экспрессию Ag-LTP в клетках *E. coli* в составе гибридного белка, а также разработана методика выделения и очистки рекомбинантного аналога этого нового представителя класса липид-транспортирующих белков растений.

Ключевые слова: липид-транспортирующий белок, первичная структура, плазмидный вектор, гетерологичная экспрессия, рекомбинантный аналог, укроп.

Введение

Один из классов растительных белков, относящихся к семейству белков, связанных с патогенезом (Pathogenesis-Related Proteins, или PRP), составляют так называемые липид-транспортирующие белки (Lipid Transfer Proteins, или LTP). LTP — это небольшие основные белки, которые обладают способностью обратимо связывать и переносить молекулы различных липидов [4, 11]. LTP являются секреторными белками, имеют преимущественно внеклеточную локализацию и синтезируются в растительных клетках в виде пре-белков, содержащих сигнальную последовательность из 20–25 аминокислотных остатков [2, 6]. В геноме растений эти белки, как правило, представлены набором генов, кодирующих различные изоформы. Экспрессия генов различных изоформ этих белков отличается ярко выраженной тканевой специфичностью и происходит на определенных стадиях онтогенеза [4, 11].

LTP растений содержат восемь консервативных остатков цистеина, образующих четыре дисульфидные связи. В соответствии с молекулярной массой LTP

подразделяют на два подсемейства: LTP1 (≈ 9 кДа) и LTP2 (≈ 7 кДа). Для пространственной структуры LTP характерно наличие гидрофобной впадины, образованной тремя или четырьмя α -спиралями и длинным С-концевым фрагментом [5, 14]. LTP растений хорошо растворимы в воде, устойчивы к тепловой и химической денатурации, а также к действию протеолитических ферментов [19].

Биологическая роль LTP в растениях до сих пор остается предметом обсуждения. На сегодняшний день LTP приписывают целый ряд функций, таких как участие в защите растений от стрессовых факторов окружающей среды [10, 12], эмбриогенезе [23], передаче сигнала об опасности [3], формировании кутикулы [6, 25] и модуляции роста [16, 23]. Предполагается, что LTP, подавляющие рост фитопатогенных бактерий и грибов, являются важными компонентами защитной системы растений [8, 22, 24]. Многие представители подкласса LTP1 являются сильными аллергенами, ответственными за развитие аллергических реакций на латекс, пыльцу и растительные пищевые продукты [1, 18]. Изучение LTP растений, обладающих антимикробной активностью и аллергенными свойствами, представляет интерес в связи с возможностью их практического применения как в области сельского хозяйства для создания устойчивых трансгенных растений, так и в области медицины для создания новых диагностических и терапевтических средств.

Укроп огородный *Anethum graveolens L.* — однолетнее травянистое растение, широко распространенное в средиземноморском регионе, Европе, Центральной и Южной Азии. Укроп огородный является лекарствен-

© 2013 г. Мельникова Д.Н., Финкина Е.И., Баландин С.В., Овчинникова Т.В.

* **Автор для переписки:**

Овчинникова Татьяна Владимировна
доктор химических наук, профессор
руководитель Учебно-научного центра ИБХ РАН
117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
Факс: (495)336-43-33
E-mail: ovch@ibch.ru

ным растением и повсеместно используется в качестве вкусовой добавки в пищу. Данная культура характеризуется устойчивостью к заболеваниям и действию низких температур. В листьях и стеблях укропа огородного нами был обнаружен новый липид-транспортирующий белок, названный Ag-ЛТР. В рамках этой работы нами проведено выделение и определена полная аминокислотная последовательность Ag-ЛТР, создана система для его гетерологической экспрессии в клетках *E. coli*, а также изучена антимикробная активность этого нового представителя класса ЛТР.

Материалы и методы

Выделение и характеристика Ag-ЛТР. 100 г листьев и стеблей укропа *Anethum graveolens L.* (сорт «Грибовский», семена ГОСТ 352171-2003, партия 2307, агрофирма «Алена Люкс»), выращенного до состояния технической зрелости, гомогенизировали в жидком азоте и проводили экстракцию 300 мл буфера (10 мМ Na₂HPO₄, 1,76 мМ KH₂PO₄, 2,7 мМ KCl, 137 мМ NaCl, 5 мМ ЭДТА, коктейль ингибиторов протеаз – «Sigma», Германия) при температуре 4 °С в течение 16 ч при постоянном перемешивании. Осветленный методом центрифугирования (38000 g, 45 мин, 4 °С) экстракт пропускали через фильтр TURE HVLP 0,45 мкм и подвергали диализу (MWCO 3,5 кДа) против 100-кратного объема 5 мМ ацетата натрия, рН 5,3, в течение ночи при 4 °С при постоянном перемешивании. Полученный диализат наносили на катионообменную колонку HiTrap SPFF (GE Healthcare, Швеция), уравновешенную тем же буфером. Элюцию проводили, используя линейный градиент концентрации хлорида натрия от 0 до 500 мМ за 50 мин, при скорости потока 1 мл/мин. Детектирование вели при длине волны 280 нм. Далее выделение Ag-ЛТР проводили методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) на колонке Диасфер-300-С₁₈ (10 мкм, 250×4,6 мм, «Биохиммак СТ», Россия) при скорости потока 0,5 мл/мин, используя градиент концентрации ацетонитрила от 5 до 65% за 48 мин в присутствии 0,1% ТФУ. Детектирование вели при длине волны 214 нм. Финальную очистку Ag-ЛТР проводили на колонке Luna C₁₈ (5 мкм, 250×4,6 мм, «Phenomenex», США) при скорости потока 0,5 мл/мин, используя градиент концентрации ацетонитрила от 5 до 30% за 10 мин и далее от 30 до 62% за 40 мин в присутствии 0,1% ТФУ.

Молекулярную массу очищенного Ag-ЛТР определяли на МАЛДИ-времяпролетном масс-спектрометре

Reflect III («Bruker», Германия), оснащенном УФ-лазером с длиной волны 336 нм. Аминокислотную последовательность определяли, используя систему для секвенирования белков Procise cLC 491 («Applied Biosystems», США).

Определение структуры полноразмерной кДНК. Листья и стебли укропа гомогенизировали в жидком азоте. Суммарную РНК выделяли с помощью системы SV Total RNA Isolation System («Promega», США) согласно инструкции фирмы-производителя.

Для определения полной структуры Ag-ЛТР проводили быструю амплификацию 3'- и 5'-концевых фрагментов кДНК (RACE). Эксперименты по обратной транскрипции и ПЦР проводили, используя набор для амплификации концов кДНК SMART™ RACE (BD Biosciences «Clontech», США). Структуры вырожденных ген-специфичных праймеров для 3'-RACE были выбраны на основании данных по гомологии нуклеотидных последовательностей, кодирующих зрелую часть ЛТР из других растений. 3'-RACE проводили с помощью метода полугнездовой ПЦР, используя на первом этапе праймер № 1 (5'-TG(T,C)(G,A)G(T,C)GT(C,T)AACAT(T,C)CCTTAC-3') и режим амплификации: 95 °С – 1 мин и 30 циклов: 94 °С – 30 с, далее 65...55 °С – 40 с (каждые пять циклов снижали температуру на 3 °С), 68 °С – 2 мин. На втором этапе разведенные продукты ПЦР амплифицировали с внутренним праймером № 2 (5'-AACAT(T,C)CCTTAC(A,C)(A,C)GATCAG-3') в течение 30 циклов при температуре отжига 50 °С.

Амплификацию 5'-концов кДНК проводили также методом полугнездовой ПЦР с использованием ген-специфичных праймеров, комплементарных 3'-нетранслируемой области кДНК. На первом этапе использовали праймер № 3 (5'-CACTTACAAGGGAACATGGAACAT-3') и температурный режим: 95 °С – 1 мин и 30 циклов: 94 °С – 30 с, 65...50 °С – 40 с (каждые 5 циклов температуру снижали на 3 °С), 68 °С – 2 мин. На втором этапе разведенные продукты первой реакции амплифицировали с внутренним праймером № 4 (5'-TAGATCCCATGCATCATTAATTC-3'), используя температурный режим: 95 °С – 1 мин, далее 30 циклов: 94 °С – 30 с, 45 °С – 40 с, 68 °С – 1 мин.

Продукты ПЦР разделяли гель-электрофорезом в 1,5% агарозе, содержащей бромид этидия, и детектировали в УФ-свете. Продукты ПЦР лигировали по липким А-концам с pGEM-T вектором («Promega», США), клонировали в клетках штамма *Escherichia coli* DH-10B («Life Technologies», США) и секвенировали

с помощью автоматического секвенатора ABI PRISM 3100-Avant («Applied Biosystems», США).

Триптический гидролиз. Образец ЛТР (5 мкг), восстановленного в присутствии 1% 2-меркаптоэтанола, растворяли в 10 мкл буфера 50 мМ NH_4HCO_3 , рН 8,0, содержавшего модифицированный трипсин («Promega», США) в концентрации 10 мкг/мл. Расщепление проводили при 56 °С в течение 2 ч и останавливали реакцию добавлением 10 мкл 0,5% ТФУ в 10% растворе ацетонитрила. Масс-спектры полипептидных фрагментов ЛТР снимали в режиме регистрации положительных ионов, используя рефлектрон.

Гетерологичная экспрессия Ag-ЛТР в клетках E. coli. Конструирование плазмидного вектора рЕТ-His8-TrxL-Ag-ЛТР (6041 п.о.) осуществлялось путем лигирования BglII/XhoI-фрагмента плазмиды рЕТ-31b(+) (Novagen), содержащего область инициации репликации, T7 терминатор, гены β -лактамазы и lac-репрессора, со вставкой, кодирующей ген гибридного белка. Искусственный ген гибридного белка, содержащий промотор транскрипции T7 РНК-полимеразы, lac-оператор, участок связывания рибосомы и участок, кодирующий гибридный полипептид, был получен путем синтеза набора олигонуклеотидов с последующей сборкой и амплификацией промежуточных и конечного продуктов при помощи ПЦР. Фрагмент, кодирующий белок-носитель тиоредоксин с заменой M37L, получали методом ПЦР-амплификации и направленного мутагенеза с помощью ген-специфичных праймеров, используя в качестве исходной матрицы плазмиду рЕТ32a(+), содержащую ген тиоредоксина [17]. Дальнейшую очистку плазмиды и трансформацию проводили согласно протоколу [20]. Клетки штамма BL-21(DE3)/рЕТ-His8-TrxL-Ag-ЛТР культивировали в среде LB с добавлением 100 мкг/мл ампициллина и 20 мМ глюкозы до $\text{OD}_{600} \sim 0,8$. Индукцию синтеза гибридного белка проводили, добавляя в среду 0,2 мМ изопропилтио- β -D-галактозид (ИПТГ), после чего клетки инкубировали при перемешивании в течение 4–5 часов при температуре 30 °С.

Выделение и очистка гибридного белка. Клеточную культуру центрифугировали при 12000 g в течение 15 мин для получения клеточного осадка, который далее ресуспендировали в 50 мл буфера А (50 мМ трис-НСl, 0,5 М NaCl, 20 мМ имидазола, рН 7,8) с добавлением 1 мМ фенилметилсульфонилфторида (ФМСФ) и гомогенизировали на льду с помощью ультразвука. Полученный методом центрифугирования (38000 g, 30 мин, 4 °С) осветленный лизат разделяли с помощью металлохелатной хроматографии на колонке с Ni-NTA агарозой при

скорости потока 0,7 мл/мин. Элюцию гибридного белка проводили тем же буфером, содержащим 0,5 М имидазол. Далее элюат диализовали против 3 л подкисленной воды (рН 4) в течение ночи при температуре 4 °С. Полученный диализат лиофильно высушивали.

Выделение и очистка рекомбинантного Ag-ЛТР. Расщепление гибридного белка His8-TrxL-Ag-ЛТР проводили с помощью реакции с бромцианом в кислой среде. Навеску гибридного белка растворяли в 80% ТФУ в концентрации 10–20 мг/мл, добавляли 100-кратный молярный избыток бромциана и инкубировали в темноте 16–20 ч при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением трехкратного объема воды, после чего упаривали образец на вакуумном концентраторе. Очистку целевого белка проводили с помощью повторной металлохелатной хроматографии в той же буферной системе на колонке с Ni-NTA агарозой. Образцы для нанесения на металлохелатную колонку готовили, растворяя упаренный после реакции расщепления бромцианом образец в буфере А, содержащем 6 М гуанидина гидрохлорид, в концентрации 20 мг/мл. Остатки кислоты нейтрализовали, добавляя раствор щелочи (4 М NaOH) до рН 7–8. Финальную очистку рекомбинантного Ag-ЛТР проводили методом ОФ-ВЭЖХ на колонке Reprosil-Pur C₁₈-AQ (5 мкм, 250 × 10 мм, «Dr. Maisch GmbH», Германия). Хроматографическое разделение белков проводили при скорости потока 2 мл/мин, используя градиент концентрации ацетонитрила от 5 до 80% за 60 мин в присутствии 0,1% ТФУ.

Электрофорез. Анализ полученных на разных стадиях выделения фракций проводили с помощью SDS-электрофореза по методу Леммли [13] и в оптимизированной для разделения небольших белков и пептидов трис-трициновой системе [21]. Электрофорез проводили в 0,75 мм геле, используя вертикальную минисистему SE 250 Mighty Small («Hoefler», США).

Антимикробная активность. Антимикробную активность Ag-ЛТР определяли методом двукратных серийных разведений белка в жидкой питательной среде с культурой бактериальных клеток или спор фитопатогенных грибов [9]. Для этого в лунки 96-луночного планшета вносили по 110 мкл бактериальной культуры (4×10^4 КОЕ/мл) или суспензии спор в питательной среде (10^4 спор/мл) и по 10 мкл стерильных растворов белка различной концентрации в 0,1% ТФУ. Каждый вариант теста ставился в трех повторностях. Планшет инкубировали в термостатируемом шейкере при 30 °С в течение 24 или 48 ч в случае исследования антибактериальной и противогрибковой активности, соответственно.

Рост культуры оценивали путем измерения оптической плотности в лунках при 620 нм при помощи планшетного фотометра Multiscan EX. В качестве отрицательного контроля использовали 0,1% ТФУ. За IC_{50} принимали концентрацию белка, необходимую для 50% ингибирования роста микроорганизма по сравнению с контрольными лунками при сопоставлении средних значений оптической плотности во всей серии проб.

Результаты и обсуждение

Выделение и характеристика Ag-LTP из укропа. Исходный препарат для выделения белка был получен в результате гомогенизации листьев и стеблей укропа *Anethum graveolens* L. После первоначальных этапов очистки, включавших в себя экстракцию буферным раствором, центрифугирование и диализ, была проведена катионообменная хроматография на колонке нормального давления HiTrap SPFF. В результате хроматографии было получено несколько фракций, которые были проанализированы с использованием SDS-электрофореза в трис-трициновой системе. На основании данных литературы о молекулярных массах представителей подкласса LTP1 для дальнейшей работы была выбрана фракция, содержащая белки с M_r 9–10 кДа. Разделение белков из этой фракции осуществлялось методом ОФ-ВЭЖХ на колонке Диасфер-300- C_{18} в линейном градиенте концентрации ацетонитрила в присутствии 0,1% ТФУ (рис. 1а). Масс-спектрометрический анализ полученных фракций выявил присутствие белка с молекулярной массой 9525,4 Да во фракции 1'. Дальнейшая очистка этого белка была проведена методом ОФ-ВЭЖХ на колонке Luna C_{18} (рис. 1б). Масс-спектрометрический анализ полученных фракций выявил присутствие искомого белка во фракции 2 (рис. 2). Частичная N-концевая аминокислотная последовательность выделенного белка (LTXGQVTGALAPXLYLRTAG-), установленная методом автоматического микросеквенирования по Эдману, имела значительное сходство с соответствующими последовательностями липид-транспортирующих белков подкласса LTP1. Выделенный нами белок укропа был назван Ag-LTP.

Для установления полной аминокислотной последовательности Ag-LTP была выделена суммарная РНК, проведены обратная транскрипция и быстрая амплификация 3'- и 5'-концевых фрагментов кДНК (RACE). Амплификацию осуществляли методом полугнездовой ПЦР со ступенчатым понижением температуры на

стадии отжига праймеров в первом раунде реакции. В результате амплификации 3'-концов кДНК с вырожденными праймерами № 1 и № 2 наблюдалось образование фрагмента длиной приблизительно 400 п.н., секвенирование которого позволило установить последовательность 3'-концевой области кДНК, включавшую в себя транскрируемую часть, соответствующую C-концевой области белка, стоп-кодон и нетранскрируемую область. С помощью ген-специфичных праймеров № 3 и № 4 был амплифицирован 5'-концевой фрагмент кДНК длиной 600 п.н., в результате секвенирования которого были установлены 5'-нетранскрируемая область, стартовый кодон и транскрируемая область, соответствующая сигнальному пептиду и зрелому белку Ag-LTP. Путем сопоставления результатов секвенирования 3'- и 5'-концевых фрагментов была установлена структура полноразмерной кДНК (код доступа в GenBank: **JF823967**), кодирующей предшественник Ag-LTP из 122 аминокислотных остатков и содержащей открытую рамку считывания длиной 366 п.н. (рис. 3). Анализ транскрибированной аминокислотной последовательности с помощью алгоритма SignalP v.3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) показал высокую вероятность наличия характерного для растительных LTP сигнального пептида, состоящего из 29 аминокислотных остатков.

Соответствие транскрибированной последовательности кДНК аминокислотной последовательности выделенного Ag-LTP было подтверждено путем проведения триптического гидролиза восстановленного белка. Рассчитанные с помощью приложения PeptideMass (http://web.expasy.org/peptide_mass/) молекулярные массы 8 триптических фрагментов Ag-LTP соответствовали массам фрагментов выделенного белка, определенных методом времяпролетной масс-спектрометрии МАЛДИ (рис. 4, табл. 1).

В результате нами была установлена полная аминокислотная последовательность нового липид-транспортирующего белка Ag-LTP и структура его предшественника. Зрелый Ag-LTP состоит из 93 аминокислотных остатков, включая 8 консервативно расположенных остатков цистеина, формирующих четыре дисульфидные связи, и имеет расчетную молекулярную массу 9524,6 Да (приложение PeptideMass http://web.expasy.org/peptide_mass/). Совпадение этой массы с экспериментальным значением m/z молекулярного иона, равным 9525,5, свидетельствует о стабилизации структуры выделенного белка четырьмя дисульфидными связями и об отсутствии иных посттрансляционных модификаций у липид-транспортирующего белка укропа.

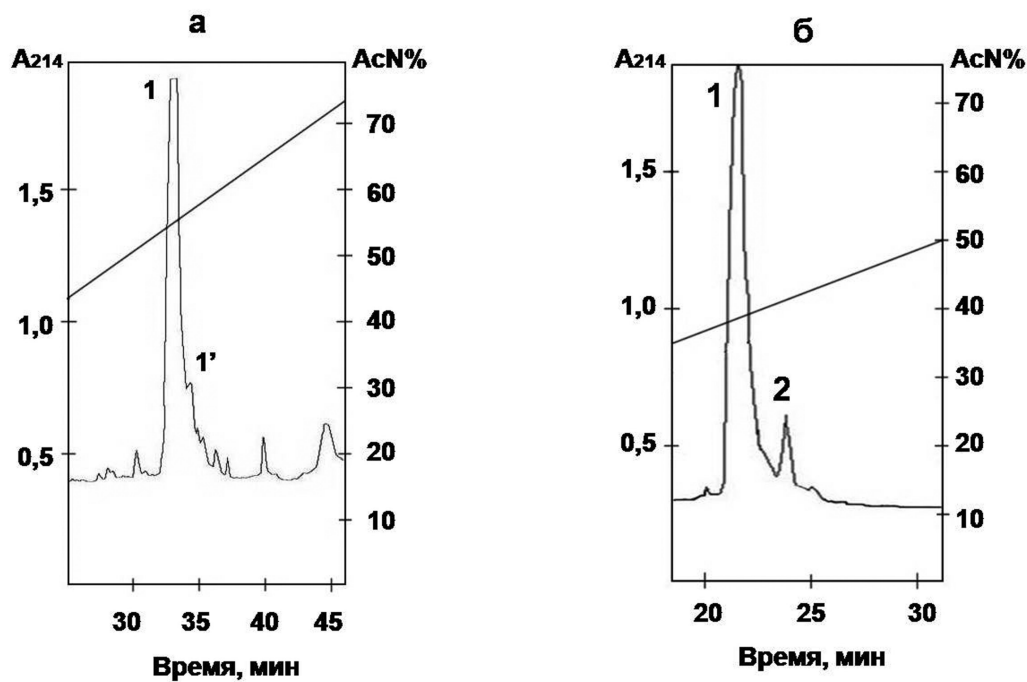


Рис. 1. ОФ-ВЭЖХ на колонках Диасфер-300-С₁₈ (а) (ЛТР присутствует в пике 1') и Luna С₁₈ (б) (ЛТР присутствует в пике 2)

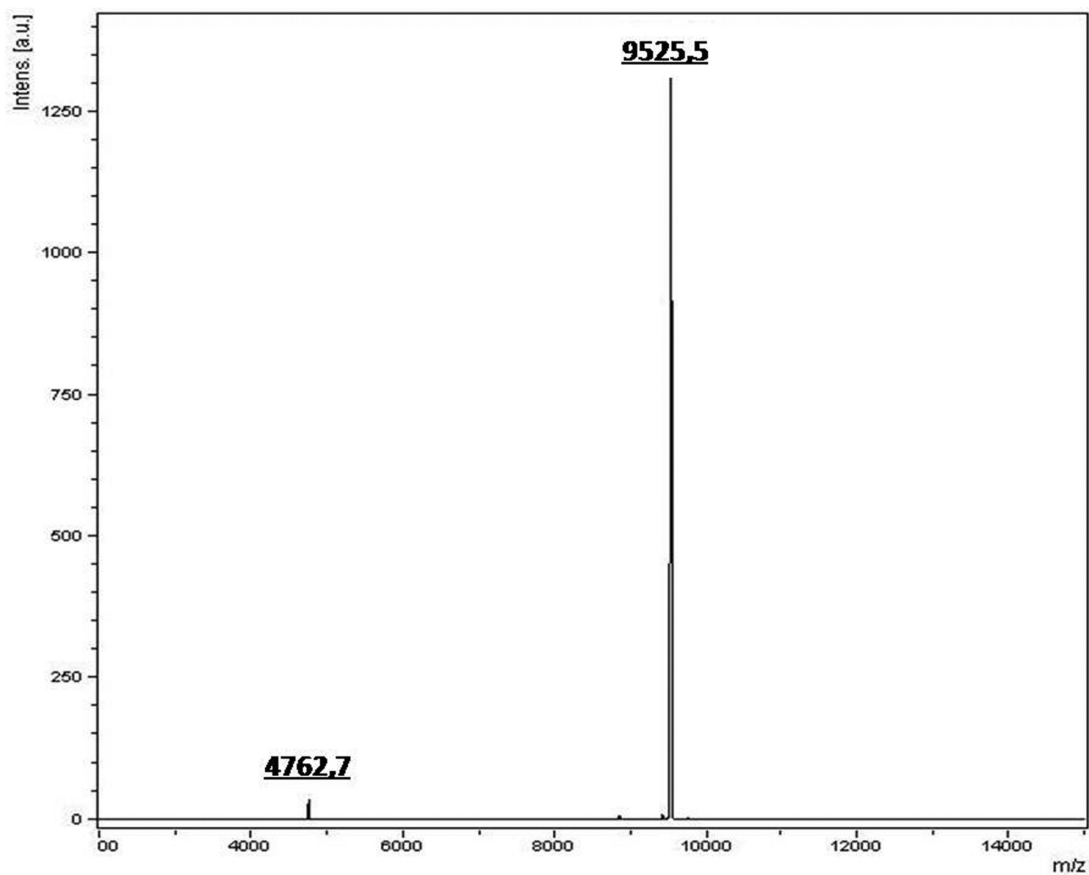


Рис. 2. Масс-спектрометрический анализ фракции 2, полученной при проведении ОФ-ВЭЖХ на колонке Luna С₁₈

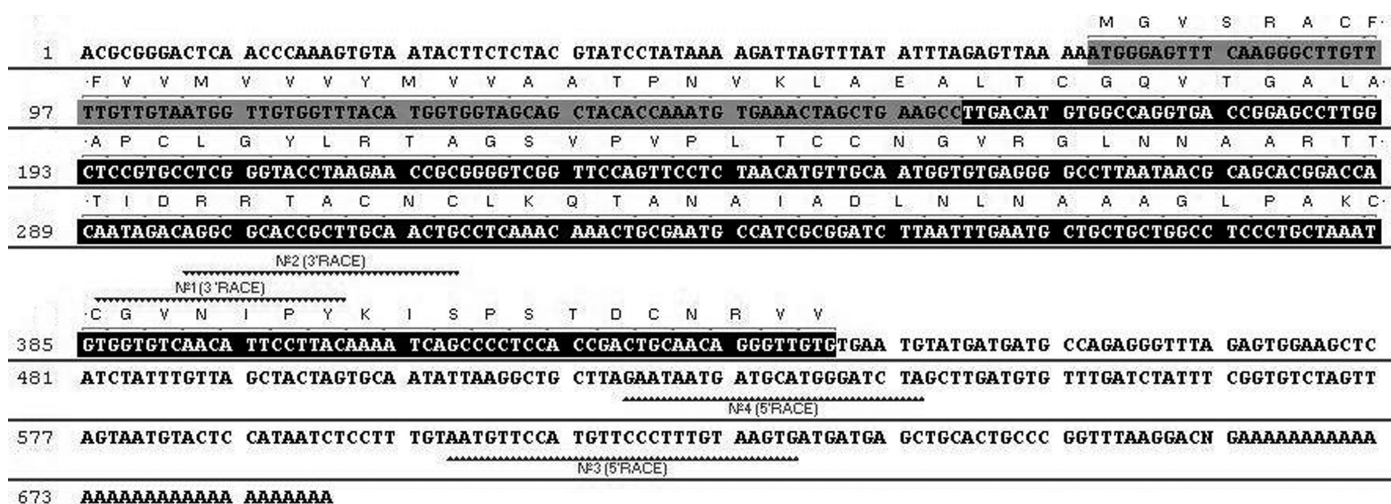


Рис. 3. Последовательность кДНК, кодирующая предшественник Ag-LTP, и соответствующая ей аминокислотная последовательность пребелка. Открытая рамка считывания включает сигнальный пептид (показан серым цветом) и зрелый белок (показан черным цветом). Показаны сайты отжига праймеров, использованных для амплификации концов кДНК

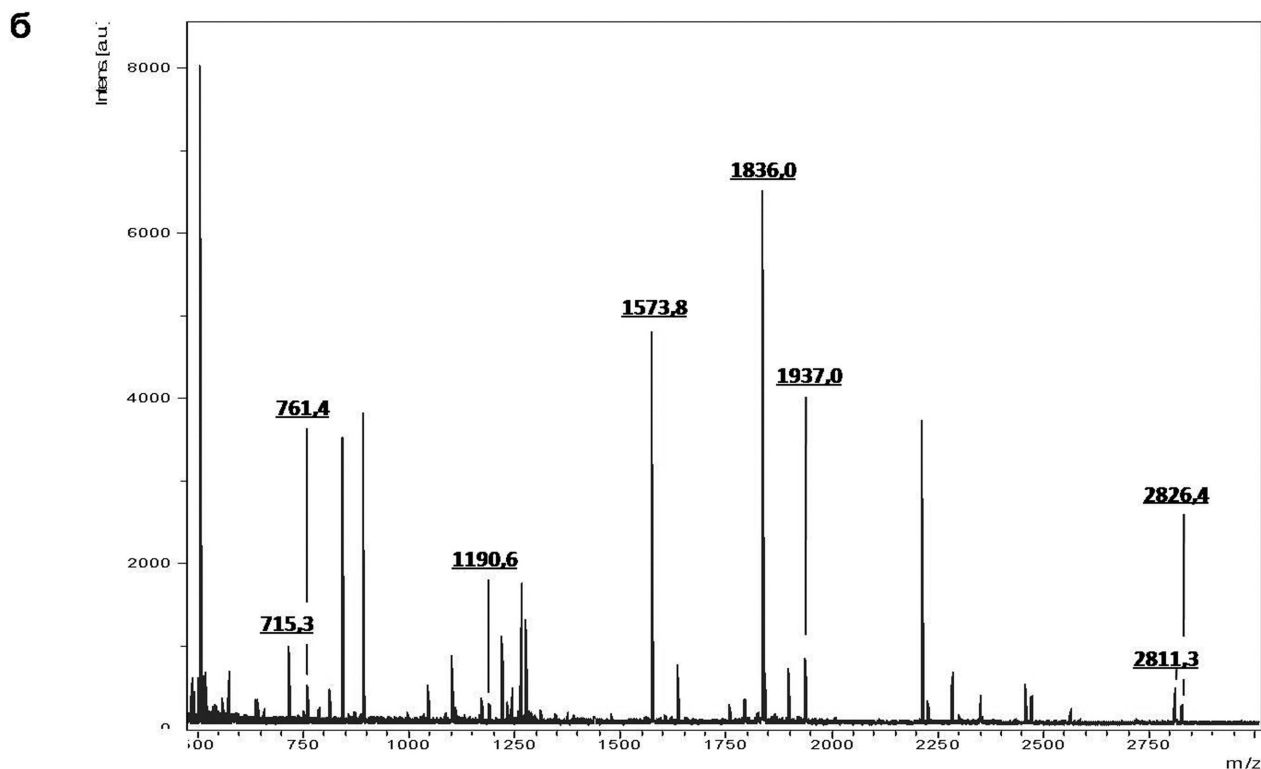
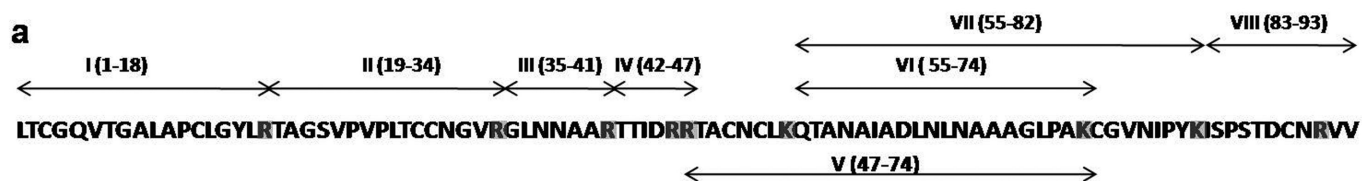


Рис. 4. Триптические фрагменты восстановленного Ag-LTP (а) (серым цветом выделены сайты расщепления) и масс-спектрометрический анализ триптического гидролизата выделенного белка (б)

Таблица 1
Сравнение расчетных и экспериментальных данных
о молекулярных массах триптических фрагментов
восстановленного Ag-LTP

Фрагмент	Молекулярная масса, Да	
	экспериментальная	расчетная
Ag-LTP	9524,5	9524,6
I	1835,0	1835,0
II	1572,8	1572,8
III	714,3	714,4
IV	760,4	760,4
V	2825,4	2825,4
VI	1936,0	1936,0
VII	2810,3	2810,5
VIII	1189,6	1189,6

Поиск в базах данных аминокислотных и нуклеотидных последовательностей (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) показал, что выделенный нами LTP укропа является не изученным ранее белком и четвертым представителем класса липид-транспортирующих белков из растений семейства зонтичных, для которых установлена полная аминокислотная последовательность. Ag-LTP укропа имеет наибольшее сходство с LTP из моркови обыкновенной *Daucus carota* (гомология составляет 86%). В структуре обнаруженного нами белка присутствует целый ряд консервативных аминокислотных остатков (Ala, Ile, Leu и Val), участвующих в формировании характерной для представителей данного класса белков гидрофобной впадины. Именно в этой гидрофобной полости находится сайт связывания липидных молекул. Для структуры Ag-LTP так же, как и для других липид-транспортирующих белков растений, характерно наличие консервативных остатков Tyr81 и Arg47. Согласно литературным данным, именно эти остатки участвуют во взаимодействии с полярной головкой липида, помещенного внутрь гидрофобной впадины белка [15] (рис. 5).

Гетерологичная экспрессия Ag-LTP, его выделение и очистка. Сконструированный нами плазмидный вектор pET-His8-TrxL-Ag-LTP (рис. 6) обеспечил достаточный уровень экспрессии гибридного белка в клетках *E. coli* (35 мг на 1 л культуры) за счет включения в него последовательности, кодирующей модифициро-

ванный тиоредоксин А (TrxL). Выбор данного белка в качестве носителя был обусловлен способностью тиоредоксина обеспечивать экспрессию гибридного белка в нативной форме. Возможность металлохелатной очистки гибридного белка была обеспечена введением в конструкцию N-концевой октагистидиновой последовательности. Для высвобождения целевого пептида из молекулы гибридного белка между последовательностями Ag-LTP и TrxL был введен остаток метионина, позволяющий проводить избирательное расщепление бромцианом.

Выделение и очистку рекомбинантного Ag-LTP проводили в несколько этапов (рис. 7). Клетки разрушали ультразвуком в буфере, содержащем ингибитор сериновых протеаз ФМСФ. Полученный в результате центрифугирования осветленный лизат наносили на колонку с Ni-NTA агарозой, после чего элюировали гибридный белок ступенчатым градиентом имидазола. Расщепление His8-TrxL-Ag-LTP проводили бромцианом в кислой среде, после чего продукты реакции разделяли с помощью повторной металлохелатной хроматографии. Финальную очистку рекомбинантного Ag-LTP осуществляли методом ОФ-ВЭЖХ на колонке Reprosil-Pur C₁₈-AQ. Идентичность полученного рекомбинантного Ag-LTP природному белку была подтверждена с использованием методов ОФ-ВЭЖХ на колонке Luna C₁₈, SDS-электрофореза, времяпролетной масс-спектрометрии МАЛДИ и автоматического микро-секвенирования по Эдману. Выход рекомбинантного Ag-LTP составлял не менее 1,5 мг/л культуры в пересчете на чистый белок.

Антимикробная активность. Антимикробную активность нового липид-транспортирующего белка укропа исследовали в отношении фитопатогенных бактерий и грибов. Результаты исследования показали, что Ag-LTP обладает умеренной противогрибковой активностью и не влияет в максимальной используемой концентрации (40 мкМ/л) на рост фитопатогенных бактерий (табл. 2). Наиболее чувствительной к Ag-LTP культурой является *Aspergillus niger*, возбудитель черной гнили растений. Известно, что антимикробное действие большинства растительных LTP характеризуется специфичностью и проявляется в отношении определенного спектра микроорганизмов. Более того, некоторые представители этого класса белков не влияют на рост микроорганизмов [7]. Возможно, мишенями антимикробного действия Ag-LTP являются фитопатогены, не используемые в данном исследовании, либо защита растения от инфекционных заболеваний не является основной функцией данного белка.

	10	20	30	40	50	60
<i>Anethum graveolens</i> L.	-LTCGQVTGALAPCLGYLRTAGSVPVPLTCCNGVRLNNAARTTIDRRRTACNCLKQTANA					
<i>Daucus carota</i>	VLTCGQVTGALAPCLGYLRSQVNVVPLTCCNVVRLNNAARTTLDKRTACGCLKQTANA					
<i>Citrus sinensis</i>	--TCGQVSGSLAPCIGFLRSGG--PIPMPCCVGRSLNAAARTTTPDRQTACNCLKQAAGS					
<i>Citrus jambhiri</i>	--TCGQVSSALAPCIFYLRRGG--PIPVPCCVGRSLNAAARTTTPDRQTACNCLKQAAGS					
<i>Morus nigra</i>	-ITCGQVSSSLAPCINYLRRGG--VVPANCCVGRSLNAAARTTADRQAACNCLKSAFNS					
<i>Lactuca sativa</i>	-VTCGQVVGAVAPCLGYLRNGG--TPPQPCCTGVRGLRRAARTTSDRRTICNCLKSASSS					
<i>Apium graveolens</i>	-LTCGQVTGKLGCLGYLKGGG-YPS-ACCGGVKGLNSLAKTPADRQAACACLKTLAGS					
<i>Lens culinaris</i>	AISCGAVTSDLSPLTYLTGGP-GPSP-QCCGGVKLLAAANTTADRQAACNCLKSAAGS					
<i>Brassica rapa</i>	ALSCGTVSGYVAPCIGYLAQGA-PALPRACCSGVTSLNNAARTTTPDRQAACRCLVGAANA					
<i>Lilium longiflorum</i>	-ITCGQVSDSLTSCIGYARKG--GVIPPGCCAGVRTLNNAARTTTPDRQTACNCLKSLVNP					

	70	80	90	И %
<i>Anethum graveolens</i> L.	IADLNLNAAAGLPAKCGVNIPIYKISPTDCNRVV			JF823967 100
<i>Daucus carota</i>	VTGLNLNAAAGLPARCGVNIPIYKISPTDCNRVV			AAB96834 86
<i>Citrus sinensis</i>	IPNLNLNAAAGLPGACGVSIPYKISTSTDCSKVR			CAH03799 70
<i>Citrus jambhiri</i>	IPNLNPNAVGLPRACGVSIPYKISISTDCSKV			BAH03575 69
<i>Morus nigra</i>	IKGLNLNLAAGLPGKCGVSVPIYKISPTDCSKVK			P85894 67
<i>Lactuca sativa</i>	YRGVSGNYAASLPGKCGVNLPIYKISPTDCNRIQ			ABK96812 67
<i>Apium graveolens</i>	VKGINYGAASALPGKCGIRIPYKISPSTDCSRVN			ACV04796 59
<i>Lens culinaris</i>	ITKLNNTNAAALPGKCGVNIPIYKISTTTNCNTVKF			AAH35807 58
<i>Brassica rapa</i>	FPTLNAAARAAGLPAKCGVNIPIYKISKTTCNSVK			ABM69132 58
<i>Lilium longiflorum</i>	SLGLNAAIVAGIPGKCGVNIPIYKIRMQTDCNKVR			AAD46683 57

Рис. 5. Сравнение аминокислотных последовательностей Ag-LTP и других представителей растительных LTP1. И % – процент идентичных аминокислотных остатков

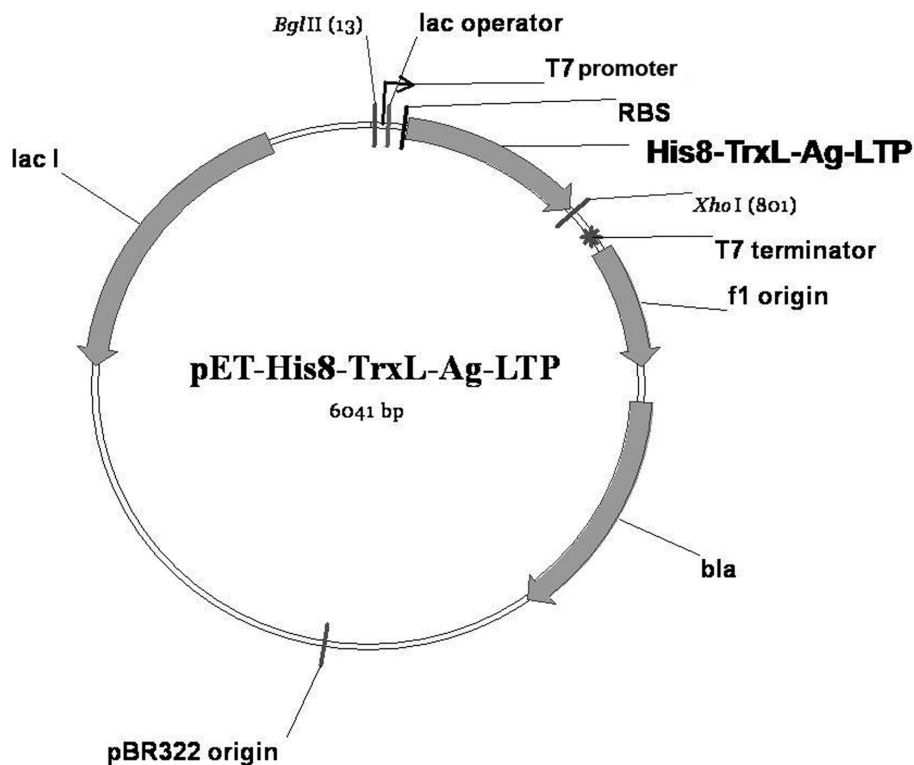


Рис. 6. Физическая карта рекомбинантной плазмиды pET-His8-TrxL-Ag-LTP. BglIII, XhoI – сайты рестрикции; pBR322 Ori – участок инициации репликации плазмиды; bla – ген устойчивости к β-лактамам антибиотикам; lacI – ген lac-репрессора; T7 promoter – промотор транскрипции; T7 terminator – терминатор транскрипции; lac operator – сайт связывания lac-репрессора; RBS – сайт связывания рибосомы; His8-TrxL-Ag-LTP – последовательность, кодирующая гибридный белок, включающий участок из восьми остатков гистидина (His8), модифицированный тиоредоксин А (TrxL) и липид-транспортирующий белок Ag-LTP

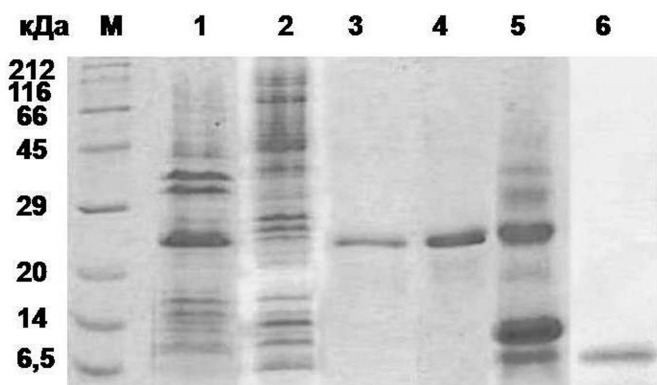


Рис. 7. Электрофоретический анализ процесса выделения и очистки рекомбинантного Ag-LTP: смесь белков-стандартов молекулярных масс (М); клеточный лизат (1); проскок (2) и элюат (3) после металлохелатной хроматографии; диализат (4); продукты расщепления гибридного белка (5); очищенный методом ОФ-ВЭЖХ рекомбинантный Ag-LTP (6)

Таблица 2
Антимикробная активность Ag-LTP

Фитопатогенные микроорганизмы	IC ₅₀ , мкМ/л
Бактерии	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> A281	—
<i>Clavibacter michiganensis</i> VKM Ac-1144	—
<i>Pseudomonas syringae</i> VKM B-1546	—
Грибы	
<i>Aspergillus niger</i> VKM F-2259	10–20
<i>Neurospora crassa</i> VKM F-184	>40

Заключение

В данной работе нами описаны выделение и очистка нового липид-транспортирующего белка из укропа огородного *Anethum graveolens* L., названного Ag-LTP. Белок обладает умеренной противогрибковой активностью. Разработанный способ получения рекомбинантного аналога Ag-LTP позволит провести дальнейшие структурно-функциональные исследования этого белка и расширить наши представления о физиологической роли липид-транспортирующих белков в растениях.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (соглашение № 8043

от 20.07.2012 г.) и Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 12-04-01224 и № 13-08-0956).

Литература

1. Akkerdaas J., Finkina E.I., Balandin S.V., Santos Magadan S., Knulst A., Fernandez-Rivas M., Asero R., van Ree R., Ovchinnikova T.V. Lentil (*Lens culinaris*) lipid transfer protein Len c 3: a novel legume allergen // International Archives of Allergy and Immunology. – 2012. – Vol. 157 (1). – P. 51–57.
2. Arondel V., Vergnolle C., Cantrel C. and Kader J.-C. Lipid transfer proteins are encoded by a small multigene family in *Arabidopsis thaliana*. // Plant Science. – 2000. – Vol. 157. – P. 1–12.
3. Buhot N., Douliez J.-P., Jacquemard A., Marion D., Tran V., Maume B.F., Milat M.L., Ponchet M., Mikes V., Kader J.C., Blein J.P. A lipid transfer protein binds to a receptor involved in the control of plant defense responses // FEBS. – 2001. – Vol. 509(1). – P. 27–30.
4. Carvalho A.O., Gomes V.M. Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology – a concise review // Peptides. – 2007. – Vol. 28. – P. 1144–1153.
5. Dharmaraj S., Yaw-Jen L., Chao-Sheng Ch. and Ping-Chiang L. Solution structure of plant nonspecific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). // The Journal of Biological Chemistry. – 2002. – Vol. 277(38). – P. 35267–35273.
6. Douliez J.-P., Michon T., Elmorjani K., Marion D. Mini review: Structure, biological and technological functions of lipid transfer proteins and indolines, the major lipid binding proteins from cereal kernels. // Journal of Cereal Science. – 2000. – Vol. 32. – P. 1–20.
7. Dubreil L., Gaborit T., Bouchet B., Gallant D.J., Broekaert W.F., Quillien L., et al. Spatial and temporal distribution of the major isoforms of puroindolines (puroindoline-a and puroindoline-b) and non-specific lipid transfer protein (ns-LTPe1) of *Triticum aestivum* seeds. Relationships with their in vitro antifungal properties // Plant Science. – 1998. – Vol. 138(2). – P. 121–135.
8. Garcia-Olmedo F., Molina F., Segura A., Moreno M. The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants // Trends in Microbiology. – 1995. – Vol. 3. – P. 72–74.
9. Gizatullina A.K., Finkina E.I., Mineev K.S., Melnikova D.N., Bogdanov I.V., Telezhinskaya I.N., Balandin S.V., Shenkarev Z.O., Arseniev A.S., Ovchinnikova T.V. Recombinant production and solution structure of lipid transfer protein from Lentil *Lens culinaris* // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2013. – Epub ahead of print.
10. Jung H.W., Kim W., Hwang B.K. Three pathogen-inducible genes encoding lipid transfer protein from pepper are differentially activated by pathogens, abiotic, and

- environmental stresses // *Plant Cell and Environment*. — 2003. — Vol. 26. — P. 783–975.
11. Kader J.-C. Lipid transfer proteins: a puzzling family of plant proteins. // *Trends Plant Science*. — 1997. — Vol. 2. — P. 662–670.
 12. Kielbowicz-Matuk A., Rey P., Rorat T. The organ-dependent abundance of a solanum lipid transfer protein is upregulated upon osmotic constraints and associated with cold acclimation ability // *Journal of Experimental Botany*. — 2008. — Vol. 59. — P. 2191–2203.
 13. Laemmli U.R. Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis // *Nature*. — 1970. — Vol. 227. — P. 680.
 14. Link K.F., Liu Y.N., Hsu S.T., Samuel D., Cheng C.S., Bonvin A. M., Ping-Chiang L. Characterization and structural analyses of nonspecific lipid transfer protein 1 from mung bean // *Biochemistry*. — 2005. — Vol. 44. — P. 5703–5712.
 15. Lullien-Pellerin V., Devaux C., Ihorai T., Marion D., Pahin V., Joudrier P., Gautier M.F. Production in *Escherichia coli* and site-directed mutagenesis of a 9-kDa nonspecific lipid transfer protein from wheat // *Eur. J. Biochem.* — 1999. — Vol. 260. — P. 861–868.
 16. Nieuwland J., Feron R., Huisman B.A., Fasolino A., Hilbers C.W., Derksen J. and Mariani C. Lipid transfer proteins enhance cell wall extension in tobacco // *Plant Cell*. — 2005. — Vol. 17. — P. 2009–2019.
 17. Ovchinnikova T.V., Shenkarev Z.O., Nadezhdin K.D., Balandin S.V., Zhmak M.N., Kudelina I.A., Finkina E.I., Kokryakov V.N., and Arseniev A.S. Recombinant expression, synthesis, purification, and solution structure of arenicin // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2007. — Vol. 360(1). — P. 156–162.
 18. Pascal M., Munoz-Cano R., Reina Z., Palacin A., Vilella R., Picado C., Juan M., Sanchez-Lopez J., Rueda M., Salcedo G., Valero A., Yague J., Bartra J. Lipid transfer protein syndrome: clinical pattern, cofactor effect and profile of molecular sensitization to plant-foods and pollens // *Clin. Exp. Allergy*. — 2012. — Vol. 42(10). — P. 1529–1539.
 19. Perrocheau L., Bakan B., Boivin P., Marion D. Stability of barley and malt lipid transfer protein 1 (LTP1) toward heating and reducing agents: relationships with the brewing process // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. — 2006. — Vol. 54. — P. 3108–3113.
 20. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second ed. — Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989.
 21. Schagger H., von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa // *Anal. Biochem.* — 1987. — Vol. 166. — P. 368–379.
 22. Segura A., Moreno M., Garcia-Olmedo F. Purification and antipathogenic activity of lipid transfer proteins (LTPs) from the leaves of *Arabidopsis* and spinach // *FEBS*. — 1993. — Vol. 332. — P. 243–246.
 23. Sterk P., Booij H., Schellekens G.A., Van Kammen A., De Vries S.C. Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene // *Plant Cell*. — 1991. — Vol. 3. — P. 907–21.
 24. Wang Sh.Y., Wu J.H., Ng T.B., Ye X.Y., Rao P.F. A non-specific lipid transfer protein with antifungal and antibacterial activities from the mung bean // *Peptides*. — 2004. — Vol. 25. — P. 1235–1242.
 25. Yeats T.H., Rose J.K. The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs) // *Protein Science*. — 2008. — Vol. 17. — P. 191–198.

A NOVEL LIPID TRANSFER PROTEIN FROM THE DILL *ANETHUM GRAVEOLENS* L.

D.N. MELNIKOVA, E.I. FINKINA, S.V. BALANDIN, T.V. OVCHINNIKOVA

Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

A new lipid transfer protein, exhibiting antifungal activity and called Ag-LTP, was purified from the dill *Anethum graveolens* L. leaves and stems. The molecular mass, complete amino acid sequence, and cDNA structure of Ag-LTP were determined. The recombinant plasmid was constructed for the expression of Ag-LTP-containing fusion protein in *E. coli* cells, and the method of purification was developed in order to produce the recombinant analog of this novel member of the plant LTP family.

Keywords: lipid transfer proteins, primary structure, plasmid vector, heterologous expression, recombinant analogue, dill.

МТЕI-ПЦР-АНАЛИЗ – НОВЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТАТУСА МЕТИЛИРОВАНИЯ GC-БОГАТЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ УЧАСТКОВ ГЕНОВ-ОНКОСУПРЕССОРОВ ЧЕЛОВЕКА

М.А. АБДУРАШИТОВ*, А.Н. КУКОВА, А.Г. АКИШЕВ, Е.В. ЗЕМЛЯНСКАЯ, С.Х. ДЕГТЯРЕВ

НПО «СибЭнзим», Новосибирск

Предложен новый метод MteI-ПЦР-анализа GC-богатых участков ДНК, основанный на уникальной метилзависимой сайт-специфической ДНК-эндонуклеазе MteI, имеющей протяженный высокометилированный сайт узнавания. Метод включает в себя гидролиз ДНК ферментом MteI с последующим проведением ПЦР либо в реальном времени, либо с определением полученных продуктов методом гель-электрофореза. Установлен статус метилирования регуляторных участков ряда генов-онкосупрессоров методом MteI-ПЦР-анализа в сравнении с ранее предложенным методом BlnI- и GluI-ПЦР-анализа. Показана применимость метода MteI-ПЦР-анализа для анализа статуса метилирования регуляторных участков генов SEBPD, HS3ST2, RASSF1A, SEPT9b и TWIST1. В случае гена RASSF1A real-time MteI-ПЦР-анализ, в отличие от real-time GluI- и BlnI-ПЦР-анализа, не обнаруживает метилирования регуляторного участка ДНК в здоровых клетках, что позволяет более четко определять и дискриминировать статус метилирования регуляторного участка как этого гена, так и, вероятно, ряда других GC-богатых участков ДНК человека.

Ключевые слова: метилзависимые сайт-специфические эндонуклеазы, метилирование ДНК, полимеразная цепная реакция.

Введение

За последние годы был открыт и охарактеризован целый ряд метилзависимых сайт-специфических ДНК-эндонуклеаз (МД-эндонуклеаз), расщепляющих короткие последовательности, содержащие 5-метилцитозин (5mC) и не гидролизующие неметилированную ДНК [3–9, 20]. Такая специфичность делает МД-эндонуклеазы удобным инструментом для изучения метилирования участков ДНК высших эукариот, геномы которых содержат значительные количества 5mC [1, 2, 10, 18].

Метилирование ДНК играет важную роль в регуляции генной активности эукариот. Регуляторные участки значительного числа генов высших организмов содержат так называемые CpG-островки, метилирование CpG-пар внутри которых подавляет экспрессию этих генов [11, 13, 15]. Особый интерес исследователей вызывает модификация регуляторных областей ге-

нов-онкосупрессоров, так как она является основным эпигенетическим маркером при диагностике раковых заболеваний [12, 16, 17, 19].

Ранее нами был описан простой метод определения статуса метилирования участков ДНК с помощью МД-эндонуклеаз GluI и BlnI – метод GluI- и BlnI-ПЦР-анализа [1, 2]. Известно, что de novo метилирование ДНК в клетках млекопитающих и человека осуществляется ДНК-метилтрансферазами DNMT3a и DNMT3b, модифицирующими цитозин в обеих цепях сайта RCGY с образованием последовательности 5'-R(5mC)GY-3'/3'-YG(5mC)R-5' [14]. При этом МД-эндонуклеаза GluI узнает именно сайт 5'-R(5mC)GY-3'/3'-YG(5mC)R-5', что делает ее удобным инструментом для выявления метилированных de novo сайтов в ДНК. В свою очередь, BlnI расщепляет последовательность 5'-R(5mC)GYNR(5mC)GY-3'/3'-YG(5mC)RNYG(5mC)R-5', представляющую собой два метилированных сайта, разделенных одним нуклеотидом. Метод GluI- и BlnI-ПЦР-анализа [2] заключается в расщеплении геномной ДНК МД-эндонуклеазой с последующей амплификацией исследуемой области генома. При наличии в ней указанных метилированных участков они расщепляются ферментами GluI и BlnI, соответственно, и их амплификации в ПЦР не происходит. Неметилированные участки ДНК после

© 2013 г. Абдурашитов М.А., Кукова А.Н., Акишев А.Г., Землянская Е.В., Дегтярев С.Х.

* **Автор для переписки:**

Абдурашитов Мурат Абдурашитович

НПО «СибЭнзим»

630117 Новосибирск-117, ул. Академика Тимакова, 2/12

E-mail: abd@sibenzyme.ru

обработки МД-эндонуклеазами остаются интактными, и амплификация с них проходит успешно.

Одной из наиболее интересных МД-эндонуклеаз является фермент MteI, который, в отличие от остальных ферментов этого типа, узнает протяженную и высокометилированную последовательность ДНК [3]. Такая уникальная субстратная специфичность может быть использована для определения статуса метилирования GC-богатых участков ДНК методом MteI-ПЦР-анализа, заключающимся в гидролизе исследуемой ДНК ферментом MteI и последующем ПЦР-анализе интересующего участка.

Целью настоящей работы явилось определение статуса метилирования GC-богатых участков регуляторных областей ряда генов-онкосупрессоров методом MteI-ПЦР-анализа.

Материалы и методы

Гидролиз ДНК клеточных культур человека. В качестве субстратов для ПЦР использовались препараты ДНК, выделенной из одной контрольной немалигнантной

клеточной линии L-68 (легочные фибробласты) и четырех малигнантных клеточных линий: Raji (лимфома Беркитта), U-937 (гистиоцитарная лимфома), HeLa (аденокарцинома шейки матки) и Jurkat (Т-лимфобластная лейкемия). Геномная ДНК из линий клеток человека, эндонуклеаза рестрикции HaeIII, метилзависимые сайт-специфические ДНК-эндонуклеазы BlnI, GluI и MteI, а также HotStart-Taq-ДНК-полимераза – производства компании «СибЭнзим» (Новосибирск, Россия).

0,1 мкг ДНК инкубировали в 30 мкл реакционной смеси, содержащей либо 100 единиц активности (ед. акт.) HaeIII, либо 16 ед. акт. BlnI, либо 16 ед. акт. GluI в реакционном буфере, рекомендованном производителем, с добавлением 0,1 мкг/мкл BSA при температуре 37 °С (для HaeIII), 30 °С (BlnI и GluI) и 55 °С (MteI) в течение 2 ч. После инкубации ферменты инактивировались путем прогрева (80 °С для HaeIII и MteI, 65 °С – в случае BlnI и GluI) в течение 20 мин. 1 мкл реакционной смеси, содержащей 3,3 нг ДНК, использовали в ПЦР.

Проведение ПЦР. Для проведения ПЦР использовали праймеры, указанные в таблице 1.

Таблица 1

Структура праймеров и амплифицируемые участки генома человека

Регуляторный участок гена	Хромосома	Координаты участка по сборке GRCh37/hg19	Длина фрагмента, п.н.	Прямой и обратный праймеры
MGMT	10	131265230–131265585	356	GGCGTGCCGGCGTCCAGCG GGAGCGAGGCGACCCAGACACTCACC
RASSF2	20	4803816–4804239	424	GCGAGAGAAAAGAGAGGACAGCGGACGAGC CAGCCGGGGTAGGGACCATCGTGGA
RARB	3	25469693–25470545	853	CCGGGTAGGGTTCACCGAAAGTTCACCTCGC TCAGCAAAGGGAATCAATATGCATGCCAGC
RASSF1A	3	50378209–50378593	385	CCGGATGTGGGGACCCTCTTCCTCTAGC GCTCAATGAGCTCAGGCTCCCCCGAC
SFRP1	8	41166416–41167262	847	CCGCCCTGGTCTCTCTCC GCCATGGTCTCGTGCTCC
CEBPD	8	48650692–48651032	341	CCTGGAGTGCTGGCAGAGGGAGTGTC GGGCCGGGCTCTGCGTCCAA
CEBPD	8	48650593–48651032	440	CCTGGAGTGCTGGCAGAGGGAGTGTC CGCCCGGCCCGGTTCGTAGAA
HS3ST2	16	22825348–22826048	701	GCTGTGTTTCTGGGAGGGGTA GCACAGGAAGCTGTAACACAGGTA
TWIST1	7	19156756–19157957	1202	CGAGAGAGCAGGCCGGGACGCAA GCCGCCCTCCGACGCCCCCA
RASSF1A	3	50377790–50378239	450	CTGTGGCCCAGATACGAGTGGAGTGCCGAC GCCATGTCCGGGGAGCCTGAGCTCA
SEPT9b (1)	17	75369017–75369448	432	CTGCCCCAATACAGCCTCCTGCAGAAGG CCCTAGGCCCCCTGGCTCAGCTG
SEPT9b (2)	17	75369405–75369601	197	CGCCTTCCTCCCCATTCATTCAGCTG CGTTGACCGCGGGGTCCGACATG
SEPT9b (3)	17	75369557–75369955	399	CGACCCGCTGCCACCAGCCATC CGAGGAGGTCGCTGTGCTTGCA

**Структура праймеров и зондов для амплифицируемых участков генома человека
в режиме реального времени**

Регуляторный участок гена	Хромосома	Координаты участка по сборке GRCh37/hg19	Длина фрагмента, п.н.	Прямой, обратный праймеры и флуоресцентно меченный зонд
RASSF1A	3	50378020–50378236	217	ATGTCGGGGGAGCCTGAG AGATGAAGTCGCCACAGAGGTC FAM-TGCCAGCTCCCGCAGCTCAAT-BHQ1
SEPT9b	17	75369721–75369840	120	GGGAGACGGGAGTGCGCTGAGG GCCCCAACAGGGTCCCCCACGCTAG FAM-CCCTCCCGCTGAGAGCGCCG-BHQ1

Реакции амплификации проводили в 20 мкл реакционной смеси следующего состава: 1× буфер AS, 1× стабилизатор, 0,2 мМ каждого dNTP, 2 мМ MgCl₂, 0,4 мкМ каждого праймера, 4% DMSO (в случае регуляторного участка гена RARB DMSO не добавляли), 0,8 ед. акт. HotStart Taq-ДНК полимеразы, 3,3 нг гидролизованной или негидролизованной геномной ДНК. Все перечисленные компоненты реакционной смеси — производства компании «СибЭнзим» (Новосибирск, Россия).

ПЦР проводили в приборе C1000 Thermal Cycler («BioRad», США). Проводили предварительный прогрев 3 мин. при 95 °С, затем 38 циклов амплификации: плавление — 96 °С, 20 сек.; отжиг — при температуре на 3–5 °С меньшей, чем температура плавления праймеров, 20 сек.; элонгация — 72 °С в течение 20–70 сек. (в зависимости от длины амплифицируемого фрагмента).

Для проведения ПЦР в реальном времени использовали праймеры и зонды, указанные в таблице 2.

ПЦР в реальном времени проводили в приборе CFX96 Real-Time System («BioRad», США). Реакция с каждой матричной ДНК (гидролизованной или негидролизованной) проводилась в трех повторах. Использовалась программа амплификации: предварительный прогрев при 95 °С в течение 5 мин., затем 45 циклов амплификации: плавление — 95 °С, 10 сек.; отжиг — 61 °С, 30 сек. и элонгация — 72 °С, 20 сек. Анализ данных и их обработка осуществлялись с помощью программ Bio-Rad CFX Manager v.2.1 и Microsoft Excel 2010.

Результаты и обсуждение

В таблице 1 представлен список регуляторных областей девяти генов-онкосупрессоров, статус метилирования которых определялся методом Glal- и BslI-ПЦР-анализа, а также методом MteI-ПЦР-анализа, включающим в себя гидролиз ДНК ферментом MteI с последующей амплификацией исследуемой области генома. В таблице указаны

хромосомная локализация и координаты исследуемых участков ДНК, представлена структура использованных праймеров и приведены длины получаемых ампликонов. В случае гена SEBPD изучались короткий и расширенный варианты регуляторной области, в случае гена SEPT9b определялся статус метилирования трех отдельных участков регуляторной области, а в случае гена RASSF1A — двух отдельных участков.

В качестве субстрата мы использовали ДНК клеточных линий L-68 и Raji, которые расщеплялись МД-эндонуклеазами Glal, BslI и MteI. Выбор данных клеточных линий обусловлен тем, что ДНК из клеток L-68, как правило, не содержит метилированных цитозинового остатков в регуляторных участках ранее изучавшихся нами генов-онкосупрессоров, в то время как ДНК из клеток Raji, напротив, в подавляющем большинстве случаев метилирована в этих областях [1]. Как положительный и отрицательный контроли (на наличие или отсутствие расщепления ДНК) мы использовали NaеIII-гидролизат ДНК и исходную ДНК, соответственно. Амплификацию полученных гидролизатов и контрольной ДНК проводили, как описано в методах.

На рисунке 1 даны электрофореграммы, полученные после разделения в геле фрагментов ДНК, амплифицированных с выбранных регуляторных участков геномной ДНК, гидролизованной различными эндонуклеазами.

Как видно из рисунка 1, МД-эндонуклеазы гидролизуют большую часть анализируемых участков в ДНК клеточной линии Raji, в то время как контрольная ДНК L-68 ими не расщепляется. Данные по гидролизу ДНК Raji сведены в таблицу 3. В таблице 3 также представлено количество сайтов RCGY, RCGYNRCGY и GCGCNGCGC, расположенных в изучаемых участках. В случае метилирования DNMT3a или DNMT3b первые две последовательности становятся сайтами узнавания Glal и BslI, соответственно. Сайт GCGCNGCGC является минимальным сайтом узнавания MteI при наличии в нем шести 5-метилцитозинов [3].

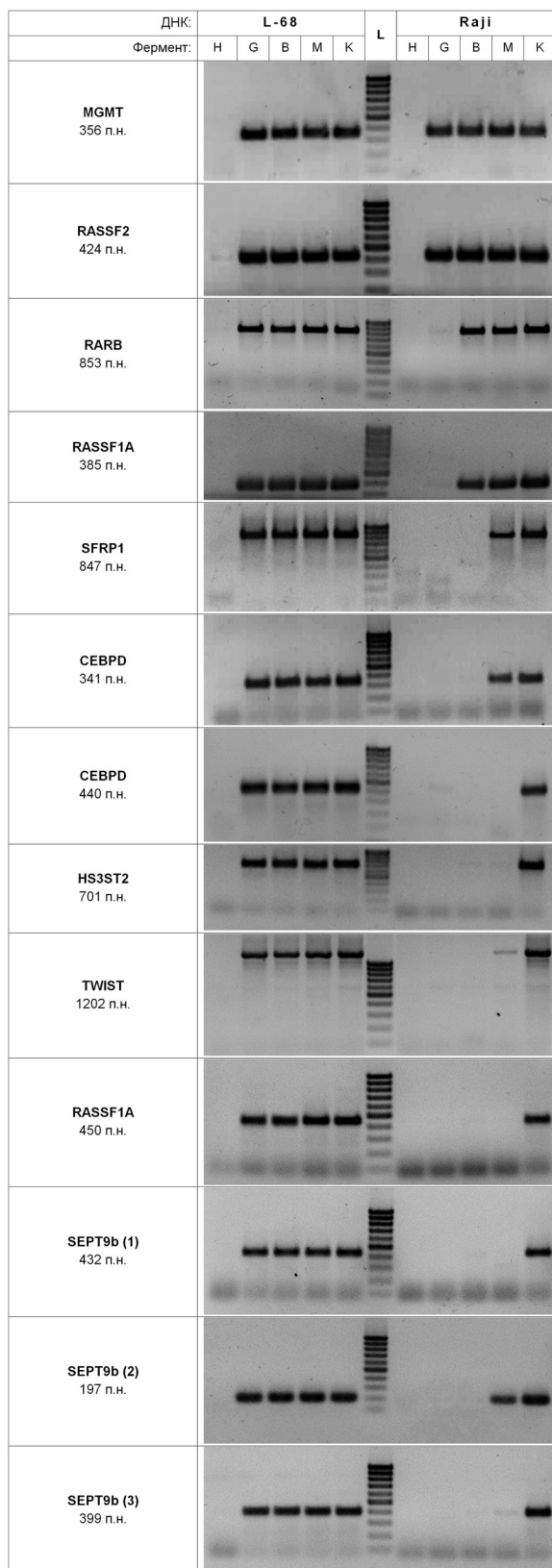


Рис. 1. Результаты *GlaI*-, *BlsI*- и *MteI*-ПЦР-анализа регуляторных участков генов-онкосупрессоров. Обозначения дорожек: гидролизаты Н – *HaeIII*, G – *GlaI*, B – *BlsI*, M – *MteI*; K – ДНК без обработки эндонуклеазой; L – маркер длин фрагментов 100 бр («СибЭнзим», Россия)

Как видно из рисунка 1 и таблицы 3, в случае регуляторных участков генов *MGMT* и *RASSF2* наблюдается образование соответствующих ПЦР-продуктов после гидролиза ДНК ферментами *GlaI*, *BlsI* и *MteI*, что соответствует отсутствию метилирования по сайтам *RCCGY*. Для регуляторного участка гена *MGMT* отсутствие метилирования в ДНК клеточной линии *Raji* было показано ранее [1]. Регуляторные участки генов *RARB* и *RASSF1A* в ДНК *Raji* расщепляются лишь *GlaI*, а *BlsI* и *MteI* не гидролизуют ДНК на этих участках в связи с отсутствием соответствующих сайтов узнавания на данных участках. Регуляторный участок гена *SFRP1*, короткий фрагмент регуляторного участка гена *CEBPD* (341 п.н.) и второй участок регуляторной области гена *SEPT9b* (197 п.н.) расщепляются ферментами *GlaI* и *BlsI*, однако гидролиз этих фрагментов МД-эндонуклеазой *MteI* затруднен. Как можно видеть, в структуре сайтов узнавания *MteI*, находящихся в этих участках, присутствует только 4 цитозина, метилируемых *DNMT3a* и *DNMT3b*, что недостаточно для полного гидролиза ферментом указанных метилированных сайтов. В более длинном фрагменте регуляторного участка гена *CEBPD* (440 п.н.) присутствуют три сайта *NGCGCNGCGCN*, один из которых содержит 8 метилируемых цитозинов, и такой метилированный сайт является хорошим субстратом *MteI* [3]. Один из сайтов *NGCGCNGCGCN* в регуляторном участке гена *TWIST* содержит 6 метилируемых цитозинов, и такой метилированный сайт также полностью расщепляется всеми тремя МД-эндонуклеазами. Ситуация, аналогичная гену *TWIST*, наблюдается в случае регуляторного участка гена *RASSF1A* (450 п.н.), а также первого и третьего участков регуляторной области гена *SEPT9b* (432 и 399 п.н., соответственно), которые полностью расщепляются *MteI*. Анализ первичной структуры регуляторной области гена *HS3ST2* выявил только один сайт *NGCGCNGCGCN*, который содержит всего 4 метилируемых цитозина и вследствие этого является плохим субстратом *MteI*. Однако эксперимент (см. рис.1) показал, что данный фрагмент ДНК полностью расщепляется *MteI*. Дальнейшие исследования по установлению первичной структуры регуляторной области гена *HS3ST2* в клетках *Raji* и прямое определение «узора» метилирования в сайте *NGCGCNGCGCN* должно выявить последовательность ДНК, гидролизуемую ферментом *MteI*.

Полученные результаты показывают, что *MteI*-ПЦР-анализ позволяет определить статус метилирования регуляторных участков генов-онкосупрессоров, содержащих в последовательности *NGCGCNGCGCN* шесть и более 5-метилцитозинов, и может быть использован при анализе гиперметилированных участков ДНК.

Результаты определения статуса метилирования регуляторных участков генов-онкосупрессоров в ДНК клеточной линии Raji методом Glal-, BslI- и MteI-ПЦР-анализа

Регуляторный участок гена (длина ПЦР-продукта)	Количество сайтов узнавания / результат гидролиза ферментом			Структура сайтов NNGCGCNGCGCNN в изучаемом регуляторном участке и число цитозинов, метилируемых DNMT3
	RCGY/GlaI гидролиз	RCGYN-RCGY/BslI гидролиз	GCGCNGC-GC/MteI гидролиз	
MGMT (356 п.н.)	16/-	-/-	-/-	-
RASSF2 (424 п.н.)	13/-	-/-	-/-	-
RARB (853 п.н.)	4/+	-/-	-/-	-
RASSF1A (385 п.н.)	7/+	-/-	-/-	-
SFRP1 (847 п.н.)	28/+	1/+	1/(-/+)	5'-GGGCGCGCGCGCTT-3' (4) 3'-CCC <u>CGCGCGCG</u> CAA-5'
CEBPD (341 п.н.)	11/+	1/+	1/(-/+)	5'-CAGCGCAGCGCAG-3' (4) 3'-GT <u>CGCGT</u> CGCGTC-5'
CEBPD (440 п.н.)	19/+	3/+	3/+	5'-CAGCGCAGCGCAG-3' (4) 3'-GT <u>CGCGT</u> CGCGTC-5' 5'-GAGCGCGCGCGCTC-3' (4) 3'-CT <u>CGCGCGCG</u> CAG-5' 5'-GCGCGCGCGCGCGC-3' (8) 3'-CGCGCGCGCGCGCG-5'
HS3ST2 (701 п.н.)	29/+	2/+	1/+	5'-GGGCGCGCGCGCGG-3' (4) 3'-CCC <u>CGCGCGCG</u> CC-5'
TWIST (1202 п.н.)	28/+	2/+	2/+	5'-CGGCGCGCGCGCGC-3' (6) 3'-GCCGCGCGCGCGCG-5' 5'-AGGCGCAGCGCGG-3' (4) 3'-TCCGCGT <u>CGCG</u> CC-5'
RASSF1A (450 п.н.)	19/+	1/+	1/+	5'-ACGCGCTGCGCAT-3' (6) 3'-TGCGCGACCGCTA-5'
SEPT9b (1-432 п.н.)	10/+	1/+	1/+	5'-GGGCGCAGCGCGC-3' (6) 3'-CCC <u>CGCGT</u> CGCGCG-5'
SEPT9b (2-197 п.н.)	7/+	1/+	1/(-/+)	5'-GGGCGCGCGCGCCC-3' (4) 3'-CCC <u>CGCGCGCG</u> GG-5'
SEPT9b (3-399 п.н.)	16/+	1/+	1/+	5'-GAGCGCGCGCGCGC-3' (6) 3'-CTCGCGCGCGCGCG-5'

Примечание: * Последовательность GCGCNGCGC подчеркнута. Серым цветом выделены цитозины, метилируемые ферментами DNMT3a или DNMT3b

Ранее нами было предложено использовать Glal- и BslI-ПЦР-анализ для идентификации малигнанных клеточных линий человека, так как они отличаются по статусу метилирования регуляторных участков известных генов-онкосупрессоров [1]. При лабораторном культивировании часто происходит загрязнение клеточных линий другими клетками и «вырождение» культур клеток, приводящее к утра-

те нужной линии или ее исходных свойств. Заранее определенный профиль метилирования ряда участков ДНК может служить эпигенетической характеристикой линии клеток. Для этой цели, наряду с Glal- и BslI-ПЦР-анализом, может быть использован MteI-ПЦР-анализ.

С помощью MteI-ПЦР-анализа мы провели определение статуса метилирования сайта

NGCGCNGCGCN в регуляторных участках генов RASSF1A и SEPT9b (см. табл. 3) для ДНК из четырех малигнанных клеточных линий Raji, U-937, HeLa и Jurkat, а также из контрольных клеток L-68. Координаты амплифицируемых участков в геноме, длины ПЦР-продуктов и структуры использовавшихся праймеров приведены в таблице 1.

Полученные результаты представлены на рисунке 2. Как видно из этого рисунка, Glal-, BslI- и MteI-ПЦР-анализ дает одинаковые результаты при определении статуса метилирования регуляторных участков генов RASSF1A и SEPT9b(3). Исследуемые районы этих двух генов расщепляются ферментами Glal, BslI и MteI в ДНК клеток Raji и не гидролизуются в ДНК контрольной клеточной линии L-68.

В то же время Glal-, BslI- и MteI-ПЦР-анализ гена RASSF1A дал положительный результат в ДНК клеточной линии Jurkat, тогда как в случае гена SEPT9b(3) гидролиз ДНК происходит в клеточных линиях U-937 и HeLa и не происходит в клетках Jurkat. Полученные результаты соответствуют ранее опубликованным данным [1]. Таким образом, MteI-ПЦР-анализ, наряду с Glal- и BslI-ПЦР-анализом, может также использоваться для типирования малигнанных клеточных линий.

В последнее время метод real-time ПЦР все шире применяется как в научных исследованиях, так и в клинической работе, вытесняя метод электрофоретического анализа ПЦР-продуктов из повседневной практики. В связи с этим мы также провели real-time Glal-, BslI- и MteI-ПЦР-анализ регуляторных участков генов RASSF1A и SEPT9b(3). Структуры использовав-

шихся праймеров и флуоресцентно меченных зондов и координаты амплифицируемых участков приведены в таблице 2. Полученные данные после статистической обработки были использованы для построения диаграмм, показывающих степень гидролиза различных амплифицируемых участков. Результаты real-time Glal-, BslI- и MteI-ПЦР-анализа представлены на рисунке 3. Полученные данные достаточно хорошо согласуются с результатами электрофоретического анализа, описанными выше (см. рис. 2). Как видно из рисунка 3, гидролиз указанных фрагментов ДНК Raji всеми тремя ферментами происходит практически полностью. Однако, если MteI практически не расщепляет сайт NGCGCNGCGCN в исследуемых фрагментах ДНК контрольной клеточной линии L-68, то Glal и BslI гидролизуют регуляторный участок гена RASSF1A в ДНК L-68 на 20 и 15%, соответственно, что говорит о частичном метилировании сайтов RCGY в этом участке в ДНК контрольной линии фибробластов.

При этом, согласно результатам real-time Glal- и BslI-ПЦР-анализа, регуляторный участок гена RASSF1A не метилирован в клетках HeLa и U-937, в которых данный ген так же активен, как и в контрольной клеточной линии L-68.

Таким образом, в случае гена RASSF1A real-time MteI-ПЦР-анализ, в отличие от real-time Glal- и BslI-ПЦР-анализа, не показывает метилирования данного участка ДНК в здоровых клетках, что позволяет более четко определять и дискриминировать статус метилирования регуляторного участка как этого гена, так и, вероятно, ряда других GC-богатых участков ДНК человека.

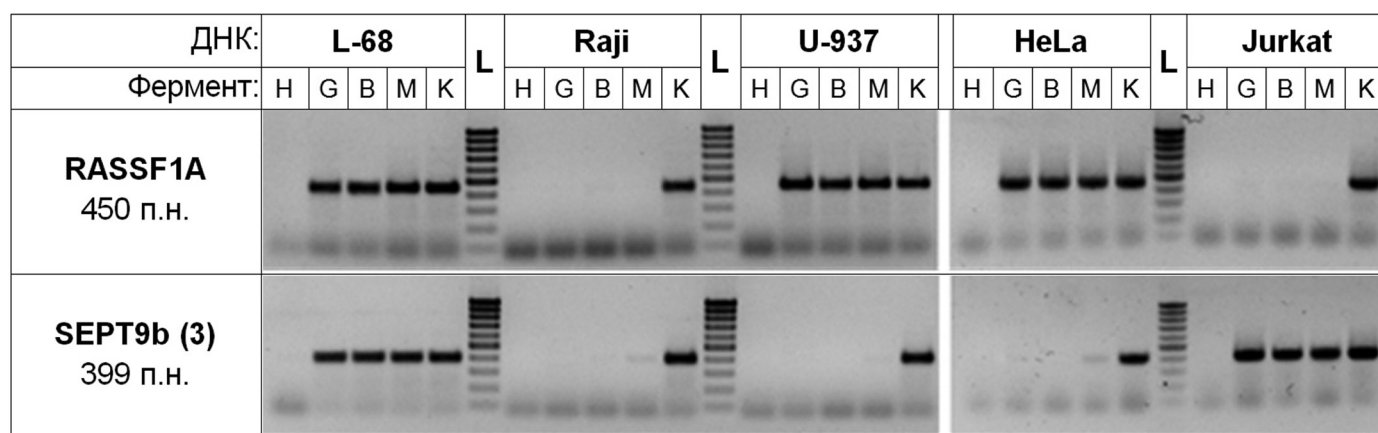
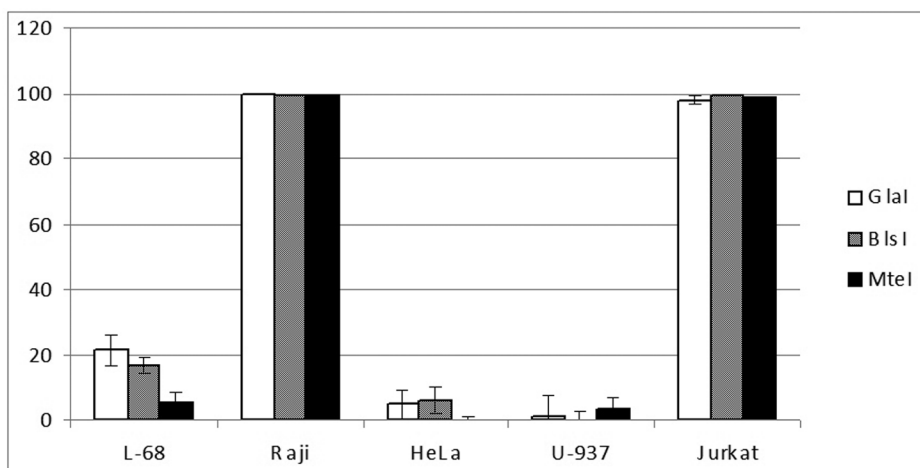
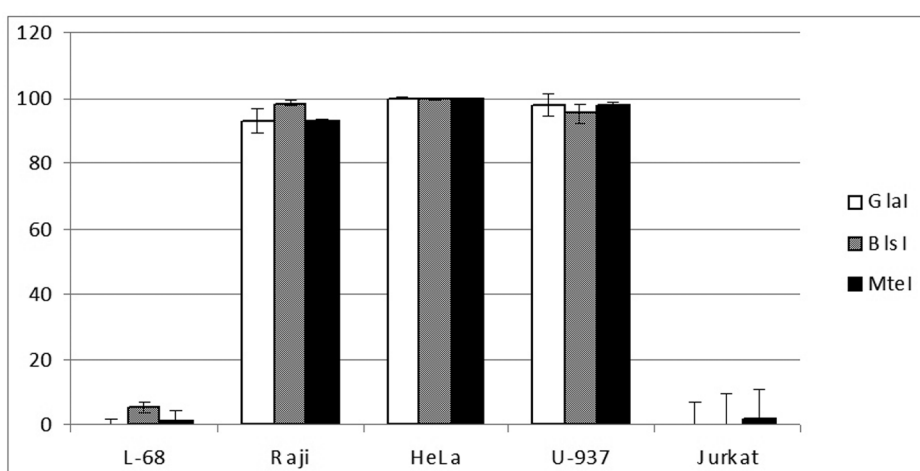


Рис. 2. ПЦР-продукты, образующиеся при амплификации частей регуляторных участков генов-онкосупрессоров после обработки эндонуклеазами. Обозначения дорожек — как на рисунке 1



RASSF1A

217 п.н.



SEPT9b (3)

120 п.н.

Рис. 3. Степень гидролиза коротких участков ДНК по данным ПЦР в реальном времени. По оси ординат показан процент гидролизованных участков

Заключение

Таким образом, в настоящем исследовании предложен новый метод MteI-ПЦР-анализа GC-богатых участков ДНК, основанный на уникальной метилзависимой сайт-специфической ДНК-эндонуклеазе MteI, имеющей протяженный высокометилированный сайт узнавания.

Был определен статус метилирования регуляторных участков ряда генов-онкосупрессоров методом MteI-ПЦР-анализа в сравнении с ранее предложенным методом B I s I- и G I a l-ПЦР-анализа. Метод MteI-ПЦР-анализа применим для анализа статуса метилирования регуляторных участков генов SEBPD, HS3ST2, RASSF1A, SEPT9b и TWIST1.

Показана эффективность real-time MteI-ПЦР-анализа при определении и дискриминации статуса метилирования регуляторного участка гена RASSF1A.

Авторы выражают благодарность Чернухину В.А. и Гончару Д.А. за консультации и помощь.

Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации по государственному контракту № 14.512.11.0080 от 20.06.2013 г., заключенному в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы».

Литература

1. Акишев А.Г., Гончар Д.А., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х. Эпигенетическое типирование малигнанных клеточных линий человека с помощью B I s I- и G I a l-ПЦР-анализа // Вестник биотехнологии и физико-химической

- биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2011. — Т. 7. — № 3. — С. 5–16.
2. Гончар Д.А., Акишев А.Г., Дегтярев С.Х. *BlsI*- и *GlaI*-ПЦР-анализ — новый метод исследования метилированных участков ДНК // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2010. — Т. 6. — № 1. — С. 5–12.
 3. Чернухин В.А., Гончар Д.А., Килева Е.В., Соколова В.А., Голикова Л.Н., Дедков В.С., Михненко Н.А., Дегтярев С.Х. Новая метилзависимая сайт-специфическая ДНК-эндонуклеаза *MteI* расщепляет девятинуклеотидную последовательность 5'-G(5mC)G(5mC)NG(5mC)GC-3' / 3'-CG(5mC)GN(5mC)G(5mC)G-5' // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2012. — Т. 8. — № 1. — С. 16–26.
 4. Чернухин В.А., Килева Е.В., Томилова Ю.Э., Болтенгаген А.А., Дедков В.С., Михненко Н.А., Гончар Д.А., Голикова Л.Н., Дегтярев С.Х. Новая метил-зависимая сайт-специфическая эндонуклеаза *KroI* узнает и расщепляет последовательность ДНК 5'-G[^]C(5mC)GGC-3' // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2011. — Т. 7. — № 1. — С. 14–20.
 5. Чернухин В.А., Наякина Т.Н., Абдурашитов М.А., Томилова Ю.Э., Мезенцева Н.В., Дедков В.С., Михненко Н.А., Гончар Д.А., Дегтярев С.Х. Новая эндонуклеаза рестрикции *GlaI* узнает метилированную последовательность 5'G(m5C)[^]GC-3' // Биотехнология. — 2006. — № 4. — С. 23–28.
 6. Чернухин В.А., Наякина Т.Н., Гончар Д.А., Томилова Ю.Э., Тарасова М.В., Михненко Н.А., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Новая сайт-специфическая метилзависимая ДНК-эндонуклеаза *RkrI* узнает и расщепляет метилированную последовательность ДНК 5'-GCN[^]GC-3' / 3'-CG[^]NCG-5', содержащую не менее трех 5-метилцитозинов // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2011. — Т. 7. — № 3. — С. 35–41.
 7. Чернухин В.А., Томилова Ю.Э., Чмуж Е.В., Соколова О.О., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Сайт-специфическая эндонуклеаза *BlsI* узнает последовательность ДНК 5'-G(5mC)N[^]GC-3' и расщепляет ее с образованием 3'-выступающих концов // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2007. — Т. 3. — № 1. — С. 28–33.
 8. Чернухин В.А., Чмуж Е.В., Томилова Ю.Э., Наякина Т.Н., Гончар Д.А., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Новая сайт-специфическая эндонуклеаза *GluI* узнает метилированную последовательность ДНК 5'-G(5mC)NG(5mC)-3' / 3'-(5mC)GN(5mC)G-5' // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2007. — Т. 3. — № 2. — С. 13–17.
 9. Чмуж Е.В., Каширина Ю.Г., Томилова Ю.Э., Мезенцева Н.В., Дедков В.С., Гончар Д.А., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х. Новая эндонуклеаза рестрикции *BisI* из *Bacillus subtilis* T30 узнает метилированную последовательность ДНК 5'G(m5C)[^]NGC-3' // Биотехнология. — 2005. — № 3. — С. 22–26.
 10. Abdurashitov M.A., Chernukhin V.A., Gonchar D.A., Degtyarev S.Kh. *GlaI* digestion of mouse γ -satellite DNA: study of primary structure and ACGT sites methylation // BMC Genomics. — 2009. — Vol. 10. — P. 322.
 11. Blackledge N.P., Klose R.J. CpG island chromatin: A platform for gene regulation // Epigenetics. — 2011. — Vol. 6. — No. 2. — P. 147–152.
 12. Cohen-Karni D., Xu D., Apone L., Fomenkov A., Sun Z.Y., Davis P.J., Kinney S.R.M., Yamada-Mabuchi M., Xu S.Y., Davis T., Pradhan S., Roberts R.J., Zheng Y. The *MspJI* family of modification-dependent restriction endonucleases for epigenetic studies // Proc. Natl. Acad. Sci. — 2011. — Vol. 108. — P. 11040–11045.
 13. Deaton A.M., Bird A. CpG islands and the regulation of transcription // Genes Dev. — 2011. — Vol. 25. — No. 10. — P. 1010–1022.
 14. Handa V., Jeltsch A. Profound sequence preference of *Dnmt3a* and *Dnmt3b* mammalian DNA methyltransferases shape the human epigenome. // J. Mol. Biol. — 2005. — Vol. 348 — P. 1103–1112.
 15. Illingworth R.S., Bird A.P. CpG islands — «A rough guide» // FEBS Lett. — 2009. — Vol. 583. — No. 11. — P. 1713–1720.
 16. Jain S., Wójciszewski T.K., Su Y.H. Challenges for the application of DNA methylation biomarkers in molecular diagnostic testing for cancer // Expert Rev. Mol. Diagn. — 2013. — Vol. 13. — No. 3. — P. 283–294.
 17. Mikeska T., Bock C., Do H., Dobrovic A. DNA methylation biomarkers in cancer: progress towards clinical implementation // Expert Rev. Mol. Diagn. — 2012. — Vol. 12. — No. 5. — P. 473–487.
 18. Rand K.N., Young G.P., Ho T., Molloy P.L. Sensitive and selective amplification of methylated DNA sequences using helper-dependent chain reaction in combination with a methylation-dependent restriction enzymes // Nucleic Acids Res. — 2013. — Vol. 41(1). — e15.
 19. Sproul D., Meehan R.R. Genomic insights into cancer-associated aberrant CpG island hypermethylation // Brief. Funct. Genomics. — 2013. — Vol. 12. — No. 3. — P. 174–190.
 20. Zheng Y., Cohen-Karni D., Xu D., Chin H.G., Wilson G., Pradhan S., Roberts R.J. A unique family of *Mrr*-like modification-dependent restriction endonucleases // Nucleic Acids Res. — 2010. — Vol. 38. — P. 5527–5534.

MTEI-PCR ASSAY – A NEW METHOD OF METHYLATION STATUS DETERMINATION FOR GC-RICH REGULATORY REGIONS OF HUMAN TUMOR SUPPRESSOR GENES

M.A. ABDURASHITOV, A.N. KUKSOVA, A.G. AKISHEV,
E.V. ZEMLYANSKAYA, S.Kh. DEGTYAREV

SibEnzyme Ltd, Novosibirsk

A novel method of MteI-PCR analysis of GC-rich DNA regions has been proposed based on the unique methyl-dependent site-specific DNA endonuclease MteI, which recognizes a long highly methylated site. The method includes DNA hydrolysis with MteI followed by real-time PCR or PCR with electrophoretic determination of the obtained products. Methylation status of regulatory regions of a number of tumor suppressor genes has been determined by this method in comparison with the similar data obtained by previously proposed method of BlnI- and GluI-PCR analysis. An applicability of MteI-PCR analysis has been shown by analysis of methylation status of CEBPD, HS3ST2, RASSF1A, SEPT9b and TWIST1 genes regulatory regions. In case of RASSF1A regulatory region, real-time MteI-PCR analysis in contrast to BlnI- and GluI-PCR analysis, does not show methylation of this DNA region in a control healthy lung fibroblast cell line. Thus, MteI-PCR analysis allows to perform more distinct determination and discrimination of RASSF1A regulatory region methylation and, probably, some other GC-rich regions of human DNA as well.

Keywords: methyl-dependent site-specific endonucleases, DNA methylation, polymerase chain reaction.

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКАЯ МЕТОДИКА ПРЯМОЙ РЕГИСТРАЦИИ НЕПРАЙМИРОВАННОГО СИНТЕЗА ДНК

А.Н. РЕШЕТИЛОВ^{1*}, Л.А. ЖЕЛЕЗНАЯ²

¹ ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН»,

² ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН», Пущино

Рассмотрена регистрация реакции синтеза ДНК, характеризующейся отсутствием привнесенной ДНК и проходящей с высокой скоростью. Синтез осуществлялся двумя ферментами — ДНК-полимеразой и никующей эндонуклеазой (никазой) в присутствии дезоксинуклеотидтрифосфатов. Для регистрации применен биосенсорный преобразователь электрохимического типа — рН-чувствительный полевой транзистор. Предложено два варианта регистрации — путем измерения рН в отбираемых пробах (объем проб 3–5 мкл) и проточный вариант. Методика позволяет оценивать скорость и амплитуду реакции в различные фазы, время начала и завершения, то есть динамику синтеза ДНК.

Ключевые слова: синтез ДНК, электрохимическая регистрация, метод.

Введение

В настоящее время в тех случаях, когда требуется регистрировать динамику синтеза ДНК, прибегают к использованию в реакции радиоактивно или флуоресцентно меченного одного из дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) [2, 3, 9]. Однако использование радиоактивно меченных дНТФ небезопасно, а использование флуоресцентно меченных дНТФ — недешево. В данной работе рассмотрен альтернативный метод — регистрация с помощью полевого транзистора (ПТ) реакции синтеза ДНК по изменению рН реакционного раствора.

В настоящее время ион-селективные ПТ интенсивно используются для изучения процессов встраивания нуклеотидов. Вопросы, которые поднимают исследователи, затрагивают различные стороны применения ПТ, из которых можно отметить следующие. В первой опубликованной работе на тему применения ПТ для детекции ДНК по выделению протона была показана возможность идентификации и диагностики нарушений, основанная

на секвенировании определенных участков ДНК по регистрации выделяющегося протона [5]. Процедура секвенирования была основана на регистрации выделения протона при встраивании очередного нуклеотида. В работе [7] рассматривали конструктивную модификацию затворной области, значительно повышающую химическую чувствительность ПТ, которая полезна при исследовании эффектов синтеза ДНК; тем не менее вопрос о применении к регистрации синтеза ДНК авторы не поднимали. В работе [8] рассматривали, каким образом модификация ДНК может повлиять на чувствительность детекции ее синтеза с помощью ПТ; найдено, что применение нуклеиновых кислот с нейтрализованным зарядом является одним из путей повышения чувствительности детекции в целом. Теоретическая база метода электрохимической детекции ДНК была заложена работой Пурманда [4]. Было показано, что встраивание в одноцепочечную ДНК нуклеотида сопровождается двумя электрохимическими эффектами — генерацией тока в системе, включающей молекулы ДНК или их фрагменты, за счет появления отрицательного заряда на молекуле ДНК после встраивания нуклеотида и выделением протона. Эти эффекты позволяют проводить регистрацию одиночного встраивания по двум параметрам — по регистрации тока и/или по регистрации выброса протона. На основе второго эффекта фирмой «Ion Torrent by Life technologies» (США) был реализован на практике метод секвенирования [6]. Схематически, следуя рассмотрению процесса в [4], встраивание нуклеотида представлено на рисунке 1.

© 2013 г. Решетиллов А.Н., Железная Л.А.

* Автор для переписки:

Решетиллов Анатолий Николаевич, д.х.н., профессор, заведующий лабораторией биосенсоров Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН 142290 Московская обл., Пущино, проспект Науки, 5
Тел.: +7 (9467) 73-16-66
Факс: +7 (495) 956-33-70
E-mail: anatol@ibpm.pushchino.ru

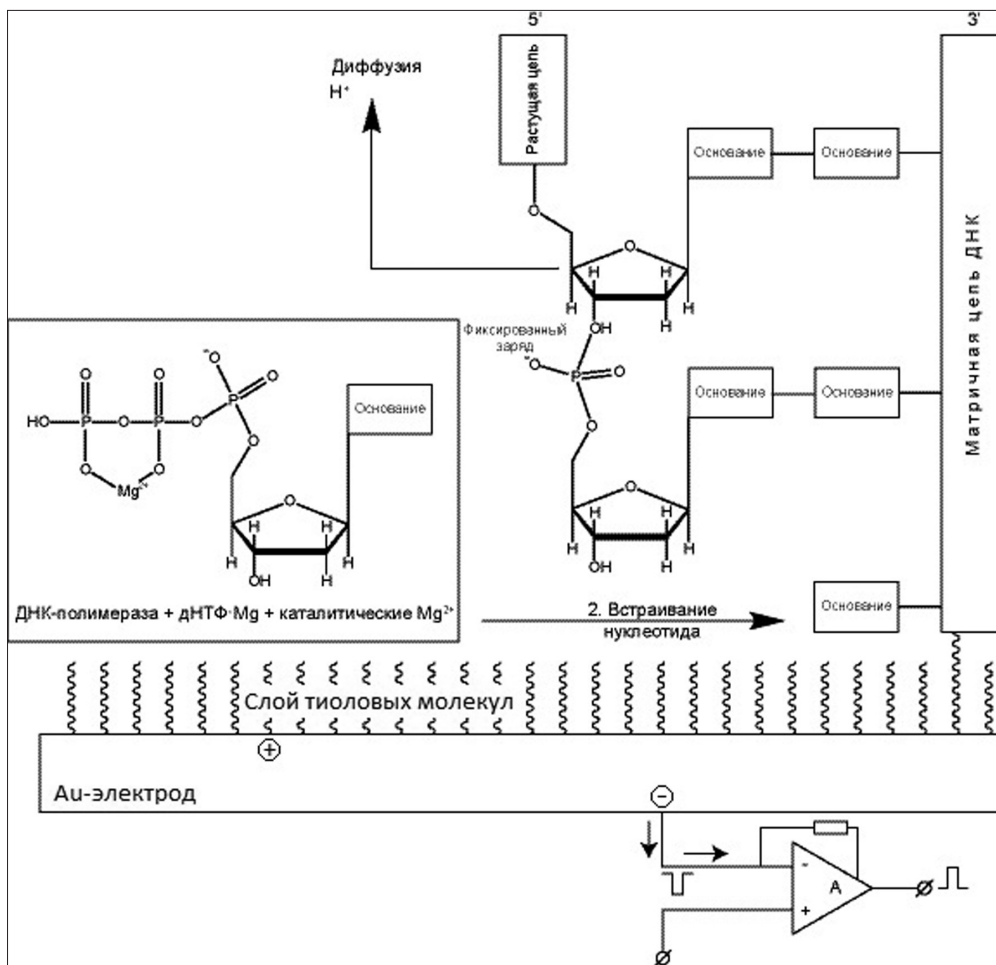


Рис. 1. Механизм детекции синтеза молекулы ДНК (приведено на основании данных работы [4])

Встраивание нуклеотида приводит к увеличению общего отрицательного заряда ДНК молекулы/фрагмента на один электрон. Появление заряда возникает как результат удаления протона из положения 3'-ОН группы праймерной ДНК в ходе каталитической реакции. В силу электронейтральности увеличение общего отрицательного заряда молекулы ДНК компенсируется эквивалентным увеличением общего положительного заряда в растворе, который обусловлен выделением протона. Оба электрических заряда — положительный и отрицательный — индуцируют появление поверхностных зарядов противоположного знака на электроде, который изолирован электрически от раствора. Эффект индукции позволяет проводить считывание сигнала, обусловленного встраиванием одиночного нуклеотида в матричную молекулу ДНК. Реально регистрируется сумма локальных токовых импульсов, вызванная реакцией на всех молекулах ДНК, иммобилизованных на электроде. Это приводит к появлению тока значительной величины, который регистрируется токовым усилителем [4].

Целью работы являлось изучение возможности применения электрохимического способа безметочного измерения синтеза ДНК с помощью полевого транзистора как измерительного электрода для регистрации безматричного синтеза. Ранее такой метод регистрации данного типа синтеза с помощью ПТ не рассматривался. Безматричный синтез был открыт японскими авторами [3], которые обнаружили, что синтез ДНК может происходить в отсутствие матрицы и праймера, в присутствии только дезоксирибонуклеотидтрифосфатов и ДНК-полимеразы. Позднее было показано, что безматричный/беспраймерный синтез в значительной степени стимулируется в присутствии рестриктаз или никующих эндонуклеаз [2]. При протекании такой реакции синтезируется значительное количество ДНК — до 10 мкг в течение часа. Этот эффект должен приводить к сдвигу рН, что может быть зарегистрировано рН-чувствительным полевым транзистором, применяемым в качестве преобразователя в биосенсорах. В соответствии с нашими данными такой метод регистрации ранее не рассматривался.

Материалы и методы

В работе использован большой фрагмент ДНК-полимеразы Bst (New England Biolabs, США), nickующая эндонуклеаза Nt.BspD6I выделена нами по описанной ранее методике [8]. Использовали дНТФ (Bioline, Англия), $MgCl_2$ (исходный раствор, 50 мМ) фирмы «СибЭнзим» (Новосибирск, Россия), 2 М раствор хлористого калия был приготовлен из фирменного препарата (Диаэм, Россия).

Реакцию безматричного/беспраймерного синтеза ДНК проводили в растворе, содержащем 150 мМ NaCl, 10 мМ $MgCl_2$, 150 мкМ дНТФ, никазу (5 единиц активности) и ДНК-полимеразу (2 единицы активности) при температуре 55 °С (рН в диапазоне от 7,2–7,5). Продолжительность синтеза составляла 60 мин.

В работе мВ/рН в качестве электрода сравнения использовали стандартный Ag/AgCl электрод.

Измерение рН в пробах, полученных в результате завершившейся ферментативной реакции, выполняли в сформированной микрокювете транзистора, объем которой составлял 5 мкл (Вариант 1). В Варианте 2 использовали проточную систему (описана ниже). Транзисторные измерения выполняли при температуре 22 °С.

Результаты

Измерения выполняли в два этапа. Для Варианта 1 на первом этапе осуществляли синтез ДНК в среде, описанной в разделе «Материалы и методы»; на втором этапе проводили оценку величины рН результирующего раствора (пробы) в сравнении с рН раствора (пробы), не содержащего ДНК-полимеразу и не подвергавшегося нагреванию. Для того чтобы подчеркнуть эффект изменения рН, буферную компоненту не использовали. Методом контроля завершенной реакции синтеза являлся электрофорез в агарозном геле.

Измерение рН в образцах, полученных в результате завершившейся ферментативной реакции (Вариант 1).

В Варианте 1 для измерения пробы вносились в открытую кювету ПТ. Для каждого измерения по данному эксперименту формировали 4 пробы объемом по 15 микролитров. Каждый эксперимент повторяли пятикратно. Разность значений рН отсчитывали, сравнивая рН данной пробы с рН предшествующей. Для статистической обработки результатов использовали программу Microsoft Excel (Microsoft Office Professional Plus).

В примере одного из измерений, представленном на рисунке 2, использованы пробы со следующими зна-

чениями рН. Проба «1» представляла собой солевой раствор, содержащий 150 мМ NaCl, рН которого составлял 7,20. Для получения пробы «2» к пробе «1» добавляли дНТФ и $MgCl_2$, что вызывало частичное снижение рН до значения 6,75 ($\Delta pH=0,75$). Проба «3» представляла собой пробу «2» с добавленной никазой; результирующее значение рН составляло 6,68 ($\Delta pH=0,07$). Проба «4» представляла собой пробу «3» с добавленной ДНК-полимеразой. Для этой пробы проводили реакцию синтеза ДНК, сопровождающуюся нагреванием смеси необходимых реагентов. Значение рН этой пробы, полученное после завершения реакции, составляло 5,31. При этом разность рН между пробой «3» и пробой «4» составляла 1,37. Эту величину разности принимали за эффект, вызванный реакцией синтеза ДНК.

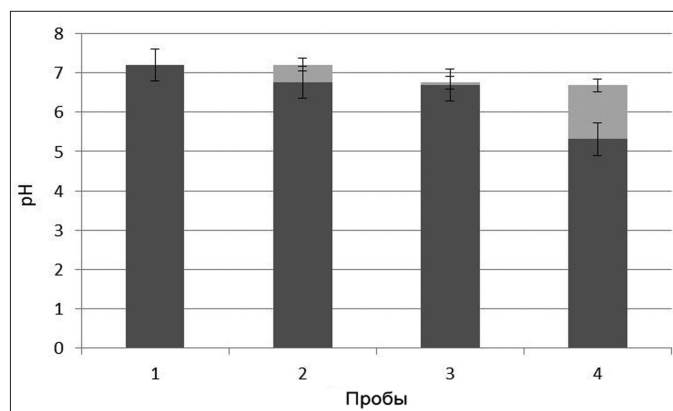


Рис. 2. Типичный пример изменения рН проб в ходе эксперимента. Вертикальная ось — величина рН пробы. Горизонтальная ось — измеряемые пробы. Общая высота столбика — величина рН до изменений, вызванных добавлениями реактивов (пробы 1, 2 и 3) или реакцией (проба 4); проба 1 — рН базового раствора хлористого натрия. Высота светло-серой части столбика — изменение рН (ΔpH) после добавления дНТФ и $MgCl_2$ (проба «2»), никазы (проба «3») и завершения реакции синтеза ДНК (проба «4»)

Было показано, что реакция безматричного синтеза ДНК, регистрируемая по изменению рН окружающего раствора, приводит к сдвигу рН реакционного раствора в кислую область. Этот факт находится в соответствии с качественными оценками, которые должны сопровождать синтез ДНК и приведены в [4]. Отличие данного эксперимента от условий, приведенных в [4], состояло в том, что ни один из компонентов не иммобилизовали. На рисунке 2 приведены средние значения рН и величины стандартных ошибок по пяти экспериментам. При выбранных условиях измерения среднее значение сдвига рН в пробе 4, определенное по пяти экспериментам,

оценивается как величина в 1,5 единицы при ошибке измерений 15%.

На рисунке 3 представлен гель-электрофорез продукта реакции. Видно формирование высокомолекулярного продукта реакции — молекул ДНК.

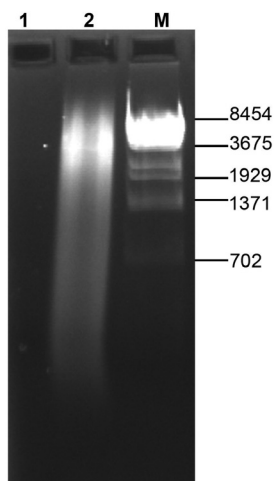


Рис. 3. Безматричный синтез ДНК. Электрофорез в 1% агарозном геле. 1 — 150 мМ NaCl + 150 мкМ дНТФ + 2 единицы активности ДНК-полимеразы (синтез не происходит из-за неполного набора реактивов); 2 — полный набор реактивов: 150 мМ NaCl + 150 мкМ дНТФ + 2 единицы активности ДНК-полимеразы + 5 единиц активности никазы. Синтез ДНК виден по появлению полосы в районе 3675 единиц; М — маркер длин ДНК

Таким образом, в данной серии экспериментов показано, что при выбранной схеме измерений происходит синтез молекул ДНК и этот синтез может быть зарегистрирован с помощью электрохимического преобразователя — рН-чувствительного ПТ.

Измерение рН в режиме реального времени при непрерывной регистрации сигналов синтеза (Вариант 2).

Для измерений по Варианту 2 было использовано устройство, представленное на рисунке 4. Оно содержит рН-чувствительный ПТ в качестве измерительного электрода (1), который сопряжен с проточной кюветой (2) объемом 3 мкл. Режимом работы ПТ управляет блок (3). Блок (4) — компьютер — является блоком регистрации сигналов ПТ. Электрод сравнения (5) встроен в крышку проточной кюветы. Управляемый компьютером перистальтический насос (7) забирает промывочный раствор из колбы (6). Реакционный блок (8), размещаемый в блоке термостатирования (9), соединен с блоком измерения контрольного состояния (10). Слив осуществляется в емкость для приема отработанного

раствора (11). Реакционный блок (8) и блок измерения контрольного состояния (10) представляют собой соленоиды диаметром 2 см, изготовленные из фторопластовой трубки с внутренним диаметром 0,8 мм. При работе перистальтического насоса на транзистор первоначально поступает раствор из контрольного блока (10), затем раствор реакционной смеси. Время прогрева реакционной смеси и, следовательно, время реакции синтеза линейно растет со временем. Зависимость реакции от времени обеспечивает возможность измерять ее динамические параметры. Раствор в блоке измерения контрольного состояния (10) находится при температуре окружающего воздуха (22 °С). Время нагревания раствора в начальной точке (на выходе из реакционного блока) равно нулю и соответствует старту реакции синтеза. Время нагревания в конечной точке равно времени прохода всей длины реактора и определяется заданной скоростью подачи раствора.

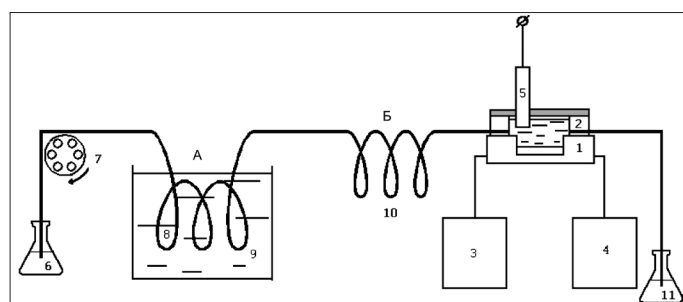


Рис. 4. Схематическое представление конструкции измерительного устройства при реализации Варианта 2

На рисунке 5 представлена регистрация процесса синтеза в режиме реального времени. Измерения выполняются следующим образом. В реакционный блок в начальный момент времени вводится реакционная смесь — раствор А, объемом 30 микролитров, содержащий 150 мМ NaCl, 1 мМ MgCl₂, 150 мкМ дНТФ, никазу Nt.BspD6I, ДНК-полимеразу Bst, и раствор Б объемом 30 микролитров, содержащий 150 мМ NaCl.

В растворе А при температуре 55 °С протекает реакция непраймированного синтеза ДНК. Раствор Б рассматривается как контрольный, относительно которого проводится замер значений рН.

Реакционный блок А помещается в термостатируемый отсек, стабилизирующий температуру (55 °С), в котором реакция синтеза продолжается до выработки всего количества введенных дНТФ. Блок, содержащий раствор Б, не подвергается подогреву. Включение перистальтического насоса обеспечивает подачу растворов на ПТ в последовательности «Раствор Б», «Раствор А».

В рассмотренном варианте скорость потока была выбрана из условий прохождения полного синтеза ДНК. При этом время подачи составляло 40 мин. для контрольного раствора Б и столько же для раствора А. Контролем завершенности реакции синтеза являлась оценка присутствия высокомолекулярных продуктов с помощью электрофореза в 1% агарозном геле для порций раствора А, поступавших на выход. Процедура была аналогична процессу, описанному для Варианта 1.

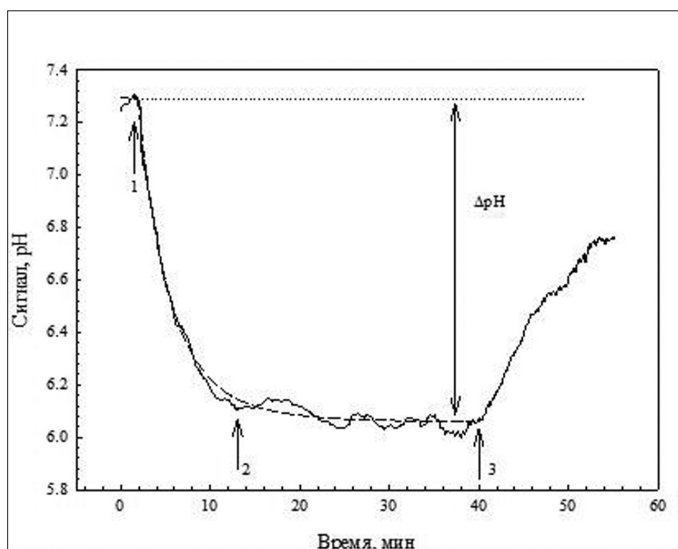


Рис. 5. Непрерывная регистрация динамики реакции синтеза ДНК по измерению смещения pH реакционной среды в режиме реального времени. Точечная линия задает начальное значение pH, пунктирная линия является аппроксимацией экспериментальной зависимости

Пример непрерывной регистрации реакции синтеза ДНК по измерению смещения pH реакционной среды приведен на рисунке 5. О ходе реакции свидетельствует смещение pH в кислую область. Базовый уровень обозначен точечной линией. Видны типичные фазы реакции «Начало» показано стрелкой 1. Оно соответствует величине pH начального участка реакционной смеси, не подвергавшегося нагреванию. За ней следует фаза «Развитие», характеризующаяся снижением/закислением pH. Эта фаза расположена между стрелками 1 и 2. Фаза «Завершение» характеризуется практически неизменным, стационарным уровнем pH, который достигается реакционной смесью в результате окончания реакции синтеза (расположена между стрелками 2 и 3). Через 40 мин. на pH-чувствительный ПТ снова поступает контрольный раствор, что приводит к восстановлению (росту) исходного значения pH.

Полученные данные позволили получить следующие значения. Реакция синтеза начинается непо-

средственно с началом создания условий для синтеза. Максимальная скорость реакции (скорость изменения pH) составляет 0,29 pH/мин. и соответствует времени 2,4 мин после старта, средняя скорость синтеза составляет 0,12 pH/мин. (регистрация на отрезке времени 2–8 мин). Общее время реакции составляет ≈ 10 мин. (продолжительность периода синтеза обозначена стрелками 1 и 2). Общее время регистрации составляет ≈ 40 мин. (продолжительность периода обозначена стрелками 1 и 3), максимальная величина сдвига pH (ΔpH) составляет величину порядка 1,2 единиц pH.

Полученный результат показывает, что устройство обеспечивает прямое определение динамических параметров реакции синтеза ДНК без использования дорогостоящего оборудования и дорогостоящих реактивов.

Заключение

В заключение отметим, что предложенные Варианты 1 и 2 можно использовать как способы для прямой безметочной регистрации динамики синтеза ДНК. Подход, основанный на измерении pH при непрерывной регистрации сигналов синтеза в режиме реального времени (Вариант 2), позволяет определять основные параметры реакции, связанной с временными характеристиками — определять время начала реакции, ее скорости в различные фазы реакции, величину эффекта, выраженную изменением pH раствора в любой момент времени.

Как экспериментальный подход метод на основе pH-чувствительного полевого транзистора для регистрации непрямированного синтеза ДНК в гомогенных условиях в настоящее время в мировой литературе не описан.

Авторы признательны В.В. Зубову, сотруднику ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН», за обсуждение полученных результатов.

Работа была частично поддержана ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы», контракт 14.512.11.0087 от 20.06.2013 г.

Литература

1. Рогулин Е.А., Переязова Т.А., Железная Л.А., Матвиенко Н.И. // Биохимия. — 2004. — Т. 69. — С. 1381–1387.

2. Liang X., Jensen K., Frank-Kamenetskii M.D. // *Biochemistry*. – 2004. – Vol. 43. – No. 42. – P. 13459–13466.
3. Ogata N., and Miura T. // *Nucleic Acids Res.* – 1998. – Vol. 26. – P. 4652–4656.
4. Pourmand N., Karhanek M., Persson H.H.J., Webb C.D., Lee T.H. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2006. – Vol. 103. – No. 17. – P. 6466–6470.
5. Purushothaman S., Toumazou C., Oub Chung-Pei // *Sensors and Actuators B*. – 2006. – Vol. 114. – P. 964–968.
6. Rothberg J.M., Hinz W., Rearick T.M., Schultz J., Mileski W. et al. // *Nature*. – 2011. – Vol. 475. – No. 7356. – P. 348–352.
7. Salaun A.-C., Bihan F. Le, Mohammed-Brahim T. // *Sensors and Actuators B*. – 2011. – Vol. 158. – P. 138–143.
8. Wen-Yih Chen, Hon-Chen Chen, Yuh-Shyong Yang, Chun-Jen Huang, Hardy Wai-Hong Chan, Wen-Pin Hue // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2013. – Vol. 41. – P. 795–801.
9. Zyryna N.V., Zheleznaya L.A., Dvoretzky E.V., Vasiliev V.D., Chernov A. et al. // *Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 388. – P. 367–372.

ELECTROCHEMICAL METHODS OF DIRECT DETECTION OF DNA SYNTHESIS WITHOUT ADDED PRIMER

A.N. RESHETILOV¹, L.A. ZHELEZNAYA²

¹ G.K. Scriabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, RAS,

² Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS, Pushchino, Russia

Considered register DNA synthesis reaction, characterized by the absence of the introduced DNA and passing at a high speed. Synthesis was carried out by two enzymes – DNA polymerase and endonuclease nicking (nickase) in the presence of deoxynucleotide triphosphates. Applied for registration of the electrochemical biosensor transducer type – pH-sensitive field-effect transistor. Two options for registration – by measuring the pH of the sample is taken (sample volume 5.3 mcl) and flow-through option. The technique allows to estimate the speed and amplitude of the response in different phases, beginning and end, that is, the dynamics of DNA synthesis.

Keywords: DNA synthesis, electrochemical registration method.

ИЗУЧЕНИЕ НАКОПЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ШТАММОМ ДРОЖЖЕЙ *YARROWIA LIPOLYTICA* С ИНАКТИВИРОВАННЫМ ГЕНОМ, КОДИРУЮЩИМ ПЕРОКСИСОМАЛЬНЫЙ ТРАНСПОРТЕР АДЕНОЗИНТРИФОСФОРНОЙ КИСЛОТЫ

Е.Ю. ЮЗБАШЕВА*, Т.В. ЮЗБАШЕВ, Е.Б. МОСТОВА,
Н.И. ПЕРКОВСКАЯ, С.П. СИНЕОКИЙ

ФГУП «ГосНИИгенетика», Москва

Был получен штамм *Yarrowia lipolytica* W29 (dYIANT1), характеризующийся делецией гена YIANT1, кодирующего пероксисомальный транспортер аденозинтрифосфорной кислоты. Было изучено накопление липидов данным штаммом в условиях культивирования при совмещении двух путей синтеза триацилглицеридов: *de novo* синтез триацилглицеридов из глюкозы и *ex novo* синтез из гидрофобных субстратов. В качестве источника углерода были использованы смеси глюкозы и гидрофобных субстратов, таких как декан, додекан, тетрадекан, гексадекан и олеиновая кислота. Было продемонстрировано, что на среде, содержащей декан, рекомбинантный штамм накапливает в 1,7 раза больше липидов, по сравнению с природным изолятом *Y. lipolytica* W29.

Ключевые слова: ген, кодирующий пероксисомальный транспортер АТФ, дрожжи, *Yarrowia lipolytica*.

Введение

Дрожжи *Yarrowia lipolytica* — облигатно аэробные аскомицетные гетероталлические диморфные дрожжи: в зависимости от условий роста они могут переходить из дрожжевой формы в псевдомицелий или мицелий. Для своего роста и развития в качестве источника углерода они могут использовать глюкозу, глицерин, спирты, ацетат и гидрофобные субстраты (такие как алканы и масла) [16]. Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (Food and Drugs Administration, USA) эти дрожжи рассматриваются как непатогенные и пригодные для пищевых продуктов. Важным преимуществом этих дрожжей является широкий ассортимент генетических инструментов, разработанных для молекулярных манипуляций с ними. Следует отметить, что все изученные штаммы *Y. lipolytica* являются гаплоидными, что существенно облегчает генно-инженерные работы [3]. Для *Y. lipolytica* доступны системы эффективной экспрессии и направ-

ленной инактивации генов [10, 14]. Получены сильные синтетические промоторы и разработаны как автономно реплицирующиеся, так и многокопийные интегративные векторы [12, 15, 26]. Полностью секвенирована и аннотирована геномная последовательность одного из штаммов *Y. lipolytica* (<http://www.genolevures.org/yali.html>), что позволяет эффективно использовать биоинформатический подход и осуществлять поиск и клонирование необходимых генов.

Дрожжи *Y. lipolytica* относятся к группе так называемых маслянистых дрожжей (oleaginous yeast). Представители данной группы способны накапливать 30–70% (масса) липидов, более 95% из которых представлены триацилглицеридами [8]. Синтез триацилглицеридов в маслянистых дрожжах начинается с образования непосредственных предшественников: ацил-СоА (тиоэфиров кофермента А и жирных кислот) и глицерол-3-фосфата (рис. 1) [4–7, 20]. Образование глицерол-3-фосфата происходит двумя путями:

- восстановлением дигидроксиацетонфосфата — промежуточного метаболита гликолиза при росте на глюкозе в качестве источника углерода. Данную реакцию осуществляет фермент глицерол-3-фосфат дегидрогеназа;
- посредством реакции фосфорилирования свободного глицерина ферментом глицеролкиназой при росте на глицерине в качестве источника углерода.

© 2013 г. Юзбашева Е.Ю., Юзбашев Т.В., Мостова Е.Б., Перковская Н.И., Синеокий С.П.

* Автор для переписки:

Юзбашева Евгения Юрьевна

ВКПМ, ГосНИИгенетика

117545 Москва, 1-й Дорожный проезд, 1

E-mail: enja_t@mail.ru

Синтез ацил-СоА в клетке *de novo* начинается с синтеза ацетил-СоА и дальнейшим удлинением цепи ацил-СоА до С14–20. Источником ацетил-СоА является интермедиат цикла трикарбоновых кислот — цитрат, который при высоком молярном соотношении углерода к азоту экспортируется из митохондрии посредством малат-цитратного шаттла. В условиях голодания по азоту (высокое молярное соотношение углерода к азоту) клетка пополняет запасы азота для синтеза аминокислот посредством гидролиза АМФ, который, в свою очередь, служит кофактором фермента аконитазы. Уменьшение пула АМФ в клетке приводит к снижению активности фермента цикла Кребса аконитазы и соответственно накоплению цитрата.

Данное свойство используется при ферментации маслянистых дрожжей для получения наибольшей продукции липидов. В цитоплазме цитрат под действием фермента АТФ-зависимой цитрат-лиазы расщепляется до ацетил-СоА и оксалоацетата. Ацетил-СоА конденсируется с анионом бикарбоната благодаря активности фермента ацетил-СоА-карбоксилазы с образованием малонил-СоА. Далее сложный комплекс ферментов ацил-СоА синтетаз осуществляет сборку ацил-СоА из малонил-СоА с использованием 2 молекул на каждое удлинение углеродной цепи. Перенос ацильной группы на глицерол-3-фосфат поэтапно осуществляют СоА-зависимые глицерол-3-фосфат-ацилтрансфераза, лизофосфатидат-ацилтрансфераза, фосфатидат-ацилтрансфераза и диацилглицерид-ацилтрансфераза. Образовавшиеся молекулы триацилглицеридов накапливаются в специальных органоидах клетки — липидных каплях.

При культивировании в среде с высоким молярным соотношением углерода к азоту природные изоляты *Y. lipolytica* в ферментере накапливают до 36% (масса) липидов [4–6]. Данные дрожжи способны накапливать липиды на метаноле [21], мелассе [13], техническом глицерине [19], гидролизате сахарного тростника [24], гидролизате пшеничной соломы [28]. Используя современные генно-инженерные методы, были получены штаммы *Y. lipolytica*, накапливающие до 70% массы липидов (WO2010004141, WO2012001144) [4, 5, 8, 18, 19, 27]. Были разработаны рекомбинантные штаммы, способные накапливать в виде триацилглицеридов промышленно важные жирные кислоты (WO2004101757, WO2005047479, US2009325265, WO2010147907).

Способность дрожжей *Y. lipolytica* утилизировать гидрофобные субстраты привлекла внимание ученых,

начиная с середины 1960-х годов, с целью продукции клеточного белка (single-cell protein) из n-алканов [3]. При росте на гидрофобных субстратах получены селекционным путем штаммы *Y. lipolytica*, способные продуцировать органические кислоты (цитрат, изоцитрат, α -кетоглутарат) [1].

В дополнение разрабатываются штаммы, способные накапливать ценные жирные кислоты для использования в качестве пищевых добавок и липиды для получения биодизеля при культивировании на гидрофобных субстратах [6].

В последнее десятилетие ведутся активные исследования, направленные на изучение метаболизма гидрофобных субстратов в дрожжах *Y. lipolytica* [9, 11]. Утилизацию гидрофобных субстратов можно условно разделить на пять основных этапов:

1. Проникновение в клетку.
2. Окисление n-алканов до соответствующей жирной кислоты.
3. Активация жирной кислоты посредством образования тиоэфиров кофермента А и жирных кислот (ацил-СоА), так называемый *ex novo* синтез ацил-СоА.
4. Окисление ацил-СоА в пероксисоме посредством метаболического пути β -окисления с образованием ацетил-СоА.
5. Глиоксилатный путь и цикл трикарбоновых кислот.

Гидрофобные субстраты не смешиваются с водой, вследствие чего их поглощение требует морфологических и физиологических изменений, особенно в структуре клеточной стенки, благодаря которым данные субстраты могут прикрепляться непосредственно к клеточной стенке (прямой межфазный транспорт), либо гидрофобные субстраты должны быть эмульгированы поверхностно-активными веществами, которые выделяет клетка (поверхностно-опосредованный транспорт).

Триацилглицериды (масла) сначала гидролизуются ферментами из группы липаз с высвобождением свободных жирных кислот и глицерина, которые затем проникают в клетку. n-Алканы, попавшие в клетку, гидроксигируются в эндоплазматической сети с помощью цитохром Р450-зависимой алкан монооксигеназной системы. Образовавшиеся соответствующие жирные спирты окисляются до альдегидов с помощью дегидрогеназы и оксидазы жирных спиртов, которые, в свою очередь, окисляются до соответствующих жирных кислот (рис. 2).

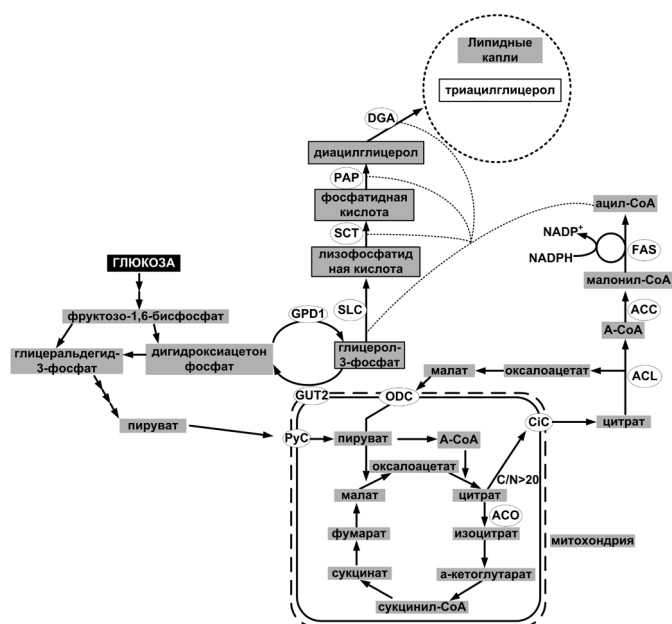


Рис. 1. Синтез липидов в дрожжах *Y. lipolytica* (по данным [4–7, 20]). Условные обозначения: GPD1 – глицерол-3-фосфатдегидрогеназа; GUT2 – глицерол-3-фосфатдегидрогеназа/глицерол-киназа; АСО – аконитаза; Рус – митохондриальный транспортер пирувата; ODC – митохондриальный транспортер малата и оксалоацетата; СiС – митохондриальный транспортер цитрата; АСL – АТФ-зависимая цитрат-лиаза; АСС – ацетил-СоА-карбоксилаза; FAS – ацил-СоА синтеттаза; SLC – глицерол-3-фосфатацил-трансфераза; SCT – лизофосфатидат-ацилтрансфераза; PAP – фосфатидат-ацилтрансфераза; DGA – диацилглицерид ацилтрансфераза

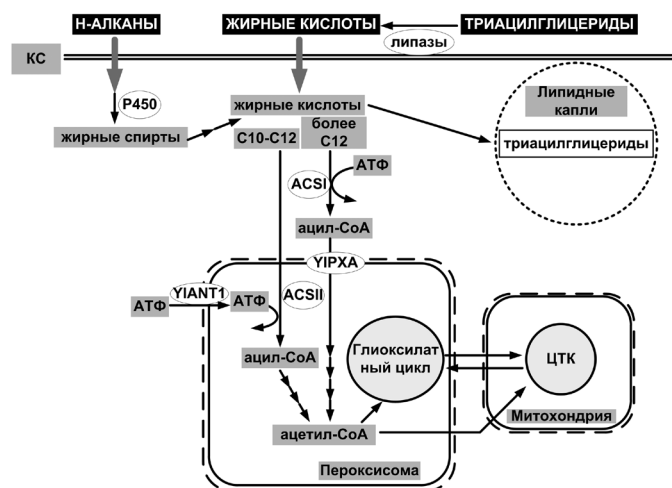


Рис. 2. Метаболический путь утилизации гидрофобных субстратов в дрожжах *Y. lipolytica* (по данным [9, 11, 23]). Условные обозначения: КС – клеточная стенка; ЦТК – цикл трикарбоновых кислот; Р450 – цитохром Р450-зависимая алкан монооксигеназная система;

ACSI и ACSII – белковый комплекс ацил-СоА-синтеттазы; YIANT1 – пероксисомальный транспортер аденозинтрифосфорной кислоты; YIPXA – пероксисомальный транспортер ацил-СоА

Жирные кислоты активируются посредством реакции тиоэтерификации с образованием ацил-СоА. В зависимости от длины углеродной цепи в дрожжах *Y. lipolytica* данная реакция осуществляется в цитоплазме, либо в пероксисоме (рис. 2). При длине углеродной цепи до С12 жирная кислота транспортируется в пероксисому, где белковый комплекс ацил-СоА-синтеттаза II (ACSII) осуществляет реакцию тиоэтерификации. Для протекания данной реакции необходим аденозинтрифосфат (АТФ), который транспортируется в пероксисому с помощью пероксисомального транспортера аденозинтрифосфорной кислоты YIANT1.

Было продемонстрировано, что делеция гена YIANT1 приводит к неспособности культуры расти на декане как единственном источнике углерода. При длине углеродной цепи более С14 жирная кислота превращается в ацил-СоА в цитоплазме с помощью ацил-СоА-синтеттазы I (ACSI), и уже ацил-СоА транспортируются в пероксисому.

Целью настоящего исследования было изучение накопления липидов штаммом *Y. lipolytica*, характеризующимся делецией гена YIANT1, в условиях культивирования при совмещении двух путей синтеза триацилглицеридов: de novo синтез триацилглицеридов из глюкозы (в результате высокого молярного соотношения углерода и азота в среде) и ex novo синтез из гидрофобных субстратов. В качестве гидрофобных субстратов был выбран спектр n-алканов с длиной углеродной цепи от С10–С16, а также олеиновая кислота.

Материалы и методы

Штаммы и среды. Природный изолят *Y. lipolytica* W29 был получен из Французской Коллекции Дрожжей, представляющих биотехнологический интерес (CLIB89). Ауксотрофный по урацилу штамм W29(URA-) был получен, как описано ранее [29].

Y. lipolytica растили при 30 °С на следующих средах:

- минимальная среда YNBD – минимальная среда YNB (Himedia G091) с добавлением глюкозы 20 г/л;
- полноценная среда YPD (г/л): пептон 5; дрожжевой экстракт 3; глюкоза 20;
- среды для культивирования:

- YNBDC₁₀ (г/л): глюкоза 50; декан 20; КН₂РO₄ 0,85; К₂НРO₄ 0,15; MgSO₄ 0,5; NaCl 0,1; СаCl₂ 0,1; (NH₄)₂SO₄ 2; дрожжевой экстракт 1; 0,1 М фосфатный буфер, витамины, микроэлементы.
- YNBDC₁₂ (г/л): глюкоза 50; додекан 20; КН₂РO₄ 0,85; К₂НРO₄ 0,15; MgSO₄ 0,5; NaCl 0,1; СаCl₂ 0,1; (NH₄)₂SO₄ 2; дрожжевой экстракт 1; 0,1 М фосфатный буфер, витамины, микроэлементы.
- YNBDC₁₄ (г/л): глюкоза 50; тетрадекан 20; КН₂РO₄ 0,85; К₂НРO₄ 0,15; MgSO₄ 0,5; NaCl 0,1; СаCl₂ 0,1; (NH₄)₂SO₄ 2; дрожжевой экстракт 1; 0,1 М фосфатный буфер, витамины, микроэлементы.
- YNBDC₁₆ (г/л): глюкоза 5; гексадекан 30; КН₂РO₄ 0,85; К₂НРO₄ 0,15; MgSO₄ 0,5; NaCl 0,1; СаCl₂ 0,1; (NH₄)₂SO₄ 2; дрожжевой экстракт 1; 0,1 М фосфатный буфер, витамины, микроэлементы.
- YNBDC₁₈ (г/л): глюкоза 5; олеиновая кислота 30; КН₂РO₄ 0,85; К₂НРO₄ 0,15; MgSO₄ 0,5; NaCl 0,1; СаCl₂ 0,1; (NH₄)₂SO₄ 2; дрожжевой экстракт 1; 0,1 М фосфатный буфер, витамины, микроэлементы.

Растворы витаминов и микроэлементов готовили отдельно, как описано ранее [17]. Эмульсию гидрофобных субстратов готовили с помощью Твин 40 (1%) и сильного перемешивания.

Реактивы. Триптон, пептон, дрожжевой экстракт, Твин 40, глюкоза, неорганические соли были получены из компании «Диа-М» (Россия); декан, додекан, тетра-

декан, гексадекан, олеиновая кислота (>98% чистоты) – «Sigma-Aldrich» (США); все ферменты для молекулярных работ – «Fermentas» (Литва).

Конструкция генетической кассеты для инактивации гена YIANT1. Все стандартные генно-инженерные манипуляции проводили в соответствии со сборником методик [22]. Все синтетические олигонуклеотиды (праймеры), используемые в работе, синтезированы в Центре коллективного пользования (ЦКП) ФГУП «ГосНИИгенетика» и приведены в таблице 1.

Нуклеотидные последовательности хромосомальных областей Up и Down размером 863 и 862 п.н., соответственно, а также гена маркера URA3 размером 1473 п.н. амплифицировали методом ПЦР с использованием Pfu-полимеразы и праймеров YIANT1-up-Eco78I-F и Lox66-YIANT1-up-R, Lox71-YIANT1-down-F и YIANT1-down-Eco78I-R, а также Lox66-URA3-F и Lox71-URA3-R, соответственно.

В качестве матрицы для ПЦР использовали тотальную геномную ДНК штамма *Y. lipolytica* W29, полученную по методу, описанному ранее [2]. Три ДНК фрагмента очищали после электрофореза в 1% агарозном геле методом экстракции ДНК (Kit #K0513, «Fermentas», Литва). Очищенные ДНК фрагменты Up и URA3 соединяли методом ПЦР-сшивки [25] по праймерам YIANT1-up-Eco78I-F и Lox71-URA3-R. Полученную нуклеотидную последовательность Up-URA3 размером 2318 п.н. вырезали после электрофореза из геля и чистили методом экстракции ДНК.

Таблица 1

Олигонуклеотиды, используемые в работе

Название олигонуклеотида	Нуклеотидная последовательность (5'–3')
YIANT1-up-Eco78I-F	GGC GCC ATT GTG GAG TAG ACT AAG
Lox66-YIANT1-up-R	GAG AGG GGG GGG GTG GGG ACA GAA CAT AGT CTT TGG A
Lox71-YIANT1-down-F	CCT CCT CCC CCC GCC CAC AAG GTC ATG CAG CAG TCC AAG
YIANT1-down-Eco78I-R	GGC GCC ATC GCA ATC GAG TCC A
Lox66-URA3-F	CCC CAC CCC CCC CCT CTC TAC CGT TCG TAT AAT GTA TGC TAT ACG AAG TTA TTG TGA CTG GGG ATG TAG T
Lox71-URA3-R	GTG GGC GGG GGG AGG AGG TAC CGT TCG TAT AGC ATA CAT TAT ACG AAG TTA TCA GCT GCA ACG TC
YIANT1-chr-F	TGA GAC TTT CAC ACT CGG TAG
YIANT1-chr-R	GTA CAG TCT ATG TAC CTA TGA

Далее данный фрагмент сшивали методом ПЦР-сшивки с ДНК-фрагментом Down по праймерам Y1ANT1-up-Eco78I-F и Y1ANT1-down-Eco78I-R. Полученная касета размером 3162 п.н. была названа fY1ANT1-URA3.

Трансформация дрожжей *Y. lipolytica*. 500 нг ДНК-касеты fY1ANT1-URA3 использовали для генетической трансформации штамма *Y. lipolytica* W29(URA-). Трансформацию осуществляли методом электропорации [30]. Трансформанты отбирали на минимальной селективной среде SYNBD (минимальная среда YNB «Himedia G091», глюкоза 20 г/л, 0,1 М сорбит, агар 20 г/л) по восстановлению прототрофности к урацилу. Наличие вставки в локус Y1ANT1 (рис. 3) проверяли с помощью ПЦР. Для ПЦР использовали DreamTaq-полимеразу, в качестве ДНК-матрицы — тотальную геномную ДНК, выделенную из полученных трансформантов, и локус-специфические праймеры Y1ANT1-chr-F и Y1ANT1-chr-R, а также Y1ANT1-chr-F и Lox71-URA3-R (см. табл. 1). Отобранный трансформант с делецией гена Y1ANT1, названный W29(dY1ANT1), использовали для дальнейших исследований.

Культивирование дрожжей *Y. lipolytica*. Культивирование штамма W29(dY1ANT1) осуществляли в средах YNBDC₁₀, YNBDC₁₂, YNBDC₁₄, YNBDC₁₆, YNBDC₁₈ в пробирках с рабочим объемом 10 мл и общим объемом 50 мл при 30 °С и постоянном перемешивании (230 об./мин.). В качестве контроля использовали природный изолят W29. Подготовку посевного материала проводили в 3 этапа: 1) пересев культуры на богатую агаризованную среду YPD и культивирование на протяжении 20 ч; 2) посев в жидкую богатую среду YPD и культивирование на протяжении 24 ч; 3) пересев в минимальную жидкую среду YNBD и культивирование на протяжении 24 ч. Посев инокулята в среду культивирования осуществлялся до оптической плотности 0,5 при длине волны 600 нм.

Отбор проб осуществляли каждые 16–24 часа. Биомассу осаждали центрифугированием, замораживали при -70 °С и лиофилизовали в вакуумном сушильном шкафу FreeZone 6 Plus (Labconco, USA). Лиофилизованную биомассу использовали для определения сухой массы культуры и анализа общих липидов. Концентрацию глюкозы определяли в культуральной жидкости методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Определение содержания общих липидов. Определение содержания общих липидов в биомассе дрожжей осуществляли с помощью метода газовой хроматографии с использованием газового хроматографа Shimadzu GC-17A, оснащенного пламенно-ионизаци-

онным детектором. Прием и обработку данных проводили посредством программно-аппаратного комплекса GCsolution (Shimadzu).

Навеску лиофилизованной биомассы дрожжей массой 10–20 мг помещали в стеклянную вialу объемом 2,0 мл. Затем в вialу добавляли раствор внутреннего стандарта (маргариновая кислота) и выдерживали 1–5 мин., после чего к смеси добавляли 500 мкл раствора хлороформ : метанол в соотношении 2:1. Вialу плотно закрывали и помещали в ультразвуковую баню на 10 мин. Процедуру экстракции повторяли один раз. Все экстракты собирали в стеклянную вialу для дериватизации на 2,0 мл. Объединенный экстракт упаривали досуха в токе азота при нормальных условиях. Затем к сухому остатку добавляли 800 мкл раствора для дериватизации (5% хлороводорода в метаноле), вialу плотно закрывали и выдерживали 120 мин. при 80 °С. После дериватизации вialу охлаждали до комнатной температуры и к смеси добавляли 200 мкл воды и 500 мкл н-гексана. Смесь интенсивно перемешивали и после полного расслоения фаз, 200–400 мкл верхней фазы отбирали для анализа метиловых эфиров жирных кислот методом газовой хроматографии.

Расчет массовой концентрации жирных кислот осуществляли на основе соотношений площадей пиков соответствующих метиловых эфиров жирных кислот и площади пика внутреннего стандарта (метиловый эфир маргариновой кислоты), а также массы навески пробы образца и массы добавки метилового эфира маргариновой кислоты.

Результаты и обсуждение

Инактивацию генов в дрожжах *Y. lipolytica* осуществляли с помощью механизма гомологичной рекомбинации по двойному кроссинговеру [10].

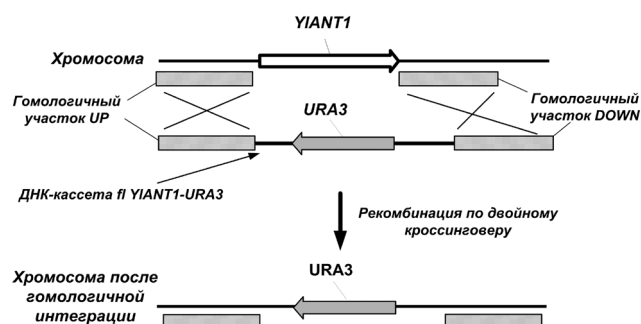


Рис. 3. Схематическое изображение встраивания генетической конструкции fY1ANT1-URA3 в гомологичный локус на хромосоме и инактивация гена Y1ANT1

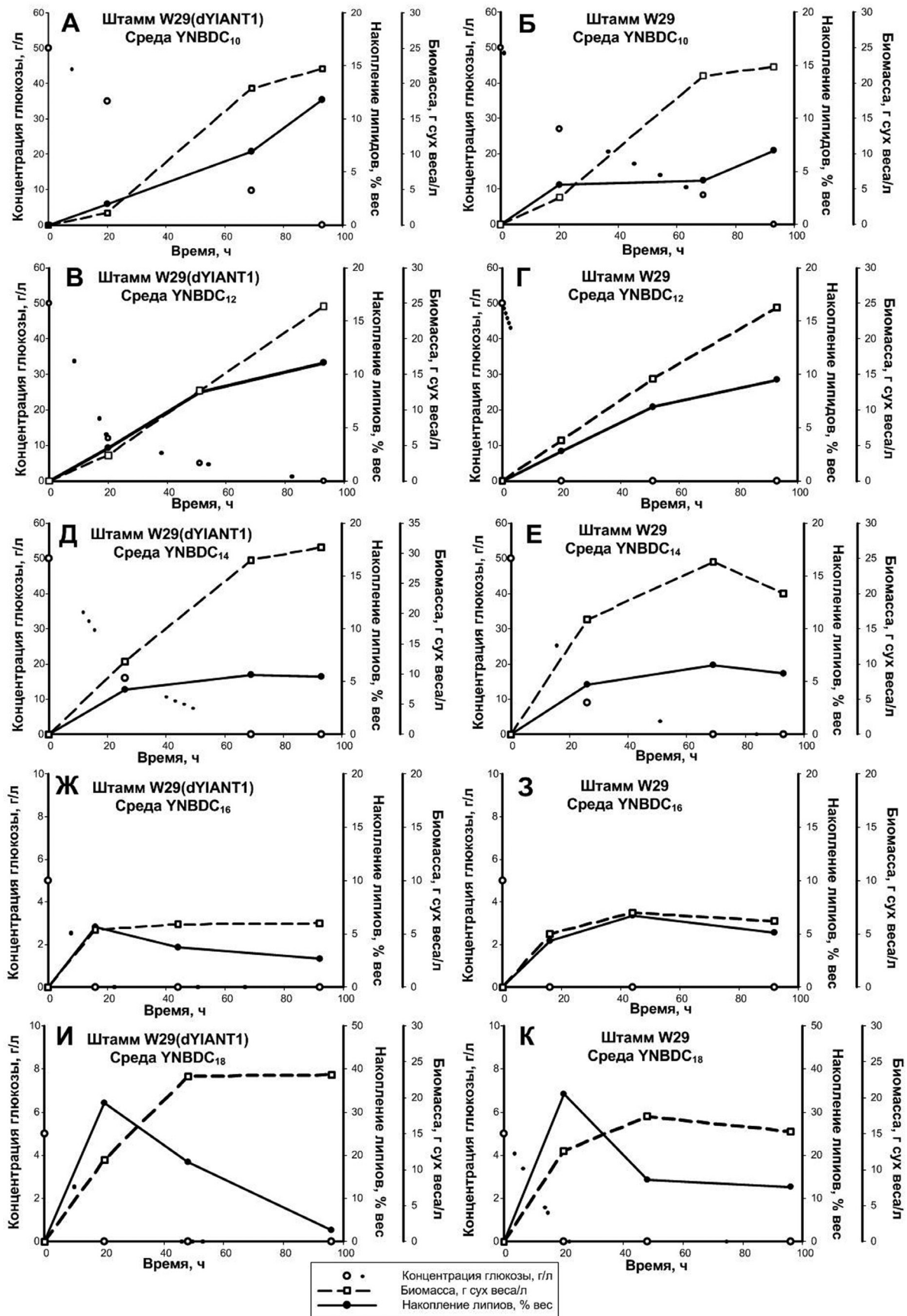


Рис. 4. Культивирование штаммов *Y. lipolytica* W29(dYIANT1) (А, В, Д, Ж, И) и W29 (Б, Г, Е, З, К), а также продукция липидов в средах YNBDC₁₀ (А, Б), YNBDC₁₂ (В, Г), YNBDC₁₄ (Д, Е), YNBDC₁₆ (Ж, З), YNBDC₁₈ (И, К)

Таблица 2

Жирнокислотный состав накопленных триацилглицеридов при культивировании штаммов W29(dYIANT1) и W29 на средах, содержащих смесь глюкозы и гидрофобных субстратов. Данные представлены за 93 час культивирования на средах YNBDC₁₀, YNBDC₁₂ и YNBDC₁₄, 20 час культивирования на средах YNBDC₁₆ и YNBDC₁₈

Штамм	Среда культивирования	Общие липиды, % вес.	Состав жирных кислот триацилглицеридов, %*				
			C16:0	C16:1 n7c	C18:0	C18:1 n9c	C18:2 n6c
W29(dYIANT1)	YNBDC ₁₀	11,87	26,68	3,83	10,19	36,28	15,71
	YNBDC ₁₂	11,1	26,19	3,53	12,07	32,85	17,71
	YNBDC ₁₄	5,47	15,04	5,76	8,49	43,44	19,68
	YNBDC ₁₆	5,65	15,34	8,62	1,46	30,5	40,87
	YNBDC ₁₈	36,12	1,52	0	0,48	81,07	14,99
W29	YNBDC ₁₀	6,98	25,52	4,23	9,9	36,69	17,45
	YNBDC ₁₂	9,51	27,15	5,21	10,39	32,63	17,9
	YNBDC ₁₄	5,76	17,57	6,92	5,82	40,31	21,28
	YNBDC ₁₆	4,35	12,78	9,11	1,5	43,15	30,8
	YNBDC ₁₈	34,2	1,72	0	0,67	78,94	15,71

Примечание: * % от общего количества жирных кислот

Для этого была сконструирована генетическая кассета Δ YIANT1-URA3 (рис. 3), содержащая нуклеотидную последовательность селективного маркера URA3 (оротидин-5-фосфатдекарбоксилазы), экранированного фрагментами ДНК размером более 700 п.н., гомологичными хромосомальным областям, расположенным в промоторной (YIANT1-Up) и терминаторной (YIANT1-Down) частях выключаемого гена YIANT1.

Данную генетическую кассету использовали для генетической трансформации штамма *Y. lipolytica* W29(URA-) и отбора штамма W29(dYIANT1), характеризующегося делецией гена YIANT1, кодирующего пероксисомальный транспортер аденозинтрифосфорной кислоты.

Штамм *Y. lipolytica* W29(dYIANT1) культивировали в пробирках в условиях с высоким молярным соотношением углерода и азота на смеси глюкозы и гидрофобных субстратов, таких как декан, додекан, тетрадекан, гексадекан и олеиновая кислота, как описано в разделе «Материалы и методы». Полученные результаты представлены на рисунке 4 и в таблице 2.

При культивировании на среде YNBDC₁₀, содержащей декан, штамм W29(dYIANT1), начиная с 69 часов инкубации, накапливал в 1,7 раза больше общих липидов по сравнению с контрольным штаммом W29, и к 94 часам данное значение достигало 11,87% массы,

тогда как штамм W29 характеризовался количеством общих липидов, равным 6,98% массы (рис. 4 А, Б, табл. 2). В данных условиях вся глюкоза (50 г/л) утилизировалась обоими штаммами к 94 часам культивирования, а накопленная биомасса находилась на одном уровне и соответствовала 22,1 и 22,3 г сухой массы/л для штаммов W29(dYIANT1) и W29, соответственно.

При культивировании на среде YNBDC₁₂, содержащей додекан, было также заметно увеличение продукции общих липидов у штамма W29(dYIANT1), по сравнению со своим предшественником W29, и составляло 11,1 и 9,51% массы, соответственно (рис. 4 В, Г, табл. 2). Профиль накопления биомассы был схож у штаммов, хотя скорость утилизации глюкозы отличалась. Так, в культуральной жидкости штамма W29(dYIANT1) к 20-му часу культивирования осталось около 12 г/л глюкозы, и полностью глюкоза была поглощена штаммом только к 94-му часу, а штамм W29 утилизировал всю глюкозу уже к 20-му часу культивирования.

При культивировании на среде YNBDC₁₄, содержащей тетрадекан, штаммы W29(dYIANT1) и W29 характеризовались сходной скоростью накопления и конечной концентрацией общих липидов – 5,47 и 5,76% массы, соответственно (рис. 4 Д, Е, табл. 2).

При культивировании на среде YNBDC₁₆, содержащей гексадекан, максимальное накопление общих липидов штаммом W29(dYIANT1) наблюдалось на 16-й

час культивирования и соответствовало 5,65% массы, а к 92 часам культивирования данное значение опустилось до 2,66% массы (рис. 4 Ж, З, табл. 2). У контрольного штамма W29 накопление общих липидов достигало наибольшего значения на 44-й час культивирования и соответствовало 6,73% массы и лишь незначительно опускалось к 92-му часу до 5,12% массы.

При культивировании на среде YNBDC₁₈, содержащей олеиновую кислоту, максимальное накопление общих липидов штаммами W29(dYIANT1) и W29 происходило на 20-й час культивирования и составляло 36,12 и 34,2% массы, соответственно (рис. 4 И, К). Дальнейшее уменьшение количества накопленных липидов до 9,62 и 12,71% массы к 92 часам культивирования свидетельствует об эффективном метаболическом пути β -окисления жирных кислот. В действительности полученные результаты подтверждаются литературными данными о культивировании природного изолята *Y. lipolytica* и рекомбинантных штаммов, дефектных по утилизации глицерина (dGUT2), а также характеризующихся инактивацией группы генов, кодирующих ацил-CoA оксидазы (ферменты первых реакций β -окисления жирных кислот) (dPOX1-6) [4]. А. Veoroulos с соавторами показали, что при культивировании на среде с олеиновой кислотой природный изолят быстро накапливает липиды, которые со временем культивирования утилизирует, однако при отключении метаболического пути деградации глицерина и жирных кислот полученные рекомбинантные штаммы характеризуются не только большим накоплением липидов по сравнению с природным изолятом, но и отсутствием уменьшения накопленных липидов [4].

Следует отметить, что жирнокислотный состав триацилглицеридов для штаммов W29(dYIANT1) и W29 при ферментации на разных источниках углерода не был штаммоспецифичной характеристикой, а отличался в зависимости от среды культивирования (табл. 2). Так, при культивировании на средах, содержащих декан и додекан, изучаемые штаммы накапливали больший процент олеиновой кислоты (36 и 32% от общего количества жирных кислот для декана и додекана, соответственно) и пальмитиновой кислоты (25–27%). При культивировании на среде, содержащей тетрадекан, 40–43% от общего количества жирных кислот представлено олеиновой кислотой, 19–21% — линолевой кислотой. Только на среде, содержащей гексадекан, жирнокислотный состав триацилглицеридов для штаммов W29(dYIANT1) и W29 отличался: 40% жирных кислот у штамма W29(dYIANT1) представлено линолевой кислотой,

30% — олеиновой кислотой, а для W29 — наоборот. На среде, содержащей олеиновую кислоту, изучаемые штаммы предпочтительно аккумулируют олеиновую кислоту (78–80%) и линолевую кислоту (15%).

Ранее в работе Thevenieau F. с соавторами было показано, что штамм *Y. lipolytica* с инактивированным геном YIANT1, в отличие от природного изолята, не способен расти на декане [23]. Активация C10 жирной кислоты посредством реакции тиоэтерификации с образованием ацил-CoA проходит в пероксисоме. Для протекания данной реакции, которую осуществляет белковый комплекс ацил-CoA синтетаза II (ACSII), необходим АТФ, а единственным транспортером АТФ в пероксисоме является белок YIANT1. В настоящем исследовании мы продемонстрировали, что при культивировании на среде, содержащей смесь глюкозы и декана, штамм W29(dYIANT1) накапливает в 1,7 раза больше общих липидов по сравнению с контрольным штаммом W29. Можно предположить, что декан, попадая в клетку, окисляется в цитоплазме и направляется на синтез триацилглицеридов, так как не может быть утилизирован в пероксисоме посредством β -окисления жирных кислот (см. рис. 2).

Заключение

Таким образом, в исследовании был получен штамм *Yarrowia lipolytica* W29 (dYIANT1), характеризующийся делецией гена YIANT1, кодирующего пероксисомальный транспортер аденозинтрифосфорной кислоты. Было показано, что на среде, содержащей декан, рекомбинантный штамм накапливает в 1,7 раза больше липидов, по сравнению с природным изолятом *Y. lipolytica* W29.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках выполнения государственного контракта номер 14.512.11.0055 от 03.04.2013.

Литература

1. Финогенова Т.В., Моргунов И.Г., Камзолова С.В., Чернявская О.Г. Перспективы производства органических кислот дрожжами *Yarrowia lipolytica* (Обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. — 2005. — Т. 41. — Р. 478–486.
2. Bahler J., Wu J.Q., Longtine M.S., Shah N.G., McKenzie A. 3rd, Steever A.B., Wach A., Philippsen P., Pringle J.R. Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based

- gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe* // *Yeast*. — 1998. — Vol. 14. — P. 943–951.
3. Barth G., Gaillardin C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica* // *FEMS Microbiol. Rev.* — 1997. — Vol. 19. — P. 219–237.
 4. Beopoulos A., Mrozova Z., Thevenieau F., Le Dall M.T., Hapala I., Papanikolaou S., Chardot T., Nicaud J.M. Control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica* // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2008. — Vol. 74. — P. 7779–7789.
 5. Beopoulos A., Nicaud J.M., Gaillardin C. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2011. — Vol. 90. — P. 1193–1206.
 6. Beopoulos A., Cescut J., Haddouche R., Uribelarra J.L., Molina-Jouve C., Nicaud J.M. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production // *Progress in Lipid Research*. — 2009. — Vol. 48. — P. 375–387.
 7. Beopoulos A., Chardot T., Nicaud J.M. *Yarrowia lipolytica*: a model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation // *Biochimie*. — 2009. — Vol. 91. — P. 692–696.
 8. Dulermo T., Nicaud J.M. Involvement of the G3P shuttle and beta-oxidation pathway in the control of TAG synthesis and lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica* // *Metab. Eng.* — 2011. — Vol. 13. — P. 482–491.
 9. Fickers P., Benetti P.H., Wache Y., Marty A., Mauersberger S., Smit M.S., Nicaud J.M. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications // *FEMS Yeast Res.* — 2005. — Vol. 5. — P. 527–543.
 10. Fickers P., Le Dall M.T., Gaillardin C., Thonart P., Nicaud J.M. New disruption cassettes for rapid gene disruption and marker rescue in the yeast *Yarrowia lipolytica* // *J. Microbiol. Methods*. — 2003. — Vol. 55. — P. 727–737.
 11. Fukuda R. Metabolism of hydrophobic carbon sources and regulation of it in n-alkane-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica* // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* — 2013. — Vol. 77. — P. 1149–1154.
 12. Juretzek T., Le Dall M., Mauersberger S., Gaillardin C., Barth G., Nicaud J. Vectors for gene expression and amplification in the yeast *Yarrowia lipolytica* // *Yeast*. — 2001. — Vol. 18. — P. 97–113.
 13. Karatay S.E., Donmez G. Improving the lipid accumulation properties of the yeast cells for biodiesel production using molasses // *Bioresour. Technol.* — 2010. — Vol. 101(20). — P. 7988–7990.
 14. Le Dall M.T., Nicaud J.M., Gaillardin C. Multiple-copy integration in the yeast *Yarrowia lipolytica* // *Curr. Genet.* — 1994. — Vol. 26. — P. 38–44.
 15. Madzak C., Treton B., Blanchin-Roland S. Strong hybrid promoters and integrative expression/secretion vectors for quasi-constitutive expression of heterologous proteins in the yeast *Yarrowia lipolytica* // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* — 2000. — Vol. 2. — P. 207–216.
 16. Madzak C., Gaillardin C., Beckerich J.M. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review // *J. Biotechnol.* — 2004. — Vol. 109. — P. 63–81.
 17. Nicaud J.M., Madzak C., van den Broek P., Gysler C., Duboc P., Niederberger P., Gaillardin C. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica* // *FEMS Yeast Res.* — 2002. — Vol. 2. — P. 371–379.
 18. Papanikolaou S., Galiotou-Panayotou M., Fakasa S., Komaitis M., Aggelis G. Lipid production by oleaginous mucorales cultivated on renewable carbon sources // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* — 2007. — Vol. 109(11). — P. 1060–1070.
 19. Papanikolaou S., Muniglia L., Chevalot I., Aggelis G., Marc I. Accumulation of a cocoa-butter-like lipid by *Yarrowia lipolytica* cultivated on agro-industrial residues // *Curr. Microbiol.* — 2003. — Vol. 46. — P. 124–130.
 20. Ratledge C., Wynn J.P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms // *Adv. Appl. Microbiol.* — 2002. — Vol. 51. — P. 1–51.
 21. Rupcic J., Blagovic B., Maric V. Cell lipids of the *Candida lipolytica* yeast grown on methanol // *J. Chromatogr. A*. — 1996. — Vol. 755(1). — P. 75–80.
 22. Sambrook J., Maniatis T., Fritsch E. *Molecular cloning: a laboratory manual*. — Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
 23. Thevenieau F., Le Dall M.T., Nthangeni B., Mauersberger S., Marchal R., Nicaud J.M. Characterization of *Yarrowia lipolytica* mutants affected in hydrophobic substrate utilization // *Fungal Genet. Biol.* — 2007. — Vol. 44. — P. 531–542.
 24. Tsigie Y.A., Wang C.Y., Truong C.T., Ju Y.H. Lipid production from *Yarrowia lipolytica* Po1g grown in sugarcane bagasse hydrolysate // *Bioresour. Technol.* — 2011. — Vol. 102. — P. 9216–9222.
 25. Urban A., Neukirchen S., Jaeger K.E. A rapid and efficient method for site-directed mutagenesis using one-step overlap extension PCR // *Nucleic Acids Res.* — 1997. — Vol. 25. — P. 2227–2228.
 26. Vernis L., Abbas A., Chasles M., Gaillardin C.M., Brun C., Huberman J.A., P. Fournier P. An origin of replication and a centromere are both needed to establish a replicative plasmid in the yeast *Yarrowia lipolytica* // *Mol. Cell Biol.* — 1997. — Vol. 17. — P. 1995–2004.
 27. Wang Z.P., Xu H.M., Wang G.Y., Chi Z., Chi Z.M. Disruption of the MIG1 gene enhances lipid biosynthesis in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* ACA-DC 50109 // *Biochim. Biophys. Acta*. — 2013. — Vol. 1831. — P. 675–682.
 28. Yu X., Zheng Y., Dorgan K.M., Chen S. Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid // *Bioresour. Technol.* — 2011. — Vol. 102. — P. 6134–6140.

29. Yuzbashev T.V., Yuzbasheva E.Y., Sobolevskaya T.I., Laptev I.A., Vybornaya T.V., Larina A.S., Matsui K., Fukui K., Sineoky S.P. Production of succinic acid at low pH by a recombinant strain of the aerobic yeast *Yarrowia lipolytica* // Biotechnol. Bioeng. – 2010. – Vol. 107. – P. 673–682.
30. Yuzbasheva E.Y., Yuzbashev T.V., Laptev L.A., Konstantinova T.K., Sineoky S.P. Efficient cell surface display of Lip2 lipase using C-domains of glycosylphosphatidylinositol-anchored cell wall proteins of *Yarrowia lipolytica* // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2011. – Vol. 91. – P. 645–654.

THE STUDY OF LIPID ACCUMULATION YARROWIA LIPOLYTICA YEAST STRAIN WITH AN INACTIVATED GENE ENCODING PEROXISOMAL TRANSPORTER ADENOSINE TRIPHOSPHATE

E.J. YUZBASHEV, T.V. YUZBASHEV, E.B. MOSTOW, N.I. PERKOVSKAYA, S.P. SINEOKY

Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow

The strain *Yarrowia lipolytica* W29 (dYIANT1), characterized by deletion of the gene YIANT1, encoding peroxisomal transporter adenosine triphosphate was obtained. Lipid accumulation was studied in this strain culture conditions when combining two methods of synthesis of triacylglycerides: de novo synthesis from glucose and triacylglycerides ex novo synthesis of hydrophobic substrates. As the carbon source used was a mixture of glucose and hydrophobic substrates, such as decane, dodecane, tetradecane, hexadecane, and oleic acid. It was demonstrated that a medium containing decane recombinant strain accumulate 1.7 times more lipids than the natural isolate *Y. lipolytica* W29.

Keywords: gene encoding peroxisomal transporter ATP, yeast, *Yarrowia lipolytica*.

КЛОНИРОВАНИЕ СИСТЕМЫ РЕСТРИКЦИИ-МОДИФИКАЦИИ ВруN4I ИЗ *BACILLUS PUMILUS* N4

В.С. ДЕДКОВ, Д.А. ГОНЧАР*, В.А. ЧЕРНУХИН, М.А. АБДУРАШИТОВ,
Е.Н. ЛОМАКОВСКАЯ, Н.М. ШИНКАРЕНКО, С.Х. ДЕГТЯРЕВ

ООО «СибЭнзим», Новосибирск

ДНК бактериального штамма *Bacillus pumilus* N4, несущего систему рестрикции-модификации ВруN4I (сайт узнавания 5'-GGNNCC-3'), гидролизовалась эндонуклеазами рестрикции MfeI и EcoRI, и полученные продукты клонировались в вектор pUC19, линейаризованный EcoRI. Для отбора клонов, несущих ген эндонуклеазы рестрикции ВруN4I, было предложено использовать метод селекции, основанный на делении (разведении) полученной библиотеки клонов с прямым определением активности эндонуклеазы рестрикции в суммарных лизатах клеток. С помощью данного метода был выявлен рекомбинантный штамм *E. coli* N41 (pВруN4/MR), являющийся продуцентом фермента ВруN4I. Также была проведена селекция полученной библиотеки традиционным методом Венецианера и получены два различных клон, один из которых идентичен *E. coli* N41(pВруN4/MR), а второй — *E. coli* N7(pВруN4/MR), содержит вставку в плазмиде в противоположном направлении и проявляет меньшую активность. Была установлена структура ДНК плазмидной вставки штамма *E. coli* N41 (pВруN4/M)R и показано, что она содержит гены ДНК-метилтрансферазы М.ВруN4I и эндонуклеазы рестрикции ВруN4I. Сравнительный анализ аминокислотной последовательности ферментов, кодируемых данными генами, выявил гомологию М.ВруN4I с другими метилазами, узнающими сайт 5'-GGNNCC-3' или сходный с ним. В аминокислотной последовательности М.ВруN4I выявлены все домены, характерные для 5mC-ДНК-метилтрансфераз.

Ключевые слова: эндонуклеаза рестрикции, неоизомер, ДНК-метилтрансфераза, селекция продуцента.

Введение

Бактериальные системы рестрикции-модификации (РМ-системы) являются одним из интереснейших объектов, изучаемых в молекулярной биологии. РМ-система включает в себя, как минимум, два фермента — сайт-специфические эндонуклеазу рестрикции (рестриктазу) и ДНК-метилтрансферазу (метилазу) [9, 14]. В настоящее время успешное развитие многих направлений молекулярной биологии, генетической инженерии и ДНК-диагностики немыслимо без расширения ассортимента эндонуклеаз рестрикции, которые являются одними из ключевых инструментов в этих областях науки.

Выделение эндонуклеаз рестрикции из природных штаммов часто осложняется необходимостью использования большого количества биомассы, сложных схем выделения, включающих в себя хроматографию с

дорогостоящими сорбентами, а также малым выходом целевого продукта. В связи с этим актуальным является клонирование генов этих ферментов в составе векторов в *E. coli* с целью создания штаммов суперпродуцентов. Успешное клонирование, в свою очередь, зависит от возможности использования эффективных методов отбора (селекции) целевых продуцентов из тысяч рекомбинантных клонов. Следовательно, разработка и оптимизация новых методов селекции клонов достаточно актуальна.

Ранее было показано, что рестриктаза ВруN4I из *Bacillus pumilus* N4 расщепляет последовательность 5'-G[^]GGNNCC-3' [3], являясь первым неоизомером NlaIV (5'-GGN[^]NCC-3', <http://www.rebase.neb.com>). В отличие от NlaIV, при гидролизе ДНК рестриктазой ВруN4I образуются четырехнуклеотидные 5'-выступающие липкие концы, сходные с концами, получающимися при расщеплении ДНК эндонуклеазами рестрикции XhoII и BstX2I (сайт узнавания 5'-R[^]GATCY-3'), Acc65I (5'-G[^]GTACC-3'), HgiC1I и AccB1I (5'-G[^]GYRCC-3'), BamHI (5'-G[^]GATCC-3'), PspOMI (5'-G[^]GGCCC-3'), а также рядом других ферментов, что позволяет эффективно применять фермент ВруN4I в разнообразных генно-инженерных мани-

© 2013 г. Дедков В.С., Гончар Д.А., Чернухин В.А., Абдурашитов М.А., Ломаковская Е.Н., Шинкаренко Н.М., Дегтярев С.Х.

* Автор для переписки:

Гончар Данила Александрович

ООО «СибЭнзим»

630117 Новосибирск-117, ул. Академика Тимакова, 2/12

E-mail: gonchar@sibenzyme.ru

пуляциях. Однако продуктивность исходного штамма *B. pumilus* N4 невелика.

В данной работе мы клонировали эндонуклеазу рестрикции *Bpu*N4I из *B. pumilus* N4. Для получения клона-продуцента фермента мы разработали метод селекции, основанный на делении (разведении) полученной библиотеки клонов с прямым определением активности эндонуклеазы рестрикции в суммарных лизатах клеток. Также была проведена селекция клонов по устойчивости к бактериофагу *in vivo* и по устойчивости рекомбинантной ДНК к рестриктазе *Bpu*N4I *in vitro*. Установлена структура РМ-системы *Bpu*N4I и проведен сравнительный аминокислотный анализ метилазы М.*Bpu*N4I и рестриктазы R.*Bpu*N4I, входящих в эту систему.

Материалы и методы

Штаммы. Штамм *Escherichia coli* ER2267 (F' *proA*+*B*+ *lacIq* Δ (*lacZ*)M15 *zsf::mini-Tn10* (Kan^r)/ Δ (*argF-lacZ*)U169 *glnV44 e14-* (McrA-) *rfbD1. recA1 relA1. endA1 spoT1. Thi-1* Δ (*mcrC-mrr*)114::IS10) — получен из «New England Biolabs, Inc.» (США); штаммы: *Bacillus pumilus* N4, продуцент рестриктазы *Bpu*N4I, *Escherichia coli* C600 (Δ cI857Sam7) и *Escherichia coli* QD5003 — получены из коллекции культур микроорганизмов НПО «СибЭнзим» (Новосибирск).

Определение активности эндонуклеазы рестрикции *Bpu*N4I. Определение активности рестриктазы *Bpu*N4I в бактериальной культуре проводили, как описано ранее [1, 2]. Бактериальные клетки в количестве 0,05–0,2 мг суспендировали в 20 мкл лизирующего буфера, содержащего 0,2 мг/мл лизоцим («AppliChem», Германия), 0,1% Тритон X-100 («Sigma», США), 10 мМ Трис-НСl (рН 8,1), 1 мМ ЭДТА и инкубировали 30 мин при 22 °С. К полученному лизату добавляли 5 мкл смеси, содержащей 250 мкг/мл ДНК фага лямбда и 5-кратный SE-буфер Y (33 мМ Трис-ацетат (рН 7,9), 10 мМ ацетат магния, 66 мМ ацетат калия и 1 мМ ДТТ), и полученную смесь инкубировали 1 час при +37 °С. По окончании реакции к смеси добавляли 2,5 мкл стоп-буфера (0,25 М Na-ЭДТА (рН 8,5), 50% сахараза, 0,1% бромфеноловый синий и 0,1 мг/мл РНКаза), перемешивали и 5 мкл полученной смеси наносили на 0,8% агарозный гель в буфере ТАЕ (40 мМ Трис-ацетат (рН 8,1), 20 мМ натрий ацетат, 1 мМ ЭДТА, 0,5 мг/л этидия бромида). Электрофорез вели при напряжении 5 В/см в течение 70 мин и затем фотографировали гель в ультрафиолете на приборе «Herolab GmbH» (Германия).

Получение геномной библиотеки *B. pumilus* N4. Все генно-инженерные процедуры, а также работа с бактериофагом лямбда выполнялись согласно [11]. ДНК *B. pumilus* N4, продуцента рестриктазы *Bpu*N4I, выделяли, как описано ранее [12].

5 мкг ДНК *B. pumilus* N4 гидролизировали раздельно рестриктазами MfeI и EcoRI, как рекомендовано производителем. Полученные гидролизаты ДНК очищали экстракцией фенолом-хлороформом, переосаждали этанолом и полученный осадок растворяли в 25 мкл воды.

Для приготовления вектора готовили 400 мкл реакционной смеси, содержащей 40 мкл десятикратного SE-буфера EcoRI, 20 мкл ДНК pUC19 в концентрации 0,5 мг/мл, 340 мкл воды и 5 мкл рестриктазы EcoRI. Смесь инкубировали 1,5 часа при +37 °С, добавляли 20 единиц щелочной фосфатазы из кишечника теленка и инкубировали 30 мин. при +37 °С. Далее ДНК очищали экстракцией фенолом-хлороформом, переосаждали этанолом и растворяли в 20 мкл буфера TE.

Сшивку фрагментов ДНК *B. pumilus* N4 с полученным вектором проводили в 30 мкл смеси, содержащей 3 мкл десятикратного лигазного буфера, 3 мкл вектора pUC19/EcoRI, 15 мкл ДНК *B. pumilus* N4, гидролизованную ферментом EcoRI, 9 мкл ДНК *B. pumilus* N4, гидролизованную MfeI, и 1 мкл высокоактивной T4-ДНК-лигазы и инкубировали в течение ночи при +4 °С. Затем ДНК осаждали этанолом и растворяли в 12 мкл воды.

Полученной таким образом смесью рекомбинантных ДНК трансформировали клетки *E. coli* штамма ER2267 путем электропорации на приборе «Easujet Prima». Перед электропорацией к 50 мкл размороженных во льду клеток добавляли 4 мкл лигазной смеси. После трансформации к суспензии клеток добавляли 1 мл нагретого до +37 °С бульона LB, и клетки подращивали при +37 °С в течение 1 часа. Для подсчета трансформантов 10 мкл полученной культуры рассеивали в чашке Петри на агаризованной среде LB, содержащей 100 мкг/мл ампицилина, и инкубировали ночь при +37 °С. Основную часть культуры засеивали во флакон со 100 мл среды LB с добавлением 100 мкг/мл ампицилина и выращивали в течение ночи в термостатированной воздушной качалке при +37 °С и 140 об./мин.

Селекция потенциальных продуцентов методом деления библиотеки клонов. При достижении оптической плотности 2,5 единицы при 540 нм культуру разбавляли ТМ-буфером (10 мМ Трис-НСl (рН 7,6), 10 мМ MgSO₄ и 200 мкг/мл желатин) в 3000 раз и раскапывали в чашки Петри по 10 мкл на 30 секторов LB-агара с ампициллином.

Чашки инкубировали 2 дня при 22 °С. Каждую смесь колоний переносили петлей в ячейку планшета и суспендировали в 100 мкл буфера, содержащего 25% глицерин, 40 мМ NaCl и 10 мМ Трис-НСl (рН 7,6), и хранили при -18 °С. Параллельно из полученных суспензий отбирали аликвоты по 2 мкл в лизирующий буфер и тестировали активность рестриктазы, как описано выше. Суспензию клеток, содержащую рестриктазу, разводили ТМ-буфером в 10 раз и снова раскапывали в чашки Петри по 10 мкл на 30 секторов LB-агара с ампициллином. Клетки подращивали и тестировали в них активность фермента, как описано выше. Процедуру разведения повторяли до получения смеси клеток из единичных клонов (10–25 клонов), их рассевали на отдельные чашки и проводили определение активности фермента в отдельных клонах, как описано выше.

Селекцию потенциальных продуцентов по устойчивости к бактериофагу проводили по методу, описанному ранее [4, 15]. Клетки *E. coli*, содержащие библиотеку ДНК *B. pumilus* N4, подращивали во флаконе со 100 мл среды LB с добавлением 100 мкг/мл ампициллина в течение ночи в термостатированной воздушной качалке при +37 °С и 140 об./мин. Культура достигала плотности 2,5 при 540 нм и имела титр 3×10^8 КОЕ/мл. 111 мкл культуры разбавляли в 1 мл ТМ-буфера и добавляли по 100 мкл в четыре ячейки планшета, содержащие по 100 мкл бактериофага лямбда с титром 12×10^8 , $2,4 \times 10^8$, $0,48 \times 10^8$ б.о.е./мл а также ТМ-буфер без бактериофага. Инфицирование проводили 15 мин. при +37 °С. Затем клетки последовательно разводили 5 раз, каждый раз отбирая 11,1 мкл из смеси и добавляя их к 100 мкл ТМ-буфера. По 50 мкл из каждого разбавления рассевали в чашки Петри на 1,4%-ный питательный агар с 50 мкг/мл ампициллина. Инкубировали 1 час при +42 °С, затем 20 часов — при +37 °С. Снижение титра клеток в 1000 раз после инфекции со множественностью до 40 фаговых частиц на клетку (б.о.е./КОЕ) рассматривали как результат селекции штаммов, потенциально устойчивых к бактериофагу.

Селекция потенциальных продуцентов по устойчивости рекомбинантной плазмиды к рестриктазе *BruN4I*. Для отбора целевых рекомбинантных плазмид по их устойчивости к действию рестриктазы *BruN4I* использовали метод Венецианера [13], получивший название Hungarian trick и успешно применяемый для клонирования ферментов различных РМ-систем [6, 7]. При этом трансформанты *E. coli*, выращенные в 100 мл селективной среды, собирали на центрифуге «Beckman J2-21» (USA) при 6000 об./мин. в течение 30 мин.

при 10 °С. Из осадка выделяли суммарную плазмидную ДНК с использованием набора QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Germany) по инструкции производителя. Полученную библиотеку рекомбинантных плазмид с концентрацией ДНК 0,4 мг/мл обрабатывали 10 мкл рестриктазы *BruN4I* в SE-буфере Y в течение 1 часа при 37 °С. Гидролизат ДНК осаждали 96%-ным этанолом и растворяли в 15 мкл воды. Полученным гидролизатом трансформировали компетентные клетки *E. coli* штамма ER2267 при 42 °С в течение 2 мин. и высевали их в чашки Петри с агаризованной средой LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина. Инкубировали при 37 °С в течение ночи и выделяли плазмидные ДНК из индивидуальных клонов. ДНК проверяли на наличие встроенного фрагмента и на устойчивость к гидролизу *BruN4I*.

Выращивание рекомбинантных штаммов *E. coli* проводили в бульоне LB, содержащем 1% триптон («Organotechnie», Франция), 0,5% дрожжевой экстракт («Organotechnie», Франция), 0,5% NaCl, 0,05% MgCl₂, 0,001% тиамин (рН 7,0) с добавлением 0,1 мг/мл ампициллина в двадцати колбах объемом 500 мл, содержащих по 300 мл бульона, при +30 °С со встряхиванием 130 об./мин. в течение 18 часов. Клетки осаждали на центрифуге J2-21 («Beckman», США) в течение 30 минут в роторе JA-10 при 8000 об./мин. и замораживали. Получали 12 г биомассы.

Определение нуклеотидной последовательности ДНК проводили по методу Сэнгера на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 310 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Препараты ферментов, ДНК, дезоксирибонуклеозидтрифосфатов и синтетических олигонуклеотидов, использованные в работе, произведены в НПО «СибЭнзим» (г. Новосибирск).

Результаты и обсуждение

Клонирование РМ-системы *B. pumilus* N4.

Штамм *Bacillus pumilus* N4 — продуцент новой эндонуклеазы рестрикции *BruN4I* [3] — является малопродуктивным, в связи с чем необходимо было клонировать данный фермент. На первом этапе мы провели выделение хромосомной ДНК из 3 г биомассы *B. pumilus* N4 и получили 2,8 мг ДНК с концентрацией 0,7 мг/мл. ДНК гидролизовали отдельно рестриктазами MfeI (5'-C[^]AATTG-3') и EcoRI (5'-G[^]AATTC-3'), как описано в разделе «Материалы и методы». Плазмиду pUC19 линеаризовали рестриктазой EcoRI, дефосфо-

рилировали щелочной фосфатазой и сшивали с помощью Т4-ДНК-лигазы со смесью гидролизатов ДНК *B. pumilus* N4, после чего трансформировали клетки *E. coli* ER2267 [8] путем электропорации.

В результате трансформации было получено 20 тысяч клонов *E. coli*, несущих фрагменты ДНК *B. pumilus* N4 и представляющих библиотеку этого штамма.

Отбор рекомбинантных продуцентов рестриктазы ВруN4I. Для выявления штаммов-продуцентов целевого фермента из всего пула трансформантов использовали метод деления (разведения) библиотеки, а также методы селекции клонов-продуцентов рестриктазы по устойчивости к бактериофагу и по устойчивости плазмидной ДНК рекомбинантных клонов к расщеплению рестриктазой.

На рисунке 1 приведены результаты определения активности ВруN4I в последовательных разведениях суммарных лизатов клеток, вплоть до тестирования рестриктазы в отдельных клонах в последнем разведении.

Из рисунка 1 видно, что при первом разведении активность рестриктазы ВруN4I определяется в суспензии клеток под номером 19 (рис. 1а). Суспензию клеток под номером 19 разводили в 10 раз и определяли активность фермента на следующей стадии отбора. Как видно из рисунка 1б, активность проявилась в лизатах 11-, 14-, 20-й смесей, содержащих в каждой от 80 до 150 клонов (рис. 1б). Суспензию клеток под номером 11 разводили далее и обнаружили активность фермента в смесях под номерами 8 и 19 (рис. 1в). На заключительном этапе отбора смесь клеток под номером 8 рассеивали до отдельных колоний, в которых тестировали активность рестриктазы ВруN4I (рис. 1г). Клон под номером 1 был взят для дальнейшей работы и обозначен как *E. coli* N41 (pВруN4/MR).

Селекция потенциальных продуцентов по устойчивости к бактериофагу и по устойчивости рекомбинантной плазмиды к рестриктазе ВруN4I.

Селекцию по устойчивости к бактериофагу проводили, как описано в разделе «Материалы и методы». При инфицировании со множественностью 8 б.о.е./КОЕ выжило 0,09% трансформантов. 300 из них пересеяли, однако активности ВруN4I в них не было обнаружено. Следовательно, нам не удалось провести селекцию библиотечных штаммов-продуцентов ВруN4I по устойчивости к бактериофагу.

Селекция по устойчивости пула рекомбинантных плазмид к рестриктазе ВруN4I дала положительный результат. Суммарную плазмидную ДНК 20 тысяч трансформантов *E. coli*, представляющих библиотеку ДНК *B. pumilus* N4, обрабатывали рестриктазой ВруN4I, как описано в разделе «Материалы и методы». После

этого гидролизатом повторно трансформировали клетки *E. coli* и получили 20 клонов. Определение в них активности рестриктазы показало наличие фермента ВруN4I в четырнадцати клонах.

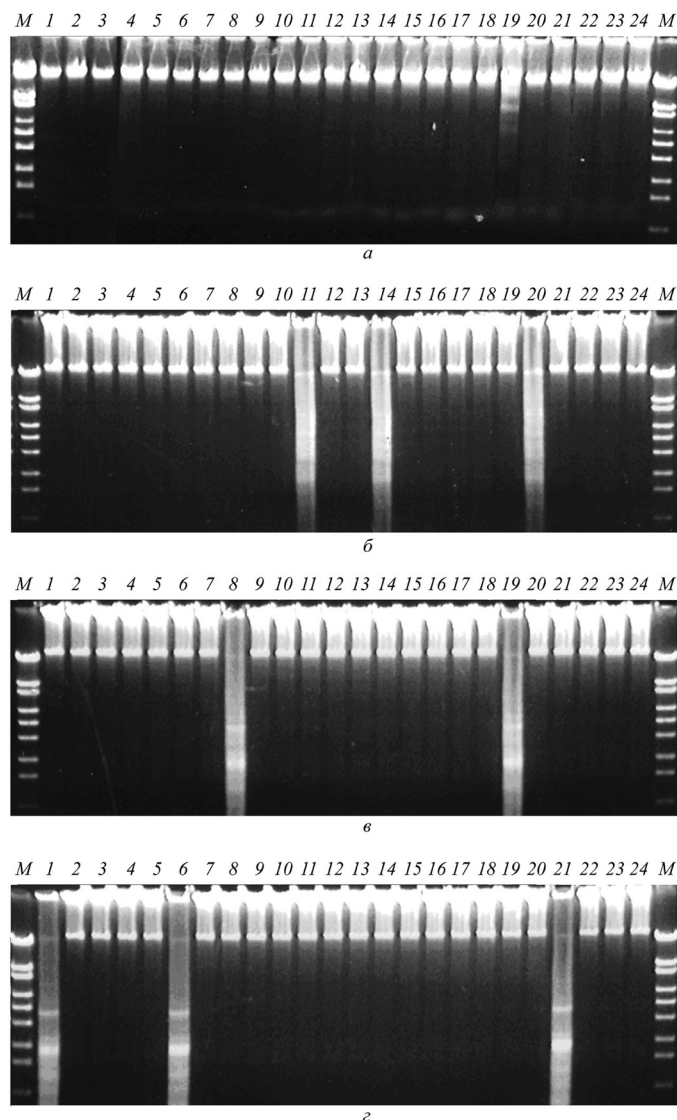


Рис. 1. Определение активности ВруN4I в лизатах клеток, полученных из 10^3 (а), 10^2 (б), 10 (в) и из отдельных клонов (г) в процессе выделения продуцента из библиотеки. Дорожки: 1–24 – лизаты клеток + ДНК бактериофага лямбда, М – маркер (ДНК бактериофага лямбда + BssTII). Электрофорез в 0,8% агарозном геле. На первом этапе мы применили метод деления (разведения) полученной библиотеки из 20000 клонов с тестированием эндонуклеазы рестрикции в суммарных лизатах клонов, как описано в «Материалах и методах»

Выделенные из данных клонов плазмиды проявили устойчивость к ВруN4I, что свидетельствует о наличии в них генов рестриктазы и метилазы РМ-системы ВруN4I. Анализ ДНК плазмид показал, что часть из них идентична ранее полученному клону *E. coli* N41 (pВруN4/

MR), тогда как остальные плазмиды были одинаковы и содержали фрагмент ДНК с РМ-системой *BpuN4I*, ориентированный в противоположном направлении. Для дальнейшей работы мы выбрали один клон из второго набора и обозначили его как *E. coli N7* (*pBpuN4/MR*).

Таким образом, селекция полученной библиотеки клонов при помощи предлагаемого метода деления (селекции) с прямым определением активности фермента, а также метода отбора клонов по устойчивости их ДНК к рестриктазе *BpuN4I* дала положительный результат.

Данные по сравнительному анализу активности фермента *BpuN4I* в клонах *E. coli N41* и *E. coli N7* представлены на рисунке 2. Равные количества клеток каждого штамма суспендировали в лизирующем буфере и определяли активность фермента, как описано в разделе «Материалы и методы». При этом проводили двукратные разбавления лизата в реакционной смеси. Из рисунка 2 видно, что активность *BpuN4I* в клетках *E. coli N41* в два раза выше, чем в *E. coli N7*.

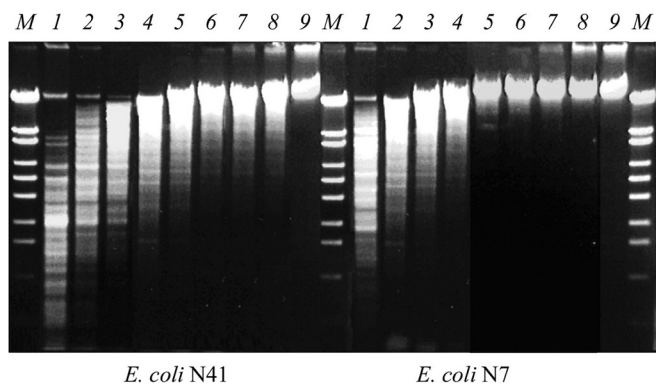


Рис. 2. Определение активности *BpuN4I* в разведениях лизатов клеток рекомбинантных продуцентов. Дорожки: 1 – 2-кратное разбавление клеток культуры в реакционной смеси; 2 – 4-кратное; 3 – 8×; 4 – 16×; 5 – 32×; 6 – 64×; 7 – 130×; 8 – 250×; 9 – без лизата. М – маркер длины ДНК (λ ДНК+*BssT1I*), состоящий из фрагментов 19329, 7743, 6223, 4254, 3472, 2690, 1882, 1489, 925 421 и 74 пар нуклеотидов. Электрофорез в 0,8% агарозном геле

Анализ структуры вставки ДНК плазмиды *pBpuN4/MR N41*. Нами была установлена первичная структура ДНК вставки плазмиды наиболее продуктивного штамма *E. coli N41* и полученная нуклеотидная последовательность была депонирована в GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/BpuN4I_RM.sqn *BpuN4I_RM* KF150199).

На рисунке 3 приведена физическая карта плазмиды *pBpuN4/MR N41*, которая содержит *MfeI*-фрагмент

ДНК *B. pumilus N4*, встроенный в вектор *pUC19/EcoRI*. Длина фрагмента составляет 3495 п.н. Встроенный фрагмент включает протяженные открытые рамки считывания, направленные в одну сторону. Как показано ниже, одна из этих рамок (1695–3023) представляет ген *bpuN4IM*, кодирующий ДНК-метилтрансферазу *BpuN4I*, а другая (624–1646) – ген *bpuN4IR*, кодирующий эндонуклеазу рестрикции *BpuN4I*.

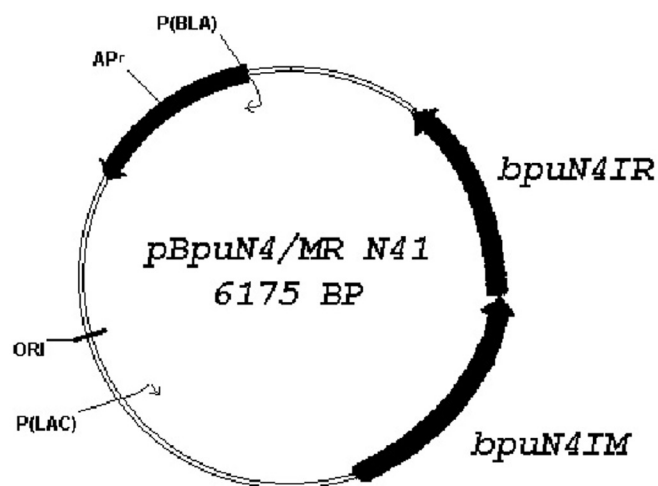


Рис. 3. Физическая карта рекомбинантной плазмиды *pBpuN4/MR N41*: ORI – точка начала репликации плазмиды *pBpuN4/MR*; *APc* – ген *BLA*, обеспечивающий устойчивость к ампициллину, *P(BLA)* – промотор гена *BLA*; *P(LAC)* – промотор гена *lacZ*; *bpuN4IR* – ген, кодирующий эндонуклеазу рестрикции *BpuN4I*; *bpuN4IM* – ген, кодирующий ДНК-метилтрансферазу *BpuN4I*

Рисунок 4 иллюстрирует результаты множественного выравнивания аминокислотной последовательности первой открытой рамки считывания с реально существующими и наиболее гомологичными белками, оказавшимися ДНК-метилтрансферазами с сайтами узнавания 5'-GGNNCC-3' или сходными. Таким образом, первая открытая рамка считывания кодирует фермент ДНК-метилтрансферазу *M.BpuN4I*. Анализ аминокислотной последовательности метилазы показал, что *M.BpuN4I* содержит все десять консервативных мотивов, характерных для цитозин (C5)-ДНК-метилтрансфераз (КФ 2.1.1.73) [5, 10].

Ввиду отсутствия во встроенном фрагменте других протяженных рамок считывания, мы сделали вывод, что вторая открытая рамка считывания кодирует ген рестриктазы *R.BpuN4I*. На рисунке 5 представлено множественное выравнивание *R.BpuN4I* и наиболее гомологичных белков.

<i>M. BpuN4I</i>	1	MKKVKFDLDFAGIGGIRSGFEOAFSENNIVPECVFTSEIKKHAIKVLEENYS----HGIFACDITKVD--VDEIFDFDFL
<i>M. NgoBV</i>	GGNCC	MQOIKFIDLFSGMSCHRRNGFEOACRQKQSVACECVFTSEIKKPAALEVLKONYP----DEVYGDITKIE--TGDIFDFDFL
<i>M. NlaIV</i>	GGNCC	MQOIKFIDLFSGMSCHRRNGFEOACRQKQSVACECVFTSEIKKPAALEVLKONYP----DEVYGDITKIE--TGDIFDFDFL
<i>M. BanI</i>	GGYRCC	--MKIKFDLDFAGIGGIRSGFEOAFSENNIVPECVFTSEIKKHAIKVLEENYS----HGIFACDITKVD--VDEIFDFDFL
<i>M. HgiCI</i>	GGYRCC	--MKIKFDLDFAGIGGIRSGFEOAFSENNIVPECVFTSEIKKHAIKVLEENYS----HGIFACDITKVD--VDEIFDFDFL
<i>M. HgiBI</i>	GGWCC	MQOIFRFDLDFAGIGGIRSGFEOAFSENNIVPECVFTSEIKKHAIKVLEENYS----HGIFACDITKVD--VDEIFDFDFL
<i>M. Sau3AI</i>	GATC	MNKIKVVEVDFAGVGGFRUGLENTKNG--IFDITWANQWEPSSRIQHAEDCYSKRFKNGIHNSNDHQAVSDEEMANTEADMT
<i>M. BpuN4I</i>	75	LAFGPCQPFSSGCKRLGFSQ---TRGTLFFETBRILFAKREVGFLLENVPGVVKHDLLENPKDKMCKTTSTINVLVETLGY
<i>M. NgoBV</i>	GGNCC	LAFGPCQPFSSGCKRLGFSQ---TRGTLFFETBRILFAKREVGFLLENVPGVVKHDLLENPKDKMCKTTSTINVLVETLGY
<i>M. NlaIV</i>	GGNCC	LAFGPCQPFSSGCKRLGFSQ---TRGTLFFETBRILFAKREVGFLLENVPGVVKHDLLENPKDKMCKTTSTINVLVETLGY
<i>M. BanI</i>	GGYRCC	71 LAFGPCQPFSSGCKRLGFSQ---TRGTLFFETBRILFAKREVGFLLENVPGVVKHDLLENPKDKMCKTTSTINVLVETLGY
<i>M. HgiCI</i>	GGYRCC	70 LAFGPCQPFSSGCKRLGFSQ---TRGTLFFETBRILFAKREVGFLLENVPGVVKHDLLENPKDKMCKTTSTINVLVETLGY
<i>M. HgiBI</i>	GGWCC	70 VGVVPCQPFSSGCKRLGFSQ---TRGTLFFETBRILFAKREVGFLLENVPGVVKHDLLENPKDKMCKTTSTINVLVETLGY
<i>M. Sau3AI</i>	GATC	80 VGVVPCQPFSSGCKRLGFSQ---TRGTLFFETBRILFAKREVGFLLENVPGVVKHDLLENPKDKMCKTTSTINVLVETLGY
<i>M. BpuN4I</i>	152	KVWVKVLDLDFAGIGGIRSGFEOAFSENNIVPECVFTSEIKKHAIKVLEENYS----HGIFACDITKVD--VDEIFDFDFL
<i>M. NgoBV</i>	GGNCC	152 YVSWKVLNAKDFGIPONRRRIYLLGSLKSNP----DLSFETSPSEKLNHLESGLPTSS--PFIKKIKKFKFPS----
<i>M. NlaIV</i>	GGNCC	152 YVSWKVLNAKDFGIPONRRRIYLLGSLKSNP----DLSFETSPSEKLNHLESGLPTSS--PFIKKIKKFKFPS----
<i>M. BanI</i>	GGYRCC	141 GVSYLLNLSSTFGVONRVRIYLLGSLKSNP----DLSFETSPSEKLNHLESGLPTSS--PFIKKIKKFKFPS----
<i>M. HgiCI</i>	GGYRCC	140 GV--YLLNLSSTFGVONRVRIYLLGSLKSNP----DLSFETSPSEKLNHLESGLPTSS--PFIKKIKKFKFPS----
<i>M. HgiBI</i>	GGWCC	140 SVFYKLNLSSTFGVONRVRIYLLGSLKSNP----DLSFETSPSEKLNHLESGLPTSS--PFIKKIKKFKFPS----
<i>M. Sau3AI</i>	GATC	156 NVFWRVINAADYVNAQRRRVFFPGYKQD-----LNYSKAMEESPLDNIYHNLGFAFFPIEDYANKNRVNR-----
<i>M. BpuN4I</i>	220	-----ELYGKSIIDRRGCKNNIHSWDLGLKCEVSSQKILGLLKERKKHWAEEKC--IDWMDGMLP
<i>M. NgoBV</i>	GGNCC	220 -----ELYGKSVDRGCKNNIHSWDLGLKCAVVEEKOGLNLLKERRKKNGLQKIC--IDWMDGMLP
<i>M. NlaIV</i>	GGNCC	220 -----ELYGKSVDRGCKNNIHSWDLGLKCAVVEEKOGLNLLKERRKKNGLQKIC--IDWMDGMLP
<i>M. BanI</i>	GGYRCC	218 DEFIGQLSKVGNFELPHGYRLIDVRGCG--NSIHSWELGKGDCKEETEBLNQLTANRRKKIYG-----THQDCKAL
<i>M. HgiCI</i>	GGYRCC	219 TDFVNKLLAFIGHPI--KNGKRLIDVRGCG--NSIHSWELGKGDCKEETEBLNQLTANRRKKIYG-----THQDCKAL
<i>M. HgiBI</i>	GGWCC	217 G--YNKLTPRGAFN---DFILNDIIRNCPISHSWELIYPT---DEREKQICMIMRNRNSRYGDCDQNPMSYQDIABL
<i>M. Sau3AI</i>	GATC	223 -----THITHDIVDI--SDNFSQFVNSC--IMKNGELITDITPKYKESVTLGELIESNVDDGFSL
<i>M. BpuN4I</i>	283	TLEEKTFYFPHENIKEMEDLTERKGYLKLHPKSLVEEFREDGVSVVKRKNPNIEKGNIVLCKLSFEFVKILDPNDIA
<i>M. NgoBV</i>	GGNCC	283 TKAQISTFFYKHPDLQNLIDSLTDKGYVLEHPKQKIGGQ-----RIKDESLPKGNIVSCKKSFINKILDNDVA
<i>M. NlaIV</i>	GGNCC	283 TKAQISTFFYKHPDLQNLIDSLTDKGYVLEHPKQKIGGQ-----RIKDESLPKGNIVSCKKSFINKILDNDVA
<i>M. BanI</i>	GGYRCC	290 TLEQIRTFYVNHQDLVHILKSLQKGYVLEHPKQKIGGQ-----RIKDESLPKGNIVSCKKSFINKILDNDVA
<i>M. HgiCI</i>	GGYRCC	290 TLEQIRTFYVNHQDLVHILKSLQKGYVLEHPKQKIGGQ-----RIKDESLPKGNIVSCKKSFINKILDNDVA
<i>M. HgiBI</i>	GGWCC	288 VAGLAEKELQTLVEKRIIRQYPDGKVEFFNRRLSGGIDG-----TYRIELPNARFGLTARGMHDIEAIEISVSGANA
<i>M. Sau3AI</i>	GATC	282 NQDQIDKFKYLRGPKKIKRTTKDGHEYYFSE-----GGMSETDLSLELDFARTM
<i>M. BpuN4I</i>	363	PTTFVADVSRLLGIVDGC--LROLLOGLKGLGFPDTERKFNVDDEGDLGLGNVSVVVKAKCKRKLCHSVSVNSLEVTH
<i>M. NgoBV</i>	GGNCC	354 PTTFVADVSRLLGIVDGC--LROLLOGLKGLGFPDTERKFNVDDEGDLGLGNVSVVVKAKCKRKLCHSVSVNSLEVTH
<i>M. NlaIV</i>	GGNCC	354 PTTFVADVSRLLGIVDGC--LROLLOGLKGLGFPDTERKFNVDDEGDLGLGNVSVVVKAKCKRKLCHSVSVNSLEVTH
<i>M. BanI</i>	GGYRCC	345 ITLTSDDAHKLGIVQNNV--PRRTIPRRCARLQGFDDIILHSNDNFAMKOLGNSVIVKVKVIEDLQNNVNELFGQMK
<i>M. HgiCI</i>	GGYRCC	345 ITLTSDDAHKLGIVQNNV--PRRTIPRRCARLQGFDDIILHSNDNFAMKOLGNSVIVKVKVIEDLQNNVNELFGQMK
<i>M. HgiBI</i>	GGWCC	361 EYKHNFIQO--VLLPKR--YRKLIVSBAARLQGFDDIILHSNDNFAMKOLGNSVIVKVKVIEDLQNNVNELFGQMK
<i>M. Sau3AI</i>	GATC	329 LTFSESSINRSTHFLNVDVYRITLPIBAERLNGFPDNTWTEGMPTRMRVFCMGNALVVELITRIQNGTEKIDSIITNDEFSQ
<i>M. BpuN4I</i>	442	I----
<i>M. NgoBV</i>	GGNCC	423 ----
<i>M. NlaIV</i>	GGNCC	423 ----
<i>M. BanI</i>	GGYRCC	424 LANVV
<i>M. HgiCI</i>	GGYRCC	420 ----
<i>M. HgiBI</i>	GGWCC	437 ----
<i>M. Sau3AI</i>	GATC	409 LRLF-

Рис. 4. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей *M. BpuN4I* и наиболее гомологичных по структуре TRD белков. В выравнивание включены только ДНК-метилтрансферазы с достоверно установленными сайтами узнавания. Район TRD обозначен звездочками

<i>R. BpuN4I</i>	1	MVESLYSTIYFIKGGISLRECIKQPKKMSDFEFKQTYSPFFIDENYENLVDSEIDSIVDSLVKNMKEI--GTIEGLMDYI
<i>WP_018195440</i>	1	-----MVDPSQEQKRVRTVIEHNTFEEKPVREVEEADKNAVAVLVDSTLSLRQVALYG--CREDVYFEHL
<i>WP_009413428</i>	1	-----MRSVDDKFLVIVDRNTYFFNT--KBEQEGYEGYINSVKETLLIVKKNVETEG--LKKIEIFEWLL
<i>YP_002378322</i>	1	-----MVEKTKQKRLNIVIEKNTYFYFNK--EEOEYVESYLNCLNQRLLLKNEIDNSNNKLSKELINTFL
<i>R. BpuN4I</i>	79	QSDEESDANILSLGFSABKFMRIITSMFRMTOGDNFN-----TEWKLKSOIRAKMLTNSAFANKICRLL
<i>WP_018195440</i>	64	QSNPGLDLSLALGFSABKFMRIITSMFRMTOGDNFN-----TEWKLKSOIRAKMLTNSAFANKICRLL
<i>WP_009413428</i>	61	AERKNGKALLALGFSABKFMRIITSMFRMTOGDNFN-----TEWKLKSOIRAKMLTNSAFANKICRLL
<i>YP_002378322</i>	65	LR--EYGLDLSLALGFSABKFMRIITSMFRMTOGDNFN-----TEWKLKSOIRAKMLTNSAFANKICRLL
<i>R. BpuN4I</i>	142	LNQASDEEFSDTIEKRYLDNIIIDERTLQQLTDKRLKRIYKQKRDCKYNNVDGDRVEDLIEARLTKIEKGVGITYERE-
<i>WP_018195440</i>	141	FRCKQVEIILQKFLPLIEFNKLGVHK-----LQSEALIDITVARYRLKGLKASKGNSPBRVIEQCLQAQGHKFERC----
<i>WP_009413428</i>	141	EEGASIEFLTNTIIELEBKLSISK-----LQSEALIDITVARYRLKGLKASKGNSPBRVIEQCLQAQGHKFERC----
<i>YP_002378322</i>	143	EEGATIEFLVKTIAPENLKLSISK-----LQSEALIDITVARYRLKGLKASKGNSPBRVIEQCLQAQGHKFERC----
<i>R. BpuN4I</i>	220	--KEVWNLARNMDFIIPNNNDYVILIEVSYQITSSAQTTKREVEVKTSEEIRRHNIQNGKDIQVFNIEGGWLGROSDM
<i>WP_018195440</i>	210	--KLEKVRRTDFIIPNNKSEKLVIESSYVITSSGQDKAKTEQEVREDLQRHYK-----DVLFWGVDGIGWVVRKDL
<i>WP_009413428</i>	218	ISNAPNNKRTMDFIIPNNKSEKLVIESSYVITSSGQDKAKTEQEVREDLQRHYK-----DVLFWGVDGIGWVVRKDL
<i>YP_002378322</i>	220	VREHKSNRRTMDFIIPNNKSEKLVIESSYVITSSGQDKAKTEQEVREDLQRHYK-----DVLFWGVDGIGWVVRKDL
<i>R. BpuN4I</i>	300	RKLVHCSDYVININTLDMLESIIYKHPVDFKFTTEKPELID
<i>WP_018195440</i>	287	ERLVSADFDDVTFADIEIQRRQRILCDVFK
<i>WP_009413428</i>	294	KRMVTAVEDVFTFHTDELRRREKLIIEFKNDK-----
<i>YP_002378322</i>	296	KRMVAVEDVFTLHEDELTRREKLSVCL-----

Рис. 5. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей *R. BpuN4I* и наиболее гомологичных белков

Для гипотетических белков указаны номера GenBank (WP_018195440 – candidate division EM19 bacterium SCGC AAA471-D06; WP_009413428 – *Carpocytophaga* sp. oral taxon 326; YP_002378322 – *Cyanothece* sp. PCC 7424). Звездочками обозначен предположительный каталитический участок ферментов. В отличие от метилазы, нам не удалось выявить существенной гомологии рестриктазы BpuN4I с другими эндонуклеазами рестрикции с известным сайтом узнавания, что связано с их большой генетической вариабельностью.

Заключение

PM-систему рестрикции-модификации BpuN4I (сайт узнавания 5'-GGNCC-3') из штамма *B. pumilus* N4, содержащую уникальный неоизомер рестриктазы NlaIV, клонировали в *E. coli*. Для отбора рекомбинантных продуцентов рестриктазы нами был предложен метод селекции, основанный на делении (разведении) полученной библиотеки клонов с прямым определением активности эндонуклеазы рестрикции в суммарных лизатах клеток. С помощью предложенного метода был выявлен рекомбинантный штамм *E. coli* N41(pBpuN4/MR), являющийся продуцентом фермента BpuN4I. Была установлена структура ДНК плазмидной вставки штамма *E. coli* N41(pBpuN4/MR) и показано, что она содержит гены ДНК-метилтрансферазы M.BpuN4I и эндонуклеазы рестрикции BpuN4I. Сравнительный анализ аминокислотной последовательности ферментов, кодируемых данными генами, выявил гомологию M.BpuN4I с другими метилазами, узнающими сайт 5'-GGNCC-3' или сходный с ним. В аминокислотной последовательности M.BpuN4I выявлены все 10 доменов, характерных для 5mC-ДНК-метилтрансфераз.

Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации по государственному контракту, заключенному в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы». Государственный контракт № 14.512.11.0051.

Литература

1. Дедков В. С., Дегтярев С.Х. Определение эндонуклеаз рестрикции в колониях микроорганизмов *Streptomyces* и

Nocardia. // Прикл. биохимия и микробиология. – 1992. – Т. 28. – С. 309–313.

2. Дедков В.С., Погребняк В.Б. Определение эдонуклеаз рестрикции в лизатах из отдельных колоний бактерий и измерение активности BamHI, PstI и MspI у бактерий, выращенных на питательном агаре и в бульоне / В кн.: Внехромосомные генетические элементы: значение для науки и практики: 6-е рабочее совещание по программе «Плазмида». Тезисы докладов. – М., 1981. – С. 50–51.
3. Чернухин В.А., Михненкова Н.А., Ломаковская Е.Н., Шинкаренко Н.М., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Новая сайт-специфическая эндонуклеаза рестрикции BpuN4I узнает и расщепляет последовательность ДНК 5'-G[^]GNCC-3' // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2013. – Т. 9. – № 2. – С. 5–8.
4. Bougueleret L., Schwarzstein M., Tsugita A., Zabeau M. Characterization of the genes coding for the EcoRV restriction and modification system of *Escherichia coli* // *Nucleic Acids Res.* – 1984. – Vol. 12. – P. 3659–3677.
5. Klimasauskas S., Nelson J.L., Roberts R.J. The sequence specificity domain of cytosine-C5 methylases // *Nucleic Acids Res.* – 1991. – Vol. 19. – P. 6183–6190.
6. Morgan R.D., Xu Q. Type II restriction endonuclease, Hpy188I, obtainable from *Helicobacter pylori* J188 and a process for producing the same // *United States Patent 6258583*. – 2001.
7. Morgan R.D., Xu Q. Type II restriction endonuclease, Hpy99I, obtainable from *Helicobacter pylori* J99 and a process for producing the same // *United States Patent 6280992 B*. – 2001.
8. New England BioLabs, Inc. 2000–01 Catalog & Technical Reference. USA. – P. 226–229.
9. Roberts R.J., Halford S.E. Type II restriction enzymes / In: *Nucleases* (Linn S.M., Lloyd R.S., Roberts R.J. Eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. – 1993. – P. 35–88.
10. S-Adenosylmethionine-Dependent Methyltransferases: Structures and Functions / Editors: Cheng X., Blumenthal R.M. – World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.: Singapore, New Jersey, London, Hong Kong, 1999.
11. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. – Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1987.
12. Smith C.L., Klco S.R. and Cantor C.R. / Davies K. (ed.). *Genome Analysis: A Practical Approach*. – IRL Press, Oxford. UK, 1987.
13. Szomolanyi, E., A. Kiss, and P. Venetianer. Cloning the modification methylase gene of *Bacillus sphaericus* R in *Escherichia coli* // *Gene*. – 1980. – Vol. 10. – P. 219–225.
14. Wilson G.G., Murray N.E. Restriction and modification systems // *Annu. Rev Genet.* – 1991. – Vol. 25. – P. 585–627.

15. Zhu Z., Pedamallu C.S., Fomenkov A., Benner J., Xu S-Y. Cloning of NruI and Sbo13I restriction and modification system in *E.coli* and amino acid sequences comparison of M.NruI and M.Sbo13I with other amino-methyltransferases. // BMC Research notes. – 2010. – Vol. 3. – P. 139.

Список сокращений:

б.о.е. – бляшку образующая единица (активная частичка бактериофага),
БСА – бычий сывороточный альбумин,
е.а. – единицы активности (фермента).

КОЕ – колонию образующая единица (живая клетка бактерии),
о.е. – оптические единицы плотности,
ПААГ – полиакриламидный гель,
п.н. – пары нуклеотидов ДНК.
РМ системы – системы рестрикции-модификации,
SE-буферы – буферы для сайт-специфических ДНК-эндонуклеаз производства ООО, «СибЭнзим» (<http://www.sibenzyme.com/>).

CLONING OF BpuN4I RESTRICTION-MODIFICATION SYSTEM WITH APPLICATION OF THE LIBRARY DIVIDING METHOD

V.S. DEDKOV, D.A. GONCHAR, V.A. CHERNUKHIN, M.A. ABDURASHITOV,
E.N. LOMAKOVSKAYA, N.M. SHINKARENKO, S.Kh. DEGTYAREV

SibEnzyme Ltd, Novosibirsk

The BpuN4I restriction-modification system of *Bacillus pumilus* N4 (recognition site 5'-GGNNCC-3') includes an unique neoschizomer of NlaIV restriction endonuclease. RM-system BpuN4I was cloned in *Escherichia coli*. Selection of the cloned library for a recombinant producer of BpuN4I restriction endonuclease was achieved by a suggested method of subsequent dilution of the obtained clones with the direct determination of the enzyme activity in the pools of recombinant cells. The classical selection methods were used as well: selection of the clones resistant to bacteriophage and selection of the clones resistant to a target restriction endonuclease. Two variants of recombinant BpuN4I producer were obtained and their activity was determined. Nucleotide sequence of DNA insertion of the most productive strain was determined and deposit in GenBank data base. Primary structure of DNA methyltransferase M.BpuN4I and restriction endonuclease BpuN4I was determined. The amino acid sequence of M.BpuN4I has revealed all ten domains specific for 5mC-DNA-methyltransferases.

Keywords: restriction endonuclease, neoschizomer, DNA-methyltransferase, selection of a producer.

КОНЦЕПЦИЯ МОДУЛЬНОЙ ЭНЕРГОУСТАНОВКИ НА ОСНОВЕ ВОЗОБНОВЛЯЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ ЭНЕРГИИ С СИСТЕМОЙ ВОДОРОДНОГО АККУМУЛИРОВАНИЯ ЭНЕРГИИ

О.Л. АМОСОВА^{1*}, В.В. БУТЫЛИН², Р.Г. ВАСИЛОВ², В.В. ТЕПЛЯКОВ¹

¹ *Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН,*

² *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва*

Обзор с использованием собственных данных. В работе представлена концепция технологической платформы модульной энергоустановки на основе возобновляемых источников энергии. Платформа предполагает усовершенствование способов получения возобновляемых источников энергии, разработку системы водородного аккумулирования энергии и его использование в топливных элементах. Концепция подтверждается данными литературы и собственными исследованиями. В работе также рассмотрены возобновляемые источники энергии, в том числе, получение водорода при помощи бактерий-продуцентов водорода, пиролиза осадка сточных вод.

Ключевые слова: биоводород, металлгидриды, топливные элементы, технологическая платформа.

Введение

В современных условиях, когда традиционные энергоресурсы (нефть, природный газ), пригодные к использованию в промышленности и в быту, постоянно сокращаются и, как следствие, повышаются затраты предприятий на эти энергоресурсы, все больше компаний начинают разрабатывать и применять технологии, связанные с возобновляемыми источниками энергии. Необходимо также отметить, что существует проблема доступности энергоресурсов для населения, временно или постоянно проживающего на территориях, не обеспеченных электрической энергией от действующих сетей.

Прежде всего, популярность технологических платформ, связанных с возобновляемыми источниками энергии [11], определяется рядом преимуществ по сравнению с традиционными источниками энергоресурсов: возобновляемость и снижение антропогенной нагрузки на окружающую среду. В соответствии с резолюцией № 33/148 Генеральной Ассамблеи ООН (1978 г.) к нетрадиционным и возобновляемым источникам энергии относятся: солнечная, ветровая, геотермальная, энергия

морских волн, приливов и океана, тяглового скота, сланцев, битуминозных песчаников и гидроэнергия больших и малых водотоков, энергия биомассы, древесины, древесного угля, торфа.

Актуальными, в частности, являются следующие направления исследований [8, 19]:

- производство H_2 непосредственно на месте его использования;
- производство H_2 посредством преобразования природного газа и электролиза воды;
- стационарные высокотемпературные системы топливных элементов (ТЭ) на расплаве карбоната, твердо-окисные ТЭ и другие ТЭ;
- исследование гибридных систем энергоснабжения автономных потребителей с использованием возобновляемых источников энергии и теплонасосных установок;
- разработка и создание гибридных блочно-модульных автономных энергокомплексов, оптимально использующих органическое топливо, ветровую и солнечную энергию для энергоснабжения потребителей в изолированных энергорайонах.

Следует указать на то, что в настоящее время мировая потребность в энергоустановках для децентрализованного энергоснабжения, по разным оценкам, составляет около 50–100 тыс. единиц в год [6].

В настоящей работе предложена платформа модульных энергоустановок на основе возобновляемых источников энергии мощностью до 10 кВт(э) с системой водородного аккумулирования энергии. В данных установ-

© 2013 г. Амосова О.Л., Бутылин В.В., Василев Р.Г., Тепляков В.В.

* **Автор для переписки:**

Амосова Ольга Леонидовна

к.х.н., н.с. лаборатории физико-химии мембранных процессов ИХХС РАН

119991 Москва, Ленинский пр., 29

Тел.: +7 (495) 955-42-29

E-mail: o.amosova@gmail.com

как на первом этапе за счет возобновляемых источников энергии производится электричество, с помощью которого осуществляется электролиз воды и получается H_2 .

В установке система аккумуляирования H_2 предполагает хранение H_2 в виде металлгидридов или в баллонах под давлением до 13,0 МПа. На втором этапе, при необходимости, H_2 извлекается путем нагрева аккумулятора H_2 или снижения давления над металлгидридом или интерметаллическим соединением, в результате чего происходит выделение / десорбция H_2 . На третьем этапе с помощью водородных топливных элементов генерируется электричество.

Данные установки характеризуются мобильностью, например, возможно использование энергоустановки совместно с системой генерации и хранения H_2 в едином контейнере с установкой его на транспортное средство. Установки могут обеспечить подачу электроэнергии потребителям, удаленным от центральных распределительных сетей, а также обеспечить бесперебойное и аварийное энергообеспечение потребителей, подключенных к распределительным сетям. Концепция платформы представлена на рисунке 1.

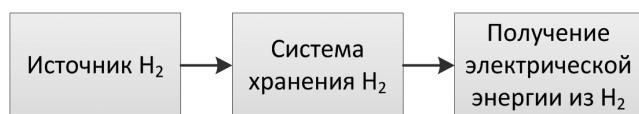


Рис. 1. Концепция модульной энергоустановки на основе возобновляемых источников энергии с системой водородного аккумуляирования энергии

1-й этап. Получение H_2

Разрабатываемая энергоустановка предполагает использование различных возобновляемых источников энергии (рис. 2).

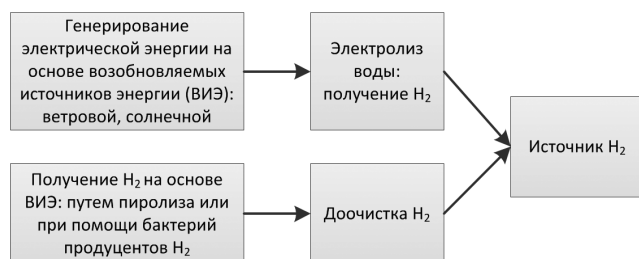


Рис. 2. Предлагаемые источники H_2 для использования в энергоустановке

Для получения H_2 предлагается использовать электролизер высокого давления (до 13,0 МПа) с твер-

дотельным полимерным электролитом. Чистота получаемого водорода составляет более 99,99%, данная степень чистоты удовлетворяет требованиям, предъявляемым к качеству H_2 при его хранении в виде металлгидридов и использовании в ТЭ [10]. Источником энергии для производства H_2 может быть солнечная, ветровая энергия или геотермальная. Энергия от светового потока может получаться путем преобразования солнечного излучения в электрическую энергию в фотоэлектрических установках на фотоэлектрических или солнечных станциях, работающих параллельно с сетью, а также в составе гибридных установок для автономных систем [3, 11]. Сегодня использование энергии ветра — чрезвычайно динамично развивающаяся отрасль мировой энергетики [5]. Для перевода кинетической энергии ветра в электрическую энергию в основном используются крыльчатые ветроагрегаты благодаря высокой скорости их вращения, возможности соединяться непосредственно с генератором электрического тока без мультипликатора и высоким коэффициентом использования энергии ветра. Геотермальная энергия подразумевает использование тепла, запасенного жидкими или твердыми средами, находящимися на определенных глубинах. Существующие геотермальные электростанции представляют собой одноконтурные системы, в которых геотермальный пар непосредственно работает в паровой турбине, или двухконтурные с низкокипящим рабочим телом во втором контуре.

В энергоустановках возможно использование H_2 , полученного другими, в том числе традиционными, способами. К настоящему времени большую часть H_2 (80–85%) получают путем паровой конверсии углеводородного сырья, главным образом, природного газа (метана) [3, 10]. В рамках обсуждаемой концепции, предполагающей применение возобновляемых источников энергии, наиболее перспективными являются разработки, основанные на использовании бактерий-продуцентов H_2 [17, 24] и биосингаза [13, 18], получаемого пиролизом твердых бытовых отходов (ТБО) и древесины, отходов растениеводства и животноводства [23]. Отдельно стоит отметить высокий потенциал технологии получения H_2 из газов пиролиза осадков сточных вод (активного ила) [14, 15, 22, 26]. Это связано с тем, что для многих городов, населенных пунктов и промышленных предприятий проблема обработки и утилизации осадков сточных вод, в том числе избыточного активного ила, является весьма актуальной. Часто осадки в необработанном виде в течение десятков лет сливались на перегруженные иловые площадки, в отвалы, карьеры, что привело к нарушению экологической

безопасности и условий жизни населения. Одним из наиболее разработанных процессов промышленной переработки осадков сточных вод, отдельно или в комплексе с переработкой ТБО, является пиролиз. Частичный пиролиз термодинамически эффективнее, чем сжигание, так как для проведения процесса достаточно от 25 до 50% воздуха, теоретически необходимого для горения. В результате пиролиза осадков сточных вод остается полукокс (до 45%), смола (до 20%) и газообразные продукты (до 20%), пары воды (до 15%), соотношение которых определяется температурой процесса, а также содержанием в исходном продукте органических веществ и влажности осадка [26]. Надо подчеркнуть, что количество газообразных продуктов составляет в среднем 9–11,5% от общей массы сухого вещества и 17–20% от массы органических веществ. В выделяющихся газах содержатся водород (до 36%), метан (до 14,7%), предельные и непредельные углеводороды (7,1%), окись углерода (21,8%), диоксид углерода (13,6%), азот (6,3%), а также в незначительных количествах сероводород [14, 15, 22, 26]. Кроме того, возможен совместный пиролиз ТБО и механически обезвоженных осадков сточных вод, что создает более благоприятные условия для осуществления процесса. В результате пиролиза ТБО образуется газ следующего состава: водород (31–32%), метан (25–31%), окись углерода (20,0–27,0%), диоксид углерода (7,0–13,0%), а также в незначительных количествах сероводород, азот, углеводороды [7].

Преимущество получения H_2 пиролизом обусловлено простым и качественным управлением процессом, стабильностью процесса при изменении качества используемого сырья, уменьшенным выносом золы и других загрязняющих веществ в атмосферу, значительным уменьшением потребности в топливе, в том числе возможностью проведения процесса пиролиза без использования дополнительного источника топлива.

На практике оправданной альтернативой пиролизу в установке может стать биоводород, продуцируемый зелеными водорослями, например, *Chlamydomonas reinhardtii* и цианобактериями за счет биофотоллиза [21], бактериями, способными к темновой ферментации (темновому брожению), за счет использования высокомолекулярных источников углерода, таких как углеводы [28], а также бактериями, способными к фотоферментации, за счет расщепления органических субстратов при освещении в анаэробных условиях [4].

Однако газовые смеси, получаемые в пиролизном реакторе или в биореакторе [4, 7, 13–15, 17, 18, 21–24, 26, 28], содержат значительное количество примесей и

не могут быть непосредственно аккумулированы в виде металлгидридов или использованы в ТЭ, в связи с чем требуют дополнительной предварительной очистки. В зависимости от сырья, продуктовая водородсодержащая смесь содержит 9–52,8% H_2 , 17–42% CO , 7–35% CO_2 , 0–6,3% N_2 , 1–15% CH_4 , 0–1% H_2S (приведены значения, усредненные для пиролизной газовой смеси и биоводорода).

В промышленности для выделения и очистки H_2 применяют мембранные, адсорбционные, абсорбционные и криогенные технологии [3, 25]. Выбор подходящей технологии зависит как от экономических показателей, так и от требуемых производственных характеристик: состав исходной газовой смеси, производительность установки и эксплуатационные (операционные) расходы, чистота получаемого газа, компактность, гибкость, возможность модульного масштабирования процесса, техническая и экологическая безопасность, энергозатраты.

При этом мембранные и адсорбционные методы (в условиях короткоциклового разделения) относятся к молекулярно-селективным процессам газоразделения и не содержат в себе энергозатрат на фазовые переходы, а также подходят для малотоннажных производств. Таким образом, наиболее перспективными представляются мембранный и адсорбционный методы для выделения H_2 из газовых смесей, полученных пиролизом осадков сточных вод и ТБО или бактериями-продуцентами H_2 .

В разработанной платформе с учетом проведенных ранее исследований [2, 4] предлагается использовать гибридные мембранно-адсорбционные процессы газоразделения для извлечения и очистки H_2 . За счет мембранного предконцентрирования H_2 гибридным мембранно-адсорбционным методом можно выделять H_2 из смесей с содержанием H_2 менее 50% об., при этом процесс может быть организован с применением коммерчески доступных мембран. Важно при этом отметить, что использование мембранных модулей для предконцентрирования H_2 повышает эффективность КЦА, в частности, степень извлечения H_2 [2–4, 20, 25].

Также для повышения чистоты получаемого H_2 предлагается использовать, кроме активированных углей в адсорберах, и другие сорбенты: коммерчески доступные H_2O -селективные адсорбенты, такие как цеолиты типа А, X, Y, морденит, активированный оксид алюминия, силикагель [12, 27]. Применение данных адсорбентов позволит получить H_2 со степенью чистоты, достаточной для его хранения в виде гидридов металлов и использования в ТЭ.

2-й этап. Аккумуляирование и извлечение H_2

При разработке платформы модульных энергоустановок были рассмотрены различные варианты аккумуляирования H_2 , в качестве наиболее перспективных были выбраны системы баллонного хранения и системы аккумуляирования H_2 в виде гидридов металлов (рис. 3).

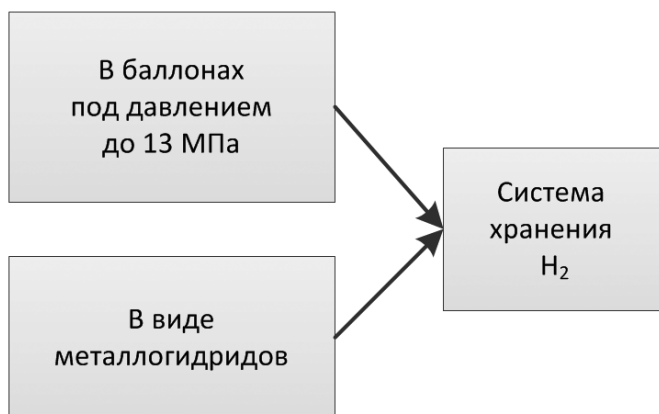


Рис. 3. Системы хранения H_2 для использования в энергоустановке

Для аккумуляирования H_2 с целью его транспортировки к месту использования предполагается применение баллонов высокого давления. Данное направление активно развивается, в частности ведутся работы по снижению веса баллонов; для этого предлагается использовать баллоны из полимерных композиционных материалов. Снижение веса баллонов и повышение прочностных характеристик позволят повысить удельную емкость баллонов ($\text{кг } (H_2)/\text{кг } (\text{баллона})$) и давление H_2 в баллоне.

Система аккумуляирования H_2 предполагает разработку и усовершенствование H_2 -селективных абсорбентов, таких как металлы и их сплавы, образующие гидриды, например, Pd, V, Li, Mg, PdAg, MgNi, FeTi, LaNi [3, 9, 10, 16]. Металлы могут поглощать значительное количество H_2 , а затем при незначительных изменениях условий (давление, температура) возвращать его обратно; при этом большая часть возвращаемого H_2 выделяется при примерно одинаковом давлении [3, 9, 10]. Это обусловлено тем, что в данном случае происходит не растворение H_2 в металле, а идет обратимая химическая реакция. Это направление заслуживает особого внимания, так как аккумуляирующая способность по H_2 этих материалов достаточно высока. Концентрация H_2 на единицу объема в гидридах даже выше, чем у жидкого H_2 [10]. К настоящему времени опубликовано несколько тысяч работ, посвященных взаимодействию

H_2 с различными металлами и их сплавами; характерные емкости по H_2 этих материалов представлены в обзорах [9, 16]. Однако большая часть металлгидридов чувствительна к содержанию примесей в водороде (H_2O, O_2), а в некоторых случаях и к CO, и, как было отмечено выше, требуется предварительная очистка водородсодержащих газов от примесей, что может быть обеспечено мембранными или адсорбционными методами очистки газов. Тем не менее необходимы дополнительные исследования и усовершенствование (стабилизация, снижение чувствительности к примеси) металлгидридов для более эффективного их использования в качестве аккумуляторов H_2 [9].

В работе также рассматривались системы хранения H_2 в высокопористых углеродных материалах, в том числе в углеродных нанотрубках, а также металлоорганических каркасных структурах [1]. Данное направление активно исследовалось с 1997 года после нескольких публикаций о возможности достижения величины адсорбции в 7 масс % H_2 пористыми углеродными материалами. Однако к настоящему времени так и не были получены независимые лабораторные результаты, подтверждающие высокую адсорбционную способность пористых углеродных материалов. Поэтому в настоящей работе данный способ хранения не предполагается использовать в системе аккумуляирования H_2 в энергоустановках.

3-й этап. Производство электричества с использованием ТЭ

Традиционные газопоршневые, дизельные и газотурбинные установки имеют множество недостатков, главными из которых являются довольно низкий КПД, а также негативное воздействие на окружающую среду [6, 19]. В качестве наиболее перспективных энергетических установок для малой энергетики предлагается использование установки на основе ТЭ.

Установки на основе ТЭ, в отличие от традиционных установок, обеспечат следующие экономические и потребительские преимущества [6]:

- снижение выбросов вредных веществ в окружающую среду;
- эффективное использование топлива и высокий КПД;
- снижение затрат на эксплуатацию (не требуются замена масла, присутствие оператора);
- плавные вольт-амперные характеристики, высокая маневренность и эффективность во всем диапазоне нагрузок.

В предлагаемой нами платформе выбраны такие параметры ТЭ: в качестве окислителя в ТЭ используется кислород атмосферного воздуха; при этом КПД составляет не менее 50%, рабочая температура не более 90 °С, охлаждение ТЭ жидкостное, исполнение модульное фильтр-прессного типа, в состав входят мембранно-электродные блоки, в том числе биполярные пластины.

Заключение

Таким образом, в работе представлены результаты разработки платформы модульных энергоустановок на основе возобновляемых источников энергии мощностью до 10 кВт(э) с системой водородного аккумулирования энергии. Предлагаемая для использования энергоустановка компактна, надежна. Энергоустановки могут обеспечить подачу электроэнергии потребителям, удаленным от центральных распределительных сетей, а также обеспечить бесперебойное и аварийное энергообеспечение потребителей, подключенных к распределительным сетям.

Работа выполнена в рамках реализации ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы». Государственный контракт № 16.526.11.6009 от 28 октября 2011 г.

Литература

- Амосова О.Л., Ефимова Е.А., Шорникова О.Н., Коган Е.В., Погосян А.С., Тепляков В.В. Сорбция и перенос водорода и углеводов в углеродных материалах // В сб.: Материалы XVIII Менделеевского съезда по общей и прикладной химии, «Химия материалов, наноструктуры и нанотехнологии». Москва, 24–28 сентября 2007. — М., 2007. — Т. 2. — С. 85.
- Амосова О.Л., Тепляков В.В. Особенности разделения водородсодержащих многокомпонентных газовых смесей биотехнологии с применением мембранно-адсорбционных методов // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2012. — Т. 8. — № 2. — С. 5–14.
- Водород. Свойства, получение, хранение, транспортирование, применение: Справ. изд. / Гамбург Д.Ю., Семенов В.П., Дубровкин Н.Ф., Смирнова Л.Н. Под ред. Д.Ю. Гамбурга, Л.Н. Смирнова. — М.: Химия, 1989. — 672 с.
- Гасанова Л.Г., Садраддинова Э.Р., Нетрусов А.И., Тепляков В.В., Зенькевич В.Б., Модигель М. Мембранные биореакторы для получения горючих газов // Критические технологии. Мембраны. — 2007. — № 1(33). — С. 32–42.
- Лисов О.М., Степанов В.Е. Энергетика, экология и альтернативные источники энергии // Экология промышленного производства: Межотрасл. науч.-практ. журн. по отеч. и заруб. матер. — М.: ВИМИ, 2006. — № 1. — С. 47–55.
- Михайлов А., Сайданов В., Ланграф И. Энергетические установки на базе топливных элементов. Перспективы применения // Новости электротехники. — 2007. — Т. 5(47) (электронная версия журнала <http://www.news.elteh.ru/arh/2007/47/10.php>).
- Панцхава Е.С., Пожарнов В.А. В перспективе Россия — крупнейший поставщик биотоплива на мировой рынок // Энергия: экономика, техника, экология. — 2005. — Т. 6. — С. 10–19.
- Попель О.С., Туманов В.Л. Возобновляемые источники энергии: состояние и перспективы развития // Альтернативная энергетика и экология. — 2007. — № 2(46). — С. 135–148.
- Тарасов Б.П., Бурнашева В.В., Лотоцкий М.В., Яртысь В.А. Методы хранения водорода и возможности использования металлгидридов // Альтернативная энергетика и экология. — 2005. — № 12(32). — С. 14–37.
- Тарасов Б.П., Лотоцкий М.В. Водород для производства энергии: проблемы и перспективы // Альтернативная энергетика и экология. — 2006. — № 8(40). — С. 72–90.
- Технологическая платформа «Перспективные технологии возобновляемой энергетики» [Электронный ресурс]: http://www.rushydro.ru/activity/emerging_technologies (дата обращения: 01.08.2013).
- Alizadeh-Khiavi, Soheil Roy, Surajit Sawada, James A. Adsorptive separation of gas streams. US Pat. 7,189,280 (2007).
- Cohce M.K., Dincer I., Rosen M.A. Thermodynamic analysis of hydrogen production from biomass gasification // International Journal of Hydrogen Energy. — 2010. — Vol. 35. — P. 4970–4980.
- Dominguez A., Menendez J.A., Pis J.J. Hydrogen rich fuel gas production from the pyrolysis of wet sewage sludge at high temperature // J. Anal. Appl. Pyrolysis. — 2006. — Vol. 77. — P. 127–132.
- Fonts I., Azuara M., Gea G., Murillo M.B. Study of the pyrolysis liquids obtained from different sewage sludge // J. Anal. Appl. Pyrolysis. — 2009. — Vol. 85. — No. 1–2. — P. 127–132.
- Grochala W., Edwards P.P. Thermal decomposition of the non-interstitial hydrides for the storage and production of hydrogen // Chem. Rev. — 2004. — Vol. 104. — P. 1283–1315.
- Han H., Wei L., Liu B., Yang H., Shen J. Optimization of biohydrogen production from soybean straw using anaerobic mixed bacteria // International Journal of Hydrogen Energy. — 2012. — Vol. 37. — No. 17. — P. 13200–13208.
- Holladay J.D., Hu J., King D.L., Wang Y. An overview of hydrogen production technologies // Catalysis Today. — 2009. — Vol. 139. — P. 244–260.

19. <http://www.fch-ju.eu> (дата обращения: 01.08.2013).
20. Hybrid Membrane-Pressure Swing Adsorption (PSA) Hydrogen Purification System // <http://www.fch-ju.eu/project/hybrid-membrane-pressure-swing-adsorption-psa-hydrogen-purification-systems> (дата обращения: 01.08.2013).
21. Lam M.K., Lee K.T. Chapter 8 – Biohydrogen Production from Algae // Biohydrogen. Edited by Ashok Pandey, Jo-Shu Chang, Patrick C. – Hallenbecka and Christian Larroche, 2013. – P. 161–184.
22. Molto J., Barneto A.G., Ariza J., Conesa J.A. Gas production during the pyrolysis and gasification of biological and physico-chemical sludges from oil refinery // J. Anal. Appl. Pyrolysis. – 2012. – Vol. 103. – P. 167–172.
23. Qinglan H., Chang W., Dingqiang L., Yao W., Dan L., Guiju L. Production of hydrogen-rich gas from plant biomass by catalytic pyrolysis at low temperature // International Journal of Hydrogen Energy. – 2010. – Vol. 35. – P. 8884–8890.
24. Schnitzhofer W., Herzer S., Wukovits W., Ahrer W., Friedl A., de Vrije T., Claassen P.A.M. Non-thermal production of pure hydrogen from biomass: A sustainable pathway to biological hydrogen // Energy. – 2008. – Vol. 25. – P.115–123.
25. Separation Technology R&D Needs for Hydrogen Production in the Chemical and Petrochemical Industries A Chemical industry Vision 2020 Initiative to help identify future R&D needs // www.chemicalvision2020.org URL: http://www.chemicalvision2020.org/pdfs/h2_report.pdf (дата обращения: 20.01.2011).
26. Xiong S., Zhuo J., Zhang B., Yao Q. Effect of moisture content on the characterization of products from the pyrolysis of sewage sludge // J. Anal. Appl. Pyrolysis. – 2013 (in press).
27. Yang R.T. Adsorbents, Fundamentals and Applications. – New Jersey: Wiley – Interscience, Hoboken, 2003.
28. Yeong W.T., Xiao J., Wen H., Bi K.L., Ching J.J., Jamaliah Md.J. Recent advances in reuse of waste material as substrate to produce biohydrogen by purple non-sulfur (PNS) bacteria // Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2012. – Vol. 16. – P. 3117–3122.

Список используемых сокращений:

ТЭ – топливный элемент

ТБО – твердые бытовые отходы

ВИЭ – возобновляемые источники энергии

THE CONCEPT OF MODULAR POWER PLANTS BASED ON RENEWABLE ENERGY SOURCES WITH HYDROGEN ENERGY STORAGE SYSTEM

O.L. AMOSOVA¹, V.V. BUTYLIN², R.G. VASILOV², V.V. TEPLYAKOV¹

¹ A.V. Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis RAS,

² National Research Centre «Kurchatov Institute», Moscow

Overview of using their own data. This paper introduces the concept of a modular technology platform power plants based on renewable energy sources. The platform involves improved methods of obtaining renewable energy sources, the development of hydrogen energy storage system and its use in fuel cells. The concept is supported by the literature and his own research. The paper also discussed renewable energy sources, including the production of hydrogen by means of hydrogen-producing bacteria, the pyrolysis of sewage sludge.

Keywords: biohydrogen, metal hydrides, fuel cell technology platform.

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ БИОДИЗЕЛЯ

П.М. ГОТОВЦЕВ^{1*}, М.А. ЛОМОНОСОВА¹, В.В. БУТЫЛИН¹,
Е.Б. МОСТОВА², Н.И. ПЕРКОВСКАЯ²

¹НИЦ «Курчатовский институт»,

²ФГУП «ГосНИИгенетика», Москва

В обзорной статье рассмотрены результаты современных исследований в области получения биодизеля методом переэтерификации. В область рассмотрения попали как технологии химического синтеза, так и решения с использованием биокатализаторов. Проведен анализ представленных в обзоре решений и сделаны выводы о перспективности исследований в данной области.

Ключевые слова: биодизель, технологии.

Введение

В настоящее время существенную роль в энергетической политике развитых стран играют биотоплива. Интерес к таким топливам связан с двумя факторами [6]: а) снижение выбросов углекислого газа; б) обеспечение страны собственным топливом как часть стратегии энергетической независимости. Снижение выбросов углекислого газа при использовании биотоплив обусловлено циклом углекислого газа в природе. Считается, что выброшенный в атмосферу при сжигании биотоплива углекислый газ будет использован выращиваемыми для топливных нужд растениями в процессе фотосинтеза.

Одним из видов биотоплив, интерес к которому сейчас крайне высок, является биодизель [2]. Такой интерес связан с увеличением доли автотранспорта с дизельными двигателями с высокими техническими характеристиками. Также дизельные энергетические установки находят применение в малой энергетике для энергоснабжения небольших удаленных поселений или в качестве резервного источника энергии для объектов повышенной важности. Еще одним существенным фактором в пользу использования биодизеля является его склонность к биodeградации, что существенно снижает экологический ущерб в случае разливов данного вида топлива. Таковую роль биодизеля наглядно характеризует

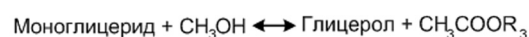
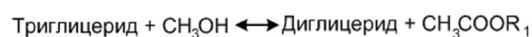
рост его производства в США, так если в 2005 году производилось 75 миллионов галлонов, то в 2007 г. уже 450 миллионов галлонов [2, 27].

В то же время выращивание культур для энергетических целей ведет к сокращению потенциальных площадей для выращивания пищевых культур. Следовательно, значимую роль играет выбор культуры и ее способность произрастать в условиях, не совсем приемлемых для пищевых культур. Так, например, для Бразилии наиболее интересным с точки зрения экономики и производства продовольствия оказалось получение пальмового масла [29]. Несмотря на это, увеличение производства биодизеля продолжается: так, в ЕС с 2008 по 2010 гг. оно выросло на 180% [17].

Таким образом, можно сделать заключение, что биодизель становится все более и более востребованным топливом, в связи с чем необходимо обратить внимание на современные и перспективные технологии его получения. Обзор и анализ применяемых технологий и результатов последних исследований может помочь сделать выводы о тех направлениях в технологиях получения, которые могут оказаться наиболее эффективными.

Получение биодизеля методом химического синтеза

На сегодняшний день основным направлением получения биодизеля является переэтерификация [26]. Как правило, процесс протекает в три стадии по следующей схеме:



© 2013 г. Готовцев П.М., Ломоносова М.А., Бутылин В.В., Мостова Е.Б., Перковская Н.И.

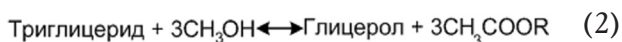
* Автор для переписки:

Готовцев Павел Михайлович

к.т.н., НИЦ «Курчатовский институт»

123182 Москва, пл. Академика Курчатова, 1

Обобщенная реакция выглядит таким образом:



Для интенсификации данного процесса используются различные катализаторы. Также ведутся исследования по проведению процесса гомогенного катализа. Зачастую вместо метанола используют другие спирты, например, этанол или бутанол. Однако проводить данный процесс с использованием метанола дешевле [31]. В то же время серьезное внимание сегодня уделяется получению биоспиртов [1] различными методами. В связи с этим исследователи уделяют определенное внимание катализаторам при переэтерификации с участием этанола, так как ожидается, что в перспективе будет налажено производство биоэтанола.

Выбор катализатора зависит от вида биомассы, из которой получено масло и температуры проведения процесса. В основном применяются при щелочном катализе NaOH и KOH, при кислотном — H_2SO_4 .

Используемые в качестве катализаторов кислоты и щелочи расходуются при проведении процесса, что повышает себестоимость биодизеля. В связи с этим в настоящее время ведутся работы по поиску новых катализаторов, которые можно было бы использовать многократно. Еще одним фактором, стимулирующим поиск новых катализаторов, является стремление уйти от использования тех видов биомассы, которые являются конкурентными по отношению к пищевым культурам. Достаточно оригинальным и недорогим решением служит использование в качестве катализатора FeSO_4 . Будучи труднорастворимым электролитом данный сульфат оседает в процессе переэтерификации и затем может быть легко выделен и запущен в процесс повторно [41]. Другим вариантом представляется использование каталитически активных систем оксидов металлов [12]. С этой целью авторами работы [12] был разработан проточный реактор, в котором испытывались следующие каталитические системы:

- $\text{TiO}_2/\text{ZrO}_2$
- $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZrO}_2$
- $\text{K}_2\text{O}/\text{ZrO}_2$

При использовании первых двух систем удалось добиться более чем 95% конверсии. Недостатком процесса являются требования к работе при повышенных температурах от 448 до 473 К и соответственно при повышенных давлениях.

Также следует отметить, что проведение процесса в два этапа с кислотным и щелочным катализом может оказаться более эффективным методом, чем традиционные одностадийные процессы [40].

В настоящее время существуют решения по использованию метанола в сверхкритическом состоянии, что позволяет отказаться от катализаторов [19]. Параметры процесса при этом превышали 575 К и 9 МПа. При таких параметрах удалось добиться времени протекания процесса, равного 25 минутам. Создание высоких термодинамических параметров процесса требует определенных затрат энергии, также работа при таких параметрах повышает потенциальную опасность производства. В то же время высокая скорость протекания процесса должна позволить повысить выработку биодизеля и уменьшить габаритные размеры самого реактора.

В результате гомогенного катализа процесса переэтерификации образуется смесь продуктов, которая требует нейтрализации и разделения. Однако полученный таким образом биодизель представляется менее коррозионно-активным и быстрее подвергается биоразложению [9]. В гомогенном катализе обычно применяется MgO [9] и CaO [13].

Надо подчеркнуть, что помимо оптимизации самого процесса переэтерификации существенную роль играет и его технологическое воплощение. Согласно стехиометрии процесса, для большинства видов масел молярное соотношение спирта и масла составляет 3:1, однако в реальных процессах это соотношение может меняться от 6:1 до 18:1 [37]. Отчасти это соотношение можно снизить за счет организации эффективного перемешивания сред, что ведет к поиску различных конструкций реакторов. Сейчас нет устоявшегося технологического решения в данной области, помимо принудительного перемешивания различные разработчики предлагают проточные реакторы [12]. Необходимо указать на то, что конструкция реактора также во многом обуславливается и выбранным катализатором.

Для оптимизации работы реакторов существенную роль играет и понимание кинетики процесса переэтерификации. В работе [14] представлены результаты моделирования этого процесса и расчета его кинетики при различных условиях. При проведении исследований использовались растительное масло и метанол. В качестве катализатора применяли NaOH. Исследование проводилось на двух типах реакторов — проточном (без металлооксидного катализатора) и традиционном, который представляет собой емкость с мешалкой. По результатам опытов авторам удалось смоделировать процесс в обоих случаях и сделать вывод о том, что при соотношении метанола к маслу 5:1 с NaOH в роли катализатора в проточном реакторе удалось добиться приемлемого выхода биодизеля.

Температура в процессе переэтерификации должна находиться в диапазоне от 318 до 337,7 К при давлении, равном одной атмосфере. Верхняя граница обусловлена температурой кипения метанола, дальнейший рост приведет к образованию крайне взрывоопасных паров этого вещества.

В связи с этим все высокотемпературные процессы проводятся при повышенных давлениях. Увеличение термодинамических параметров процесса приводит к тому, что растут затраты энергии на его проведение и этот рост вносит негативное влияние в себестоимость конечного продукта.

Таким образом, можно сделать вывод, что в настоящее время исследования ведутся по трем основным направлениям:

1. Использование сверхкритического метанола.
2. Использование твердых катализаторов для традиционных реакторов с принудительным перемешиванием.
3. Использование твердых катализаторов в проточных схемах.

Ожидается, что в вариантах 1 и 3 затраты на поддержание повышенных термодинамических параметров будут скомпенсированы сокращением капитальных издержек за счет уменьшения объема реактора и отсутствия кислотного и щелочного хозяйств. Также ожидается сокращение переменных издержек за счет отказа от расходуемых реагентов — кислот и/или щелочей.

Получение биодизеля методом ферментного катализа

Интерес к ферментному катализу обусловлен тем, что при использовании ферментов можно добиться большей глубины протекания процесса переэтерификации при относительно невысоких температурах [28]. Все процессы с ферментным катализом можно разделить на две категории [32]: 1) с использованием ферментов, иммобилизованных на каких-либо носителях химическим либо физическим методами; 2) с использованием клеточно-связанных ферментов.

В настоящее время выпускаются два фермента Novozyme 435 и Lipozyme TL IM, которые используются при осуществлении процесса переэтерификации. В обоих случаях в качестве фермента выступает липаза, полученная из различных микроорганизмов. Novozyme 435 производится иммобилизованным на акриловой смоле, источником получения фермента является *Candida antarctica* [36]. Lipozyme TL IM иммобилизуется на

кремниевой основе, источником получения является *Thermomyces lanuginosus* [44].

Было проведено несколько работ с применением данных ферментов для процесса переэтерификации [3, 20, 25]. Степень переработки масел в указанных источниках составляет от 67 до 90%. При этом реакции проводились как с метанолом, так и с этанолом и бутанолом. Однако при использовании в качестве фермента липазы отмечается ингибирование фермента метанолом [36]. В связи с этим ряд исследований был направлен на поиск эффективного растворителя, который бы минимизировал данный процесс. В качестве подобного вещества рассматривались как неорганические соединения (например, вода), так и органические (например, 1,4 диоксан [20]). Но наиболее эффективным оказался терт-бутанол [24, 34]. В работе [24] был достигнут уровень 95% переработки при использовании как Novozyme 435, так и Lipozyme TL IM. Соотношение метанола и масла было 3:1. Высоких показателей удалось добиться авторам работы [34] с использованием исключительно фермента Novozyme 435 — при температуре 55 °С в течение 24 часов можно было достичь переработки 97% масла.

На сегодняшний день существенное внимание уделяется использованию масел, полученных из тех видов биомассы, которая не конкурирует с пищевыми продуктами. В связи с особенностями химического состава многие специалисты полагают, что биокатализ будет наиболее эффективен [7]. Среди таких масел принято указывать отработанное масло после приготовления пищи, масла, возникающие как сопродукты при различном производстве (табачном, бумажном, пищевом и т.д.) [10, 15]. Однако прежде чем использовать эти масла, необходимо их извлечь из той среды, в которой они находятся в результате того или иного технологического процесса. Содержание масел в таких средах может составлять от 0,4 до 55% [23]. Следовательно, использование этих сред требует дополнительной предобработки и соответственно дополнительных затрат. Тем не менее количество таких масел может быть достаточным для обеспечения текущего производства биодизеля, без вытеснения пищевых сортов растений с пахотных земель. Так, например, количество отработанного при производстве пищи масла оценивается в 16,6 миллионов тон в год [8]. Такой объем масла мог бы покрыть часть потребности в биодизеле, тем самым снизив занимаемые пахотные площади. В настоящее время уже ведутся активные работы [5, 30, 38] в области разработки технологических решений по созданию реакторов для проведения процесса переэтерификации на непивцевых маслах. Как правило, при создании реакторов

возникает ряд проблем, связанных с неоднородностью химического состава таких масел в зависимости от различных периодов поставки даже из одного источника. Авторы работы [30] предложили смешивать масло с материалом, обладающим сорбционными свойствами, повышая тем самым гетерогенную поверхность реакции и, следовательно, повышая ее интенсивность в условиях биореактора.

При переходе от лабораторного реактора к промышленному существенным фактором оказывается стоимость катализатора и количество циклов его использования [10, 38]. Высокая стоимость ферментов по сравнению с традиционными катализаторами [38] требует того, чтобы сам технологический процесс был более экономичен. Определенная экономия достигается за счет того, что ферментный катализ эффективен при низких температурах (до 37 °С). Снижение температуры процесса позволяет не только значительно снизить затраты энергии на подогрев смеси для повышения эффективности реакции [33]. Другим преимуществом от снижения температуры служит повышение безопасности процесса. Работа с температурами, близкими к температуре испарения метанола, может привести к образованию его паров в случае каких-либо чрезвычайных ситуаций или технологических ошибок.

Рассмотрим далее вопросы, связанные с конструкцией биореакторов для проведения переэтерификации методом ферментного катализа.

Первым этапом в создании любой химической технологии является анализ кинетики процессов. Процесс ферментной переэтерификации достаточно изучен [11] и состоит из двух процессов:



где:

A_s — используемый в процессе спирт;

V_p — продукт процесса (ди-, моноглицерид или глицерин);

E — свободный фермент;

E_s — исходное вещество процесса (три-, ди- или моноглицерид);

E_{s_p} — эфиры жирных кислот;

F — жирные кислоты.

Как и многие процессы с участием ферментов, данный процесс можно описать с использованием кинетики Михаэлиса — Ментен. Результат такого описания представлен в следующем уравнении [11]:

$$v_j = \frac{V_{\max}(1 - e^{-k_d})[jG][A]}{K_{m,j}[A](1 + [A]/K_{i,A}) + K_{m,A}[jG] + [jG][A]} \times \left(1 - \frac{[B_p][E_{s_p}]/[jG][A]}{K_{eq,j}}\right) \quad (5)$$

где:

v_j — начальная скорость процесса;

$K_{m,j}, K_{m,A}$ — кинетические константы, j — для моно-, ди- и триглицеридов, A — для вещества, являющегося акцептором ациловых групп;

$[jG]$ — концентрация моно-, ди- и триглицеридов (в соответствии с номером j);

k_d — константа деактивации процесса в соответствии с уравнением Аррениуса;

$K_{eq,j}$ — константа равновесия для процесса с участием j -го вещества.

Однако помимо анализа кинетики при создании технологического процесса необходимо учитывать такие факторы, как эффективность смешения рабочих сред и фермента и темпы подвода исходных веществ и отвода продуктов реакции. Понимание этих факторов требует анализа процессов массопереноса в системе, который, в свою очередь, потребует учета размера ферментов.

В настоящее время основной акцент делается на две технологии — реакторы с принудительным перемешиванием и реакторы со слоем фермента [11].

Первый тип реактора представляет собой емкость с расположенной в ней мешалкой, которая осуществляет перемешивание. Изначально емкость заполняется участвующими в процессе веществами и далее до завершения процесса проводится перемешивание. После того как процесс завершен, продукты реакции выгружают и направляют на разделение. Имеется ряд конструктивных решений, дающих возможность частично выводить глицерин в процессе работы. Недостатком таких реакторов является высокое соотношение объем реактора/объем продукта. Преимуществом — возможность свободно регулировать время пребывания веществ в реакторе и при правильном перемешивании добиться высокой глубины протекания процесса.

Второй тип реактора требует, чтобы фермент был иммобилизован на какой-либо поверхности, либо каким-нибудь веществом в относительно крупные гранулы [42]. Данные гранулы загружаются в колонку, в которую подаются реагенты [16]. После колонки устанавливается емкость, в которой производится отделение глицерина. Так как скорость прокачивания рабочей среды через колонку не позволяет на одной ступени добиться высокой глубины протекания процесса, в экспериментальных

установках используют несколько ступеней [16] и/или рециркуляцию рабочей среды. Главный недостаток таких систем в том, что перекачивание рабочих сред требует энергозатрат.

Сейчас затруднительно ответить на вопрос, какая из технологий покажет себя наиболее коммерчески эффективной. В каждом случае есть свои преимущества и недостатки. Можно предположить, что наиболее эффективные решения по ферментному катализу и та технология, которая будет оптимальна именно для них, и займут основную нишу в производстве биодизеля.

Получение биодизеля методом ферментативного катализа с помощью липазы, экспонированной на поверхности клеток микроорганизмов

В научной и прикладной литературе в последнее время все большее внимание привлекает к себе перспектива иммобилизации белков на поверхности клеток микроорганизмов. Необходимо отметить, что в природе широко распространен этот способ экспозиции биологически активных молекул. В норме на поверхности клеток дрожжей располагается множество белков, ответственных за флокуляцию (слипание), разнообразные литические ферменты, белки и гликопротеины, участвующие в построении и поддержании клеточной стенки [22, 35].

Микробиологическая иммобилизация на поверхности клеточной стенки обладает рядом преимуществ по сравнению со стандартной иммобилизацией на сорбентах. Белок, продуцируемый клеткой, закрепляется на ее поверхности сразу после или в процессе его секреции в среду культивирования. Таким образом, клетка сама выступает в роли носителя-сорбента. Более того, трудоемкие этапы очистки белка и иммобилизации его на сорбенте сводятся к простому отделению клеток осаждением или фильтрацией, что значительно упрощает производственные процессы.

В общем случае для экспозиции белков на поверхности клеток в аминокислотную последовательность экспрессируемого белка добавляют фрагмент или весь белок клеточной стенки таким образом, чтобы полученный рекомбинантный комплекс направлялся по пути секреции белка клеточной стенки и закреплялся на поверхности по механизму, свойственному данному белку клеточной стенки [39].

Разработка систем для экспонирования белков на поверхности клеточной стенки изначально велась на базе дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [39]. Изолиро-

ванные и охарактеризованные белки клеточной стенки и фрагменты их аминокислотных последовательностей в дальнейшем применялись сами для иммобилизации или поиска гомологов в других дрожжах [18, 39].

Синтез биодизеля с использованием экспонированной на поверхности клеточной стенки липазы в настоящее время вызывает повышенный интерес различных научных групп [4, 43]. Использование подобных клеток теоретически позволяет:

- существенно упростить сепарацию катализатора из продуктов реакции переэтерификации для повторного использования;
- повысить устойчивость липазы и тем самым повысить количество циклов ее использования.

В работе [4] было показано, что использование клеток с экспонированной на поверхности липазой дает возможность сохранить эффективность катализа после десяти циклов. Тем не менее, как в случае с обычным ферментом, экспонированная на поверхности клетки липаза также ингибируется метанолом. Пути решения этой проблемы аналогичны тем, которые применяются при использовании свободных ферментов. Основным из таких путей является использование растворителя. Как установлено в исследовании [21], применение такого подхода позволяет повысить как глубину протекания процесса переэтерификации, так и число циклов использования биокатализатора.

Общее обсуждение

Как видно из представленных материалов, основная цель проводимых исследований — перейти к катализаторам, которые можно использовать многократно. Такой переход позволит снизить не только переменные издержки на закупку реагентов, но и капитальные на строительство кислотного и щелочного хозяйств. Оба указанных фактора могут сыграть серьезную роль в снижении стоимости биодизеля и повышении его конкурентоспособности. Помимо этого, каждое из рассмотренных решений имеет свои преимущества и недостатки, которые могут оказывать влияние на реализацию данного решения в виде промышленной технологии. В таблице 1 представлены наиболее существенные плюсы и минусы каждого из рассмотренных направлений получения биодизеля.

В целом на сегодня серьезный интерес представляет именно ферментный катализ, так как он позволяет добиться высокого выхода биодизеля без существенного роста термодинамических параметров.

Основные преимущества и недостатки рассмотренных технологий получения биодизеля

Технология	Преимущества	Недостатки
Использование FeSO_4 в качестве катализатора	Возобновляемый катализатор, не требует повышения термодинамических параметров процесса	По эффективности процесса не имеет преимуществ перед традиционными методами с использованием кислоты и щелочи. Затруднительно выделить из осадка для повторного использования
Использование металлоксидных катализаторов	Могут работать в компактных проточных реакторах	Эффективны при повышенных параметрах реакционной смеси, что требует дополнительных затрат энергии и повышает взрывоопасность процесса
Использование ферментных катализаторов, иммобилизованных на акриловой смоле либо кремниевой основе	Могут работать в компактных проточных реакторах. При использовании в традиционных реакторах легко осаждаются и отводятся из реакционной смеси	Пока что системы с такими катализаторами менее эффективны, чем традиционные
Использование ферментных катализаторов, иммобилизованных на клеточной стенке	При использовании в традиционных реакторах легко осаждаются и отводятся из реакционной смеси. Более эффективны, чем отдельные ферменты. Могут быть иммобилизованы и загружены в проточный реактор	Зачастую фермент ингибируется при больших соотношениях метанола к маслу, что требует добавления соразтворителя в реакционную смесь

Также еще не определен оптимальный источник фермента липазы и способ его иммобилизации; теоретически возможно, что существуют виды фермента отличающиеся большей активностью по сравнению с уже испытанными в рассмотренных работах.

Заключение

В настоящее время биодизель как топливо начинает играть определенную роль в топливном балансе многих стран. Рост его производства, в первую очередь, связан с переходом на такой вид сырья, который не конкурировал бы за сельскохозяйственные площади с пищевыми продуктами.

Как видно из представленного обзора, технологии получения биодизеля непрерывно совершенствуются, и сейчас существует значительное количество разработок, теоретически позволяющих повысить эффективность его получения. Какая из предложенных технологий в ближайшие годы может стать наиболее применимой — пока сказать трудно. Однако необходимо отметить очень широкий охват в выборе катализаторов и способов их применения.

Все это говорит о том, что ныне мы находимся только на начальной стадии совершенствования рассматриваемого процесса и следует ожидать заметного роста его эффективности в ближайшее время.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации. Государственный контракт № 14.512.11.0056 от 3 апреля 2013 г.

Литература

1. Бешкарева М.А., Третьяков В.Ф. Получение авиационного топлива из биоспиртов для современных двигателей // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А.Овчинникова. — 2012. — Т. 8. — № 4. — С. 61–62.
2. Василев Р.Г. Перспективы развития производства биотоплива в России. Сообщение 1: биодизель // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2007. — Т. 3. — № 1. — С. 47–54.
3. Abigor R., Uadia P., Foglia T., Haas M., Jones K., Okpefa E., Obibuzor J., Bafor M. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils // Biochem. Soc. Trans. — 2000. — Vol. 28. — P. 979–981.
4. Adachi D., Hama S., Numata T., Nakashima K., Ogino C., Fukuda H., Kondo A. Development of an *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalyst coexpressing triglyceride and partial glyceride lipases for biodiesel production // Bioresour. Technol. — 2011. — Vol. 102. — P. 6723–6729.
5. Al-Zuhair S., Sulaiman A.-Z., Asma A., Iman H., Maryam A., Noura A., Suaad M. Enzymatic production of biodiesel from used waste vegetable oils: Design of a pilot plant // Renewable Energy. — 2011. — Vol. 36. — P. 2605–2614.

6. *Atadashi I.M., Aroua M.K., Abdul Aziz A.* High quality biodiesel and its diesel engine application: A review // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2010. – Vol. 14. – P. 1999–2008.
7. *Azocar L., Ciudad G., Heipieper H.J., Navia R.* Biotechnological processes for biodiesel production using alternative oils // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 88. – P. 621–636.
8. *Azycar L., Ciudad G., Heipieper H.J., Navia R.* Biotechnological processes for biodiesel production using alternative oils // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 88. – P. 621–636.
9. *Dossin T.F., Reyniers M.F., Berger R.J., Marin G.B.* Simulation of heterogeneously MgO-catalyzed transesterification for fine-chemical and biodiesel industrial production // *Appl. Catal. B: Environ.* – 2006. – Vol. 67. – P. 136–248.
10. *Du W., Li W., Sun T., Chen X., Liu D.* Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2008. – Vol. 79. – P. 331–337.
11. *Fjerbaek L., Christensen K.V., Norddahl B.* A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification // *Biotechnol. Bioeng.* – 2009. – Vol. 102. – P. 1298–1315.
12. *Furuta S., Matsushashi H., Arata K.* Biodiesel fuel production with solid amorphous-zirconia catalysis in fixed bed reactor // *Biomass Bioenergy*. – 2006. – Vol. 30. – P. 870–873.
13. *Granados M.L., Poves M.D.Z., Alonso D.M., Mariscal R., Galisteo F.C., Tost R.M., et al.* Biodiesel from sunflower oil by using activated calcium oxide // *Appl. Catal. B: Environ.* – 2007. – Vol. 73. – P. 317–326.
14. *Gunvachai K., Hassan M.G., Shama G. & Hellgardt K.* A new solubility model to describe biodiesel formation kinetics // *Trans IChemE, Part B, Process Safety and Environmental Protection*. – 2007. – Vol. 85(B5). – P. 383–389.
15. *Hama S., Kondo A.* Enzymatic biodiesel production: An overview of potential feedstocks and process development // *Bioresour. Technol.* – 2013. – Vol. 135. – P. 386–395.
16. *Hama S., Tamalampudi S., Yoshida A., Tamadani N., Kuratani N., Noda H., Fukuda H., Kondo A.* Process engineering and optimization of glycerol separation in a packed-bed reactor for enzymatic biodiesel production // *Bioresour. Technol.* – 2011. – Vol. 102. – P. 10419–10424.
17. *Hasheminejad M., Tabatabaei M., Mansourpanah Y., Khatami far M., Javani A.* Upstream and downstream strategies to economize biodiesel production // *Bioresour. Technol.* – 2011. – Vol. 102. – P. 461–468.
18. *Hoyer L.L., Green C.B., Oh S.H., Zhao X.* Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family—a sticky pursuit // *Med. Mycol.* – 2008. – Vol. 46. – P. 1–15.
19. *Ilham Z., Saka S.* Two-step supercritical dimethyl carbonate method for biodiesel production from *Jatropha curcas* oil // *Bioresour. Technol.* – 2010. – Vol. 101. – P. 2735–2740.
20. *Iso M., Chem B., Eguchi M., Kudo T., Shrestha S.* Production of Biodiesel from triglycerides and ethanol using immobilized enzyme // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* – 2001. – Vol. 16. – P. 53–58.
21. *Jin Z., Han S.Y., Zhang L., Zheng S.P., Wang Y., Lin Y.* Combined utilization of lipase-displaying *Pichia pastoris* whole-cell biocatalysts to improve biodiesel production in co-solvent media // *Bioresour. Technol.* – 2013. – Vol. 130. – P. 102–109.
22. *Kapteyn J.C., Van Den Ende H., Klis F.M.* The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1999. – Vol. 1426. – P. 373–383.
23. *Lam M.K., Lee K.T., Mohamed A.R.* Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: a review // *Biotechnol. Adv.* – 2010. – Vol. 28. – P. 500–518.
24. *Li L., Du W., Liu D., Wang L., Li Z.* Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* – 2006. – Vol. 43. – P. 58–62.
25. *Linko Y.-Y., Liimsii M., Wu X., Uosukainen W., Sappiilii J., Linko P.* Biodegradable products by lipase biocatalysis // *J. Biotechnol.* – 1998. – Vol. 66. – P. 41–50.
26. *Ma F., Hanna M.A.* Biodiesel production: a review // *Bioresour. Technol.* – 1999. – Vol. 70. – P. 1–15.
27. National Biodiesel Board. Biodiesel, 800-841-5849. 2007. Available at www.biodiesel.org/pdf_files/fuelfactsheets/backgroundunder.pdf (accessed Apr. 2010).
28. *Nelson L.A., Foglia T.A., Marmer W.N.* Lipase-catalyzed production of biodiesel // *J. Am. Oil Chem. Soc.* – 1996. – Vol. 73(8). – P. 1191–1195.
29. *Nogueira L.A.H.* Does biodiesel make sense? // *Energy*. – 2011. – Vol. 36. – P. 3659–3666.
30. *Park E.Y., Sato M., Kojima S.* Lipase-catalyzed biodiesel production from waste activated bleaching earth as raw material in a pilot plant // *Bioresour. Technol.* – 2008. – Vol. 99. – P. 3130–3135.
31. *Ramadhas A.S., Jayaraj S., Muraleedharan C.* Biodiesel production from high FFA rubber seed oil // *Fuel*. – 2005. – Vol. 84. – P. 335–400.
32. *Ranganatan S.V., Narasimhan S.L., Muthukumar K.* An overview of enzymatic production of biodiesel // *Bioresour. Technol.* – 2008. – Vol. 99. – P. 3975–3981.
33. *Robles-Medina A., Gonzalez-Moreno P.A., Esteban-Cerdan L., Molina-Grima E.* Biocatalysis: towards ever greener biodiesel production // *Biotechnol. Adv.* – 2009. – Vol. 27. – P. 398–408.
34. *Royon D., Daz M., Ellenrieder G., Locatelli S.* Enzymatic production of Biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent // *Bioresour. Technol.* – 2007. – Vol. 98. – P. 648–653.

35. Ruiz-Herrera J., Martinez A.I., Sentandreu R. Determination of the stability of protein pools from the cell wall of fungi // Res. Microbiol. – 2002. – Vol. 153. – P. 373–378.
36. Sanchez V.M., Rebollo F., Gotor V. Candida antarctica lipase-catalyzed doubly enantioselective aminolysis reactions. Chemoenzymatic synthesis of 3-hydroxypyrrolidines and 4-(silyloxy)-2-oxopyrrolidines with two stereogenic centers // J. Org. Chem. – 1999. – Vol. 64. – P. 1464–1470.
37. Sharma Y.C., Singh B., Upadhyay S.N. Advancements in development and characterization of biodiesel: A review // Fuel. – 2008. – Vol. 87. – P. 2355–2373.
38. Sotoft L.F., Rong B.G., Christensen K.V., Norddahl B. Process simulation and economical evaluation of enzymatic biodiesel production plant // Bioresour. Technol. – 2010. – Vol. 101. – P. 5266–5274.
39. Ueda M., Tanaka A. Genetic immobilization of proteins on the yeast cell surface // Biotechnol. Adv. – 2000. – Vol. 18. – P. 121–140.
40. Usta N. Use of tobacco oil methyl ester in turbocharged indirect injection diesel engine // Biomass Bioenergy. – 2005. – Vol. 28. – P. 77–86.
41. Wang Y., Ou S., Liu P., Zhang Z. Preparation of biodiesel from waste cooking oil via two-step catalyzed process // Energy Conservat. Manage. – 2007. – Vol. 48. – P. 184–188.
42. Watanabe Y., Shimada Y., Sugihara A., Noda H., Fukuda H., Tominaga Y. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized Candida antarctica lipase // J. Am. Oil Chem. Soc. – 2000. – Vol. 77. – P. 355–360.
43. Yan Y., Xu L., Dai M. A synergetic whole-cell biocatalyst for biodiesel production // RSC Advances. – 2012. – Vol. 2. – P. 6170–6173.
44. Zhang H. Evaluation of practical process aspects for lipozyme TL IM catalyzed bulk fat modification in a batch reactor // The Open Biotechnology Journal. – 2007. – Vol. 1. – P. 72–80.

MODERN TECHNOLOGIES FOR BIODIESEL

P.M. GOTOVTSEV¹, M.A. LOMONOSOVA¹, V.V. BUTYLIN¹,
E.B. MOSTOVA², N.I. PERKOVSKAYA²

¹ National Research Centre «Kurchatov Institute»

² Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow

In a review article describes the results of current research in the field of biodiesel by transesterification. In the viewing area were as chemical synthesis technologies and solutions using biocatalysts. The analysis presented in the review of decisions and conclusions about the prospects of research in this area.

Keywords: biodiesel technology.

ЗОЛОШЛАКОВЫЕ ОТВАЛЫ ОБЪЕКТОВ ТЕПЛО- И ЭЛЕКТРОГЕНЕРАЦИИ КАК ИСТОЧНИКИ ЦЕННЫХ МЕТАЛЛОВ И РЕДКОЗЕМЕЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ

А.Г. БУЛАЕВ, Т.Ф. КОНДРАТЬЕВА*

ФГБУН «Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН», Москва

В настоящее время разработано порядка 300 технологий переработки золошлаков, однако не более 10% реализованы практически. Это в основном технологии использования золошлаков из сухих систем золошлакоудаления в качестве наполнителя для производства различных строительных материалов, цемента. В Институте микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН более 50 лет ведутся исследования по разработке фундаментальных основ биогеотехнологий получения цветных и благородных металлов из полиметаллических сульфидных руд. Наиболее распространенными биогеотехнологиями металлов являются кучная/подземная и чановая (агитационная). Авторами обосновывается эффективность разработки кучной и чановой био-технологий выщелачивания ценных металлов и редкоземельных элементов из зольно-шлаковых отвалов на основе применения сообществ ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов, окисляющих элементную серу с образованием серной кислоты и не требующих внесения органических источников углерода для конструктивного метаболизма.

Ключевые слова: биогеотехнология, золошлаковые отвалы, ценные металлы, редкоземельные элементы.

Введение

В настоящее время развитие многих отраслей промышленности (электроника, атомная энергетика, машиностроение, производство специальных сплавов) в большой степени зависит от редких металлов, которые необходимы в производстве в относительно небольших количествах. Однако именно без них невозможно производство материалов, обладающих уникальными свойствами (твёрдостью, устойчивостью к коррозии, жаропрочностью и проводимостью). Большинство редких металлов не имеет собственных рудных месторождений, хотя и представлено в земной коре обширным кругом своих минералов. Поэтому их производство неразрывно связано с добычей и переработкой руд других металлов: свинца, цинка, меди, никеля, алюминия, олова, то есть эти редкие металлы можно называть металлами-спутниками. Как правило, содержание редких металлов в рудах крайне мало, и их добыча требует применения сложных методов обогащения.

К редким металлам относятся порядка 40 элементов периодической системы Д.И. Менделеева. Термин

редкие металлы (редкие элементы) (далее — РМ) сложился не в результате систематической классификации элементов по их физико-химическим свойствам, а исторически. Ныне под этим термином понимают те металлы и металлоиды, которые добываются в относительно малом количестве. По своим свойствам эти металлы разделяются на 5 групп:

- легкие редкие металлы;
- тугоплавкие редкие металлы;
- рассеянные редкие металлы;
- редкоземельные редкие металлы;
- радиоактивные редкие металлы.

В таблице 1 приводятся химические элементы, относящиеся к разным группам редких металлов. Несмотря на название, редкие элементы не всегда находятся в земной коре в небольших количествах. Хотя для большинства РМ характерно низкое содержание, многие являются более распространенными, чем цветные и благородные металлы. Содержание таких РМ, как цирконий, литий, рубидий, цезий, церий, титан, выше, чем, например, золота, свинца, серебра и ртути [18, 41].

Большинство минералов РМ обычно входит в виде изоморфной примеси в более распространенные минералы других металлов, и содержание РМ в сырье зачастую достигает лишь сотых и даже тысячных долей процента. Поэтому РМ получают при переработке полиметаллических руд, а их обогащение и извлечение требует высоких затрат [20].

© 2013 г. Булаев А.Г., Кондратьева Т.Ф.

* Автор для переписки:

Кондратьева Тамара Федоровна,

доктор биол. наук, зав. лабораторией ИНМИ РАН

117312 Москва, Проспект 60-летия Октября, 7, корп. 2

Тел.: +7 (499) 135-04-21

E-mail: kondr@inmi.ru

Классификация редких металлов [18, 41]

Группа редких металлов	Группа периодической системы	Элементы
легкие редкие металлы	I	Li, Rb, Cs
	II	Be
тугоплавкие редкие металлы	IV	Ti, Zr, Hf
	V	V, Nb, Ta
	VI	Mo, W
	VII	Re
рассеянные редкие металлы	III	Ga, In, Tl
	IV	Ge
	VI	Se, Te
	VII	Re
редкоземельные редкие металлы	III	Sc, Y, La и 14 лантаноидов: Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu
радиоактивные редкие металлы	II	Ra
	III	Ac и актиниды: Th, Pa, U и зауроновые элементы
	V	Po

В таблице 2 приводится порог промышленной ценности некоторых РМ в рудах. Для лантаноидов порог промышленной ценности содержания в рудах может достигать от 10 до 1000 г/т. Важным источником добычи РМ также являются рабочие растворы, образующиеся при переработке полиметаллических руд. Например, еще в 1980-е годы был разработан метод извлечения германия из растворов с его концентрацией 0,001–0,01 г/л [18].

Многие РМ только в XX веке стали иметь промышленное значение в связи с развитием электроники и машиностроения, и объемы их промышленного потребления продолжают расти. Наибольший интерес представляет собой группа редких и редкоземельных металлов (РЗМ) (табл. 3). Первое место по добыче, запасам и экспорту РЗМ в мире принадлежит КНР, и примерно 80% от мирового объема добычи РЗМ с 2000 года приходится на эту страну [20, 71]. В связи с сокращением экспортных квот на РЗМ из Китая с 2010 года на мировом рынке, в том числе в России, наблюдается дефицит РЗМ, что приводит к росту цен на них. Поэтому поиск новых источников сырья и разработка новых технологий их извлечения являются одним из приоритетных направлений.

Минеральными компонентами углей являются неорганические вещества в виде силикатов, сульфидов, сульфатов, карбонатов, оксидов железа, кремния, алюминия, магния. При термической обработке углей (сжигание, газификация, химическая переработка на жидкие продукты) образуются твердые (золы, шлаки) и газообразные выбросы. Эти выбросы — коллекторы химических элементов — многофазны, полиминеральны и представляют собой в определенном смысле техногенный концентрат, в частности концентрат редких металлов. Ежегодно в мире образуется около 700 млн. т золошлаковых отходов. В составе зол условно можно выделить три группы веществ — стекловидные, кристаллические и органические. Стекловидная группа по химическому составу сложна и весьма многообразна. Золой каменных и бурых углей, содержащие до 20% CaO, включают в себя преимущественно ферро-алюмо-силикатное стекло, в котором основные стеклообразующие компоненты Fe_2O_3 , Al_2O_3 и SiO_2 составляют 80–90%. Кристаллическая часть зол представлена как первичными минералами, присутствующими в углях, так и новообразованными в топочном процессе. Наиболее широко представлены магнетит, гематит, муллит, кварц; менее — галенит, фаялит. Из минералов, являющихся новообразованиями, следует отметить силикаты, алюминаты и ферриты кальция различной основности [39].

В процессе сжигания твердого топлива (каменных и бурых углей, антрацита, горючих сланцев и торфа) в зависимости от способа улавливания и удаления образуются следующие попутные продукты: зола-унос — тонкодисперсный материал (размер частиц от 3–5 до 100–150 мкм), образующийся из минеральной части пылевидного топлива, улавливаемый специальными аппаратами из дымовых газов теплоэлектростанций (ТЭС); шлак — агрегированные и сплавленные частицы золы размером от 0,15 до 40 мм; золошлаковая смесь — смесь золы-уноса и шлака, образовавшаяся при совместном их удалении в отвал. При сжигании топлива в топках с твердым шлакоудалением образуется 10–20% шлака, в топках с жидким шлакоудалением — 20–40%, в топках с кипящим слоем — шлак не образуется, но частицы золы имеют размер до 10 мм. Золошлаковые материалы (ЗШМ) ввиду большого разнообразия твердого топлива, различных условий его сжигания, а также разных способов их улавливания и удаления, различаются химическим и минералогическим составом, физическими свойствами, температурой плавления, радиоактивностью и другими характеристиками.

Таблица 2

Порог промышленной ценности содержания некоторых редких металлов в рудах

Содержание металла, г/т																	Источник цитирования												
Li	Be	Sc	V	Zn	Ga	Sr	Y	Zr	Nb	Te	Ba	La	Ce	Pr	Nd	Sm		Dy	Yb	Ta	W	Re	Tl	Pb	Th	U	Ge	In	
	20	50	500		100		75	600	50			750						7,5											[19]
			10000	10000	400	5000			30000	1000						10000				5000				20000			1000		[26]
							34					103	145	19	70	14,7	21	4,7						53	359				[86]
1300	80			1400						100									100										[41]
7000–30000	300–20000	50–10000	1000		10–1000					30–2000	2000									30–2000	1400–5000	30–200	1000–5000			40–4000	10–100*	1–1000	[18]

Химический состав золы-уноса от сжигания каменных и бурых углей изменяется в следующих пределах (мас. %): SiO₂ (21–64), Al₂O₃ (4–39), Fe₂O₃ (2–28), CaO (1–46), MgO (0,2–6,0), SO₃ (0,1–9,0). Содержание остаточного топлива в золе-уносе колеблется от 0,5 до 22%, в шлаке — не превышает 1% [21].

По химическому составу ЗШМ подразделяются на кислые (модуль кислотности M>1) и основные (M≤1); по содержанию горючих — на золошлаки с низким, средним и высоким содержанием горючих, соответственно, потери массы при прокаливании не более 5%, от 5 до 10% и более 10%; по дисперсности — на золы низкодисперсные, среднедисперсные и высокодисперсные, соответственно, удельная поверхность менее 150 м²/кг, от 150 до 300 м²/кг и более 300 м²/кг; по температуре плавкости — на золошлаки легкоплавкие, средней плавкости и тугоплавкие, соответственно, температура плавления менее 1250, от 1250 до 1450 и выше 1450 °С [44].

Ископаемые угли способны накапливать значительные количества элементов примесей (тяжелых, благородных, редких и радиоактивных металлов), иногда достигающие промышленно-значимых концентраций [2, 3, 58, 82, 87, 91, 105]. В работах [2, 3] приводится содержание РМ в углях месторождений Сибири (табл. 4). Сравнив эти данные с данными по порогу промышленной ценности, представленными в таблице 2, можно заключить, что содержание РМ в углях может достигать значений, дающих основания считать угольные месторождения потенциально ценным источником не только топлива, но и ценных металлов. При изучении содержания некоторых тяжелых и редких металлов в углях и ЗШМ от сжигания этих углей установлено, что коэффициент обогащения (то есть отношение содержания элемента в ЗШМ к содержанию в исходном угле) может достигать значений от 1,5 до 6 [3, 82, 91]. Таким образом, можно утверждать, что содержание тяжелых и редких металлов в золах, как правило, в несколько раз выше, чем в угле.

Таблица 3

Область применения и цена на некоторые РМ в 2000-х годах [95]

Элемент	Область применения	Цена, \$ США/кг
Y (иттрий)	Изготовление огнеупорных материалов, повышение проводимости проводов, легирование стали	115–185
Sc (скандий)	Изготовление огнеупорных, сверхтвердых материалов, полупроводников, повышение проводимости проводов, легирование стали	12000–20000
La (лантан)	Электроника, катализаторы, для нефтяной промышленности	2000–4000
Ce (церий)	Легирование стали, стекольная промышленность, производство абразивов	40–125
Pr (празеодим)	Легирование стали, производство стекла, полупроводников, лазеров	170
Nd (неодим)	Легирование стали, производство стекла, магнитов	100
Sm (самарий)	Производство стекла, полупроводников, лазеров	50–60
Yb (иттербий)	Легирование стали, производство полупроводников, лазеров	250–400
Ho (гольмий)	Легирование алюминия, ядерная промышленность	120–190
Zr (цирконий)	Легирование стали, ядерная промышленность, производство химически инертных изделий	До 30
In (индий)	Электроника	700
Ga (галлий)	Электроника (производство полупроводников)	1200
Ge (германий)	Производство полупроводников и оптоволокон	1000–1200
Li (литий)	Производство аккумуляторов, керамики	40–50
V (ванадий)	Производство легированной стали	30–40

Таблица 4

Среднее содержание редких и благородных металлов в углях Сибири (средняя зольность углей 11,5%) [2, 3]

Содержание металла, г/т																									
Li	Be	Sc	V	Ga	Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Ag	Sb	Cs	La	Ce	Sm	Eu	Tb	Yb	Lu	Hf	Ta	Au	Th	U	Ge
5,1	4,8	14,2	15,3	2,3	3,9	21,4	15,5	113	5,3	0,011	5,9	1,0	8,6	17	2,5	0,81	0,62	1,9	0,45	3,1	0,09	0,025	2,4	1,5	2,3

В таблице 5 приведено максимальное содержание некоторых тяжелых, редких, редкоземельных и благородных металлов в ЗШМ разного происхождения.

При анализе баланса первичных энергоносителей наблюдается постоянное снижение доли угля, в то время как абсолютные объемы добычи и использования угля возрастают. Некоторые прогнозы, особенно относящиеся к периоду после 2030 года, описывают значительный рост роли угля в энергоснабжении: в период с 2006 до 2030 гг. потребление каменного угля в мире возрастет с 5 до 12 млрд. т, а выбросы летучей золы и шлака ТЭС будут увеличиваться примерно с 0,5 до 1 млрд. т [59]. Ежегодное производство ЗШМ во всех европейских странах составляет около 100 млн. т [51, 52]. Количество образующихся ежегодно золошлаковых отходов в

РФ в разных источниках оценивается по-разному, от 25 до 50 млн. т [22, 23, 40]. Количество накопленных золошлаковых отходов в России, по данным разных исследователей, – около 1,5 млрд. т, из них в Европейской части и на Урале – более 60% (табл. 6).

Суммарная стоимость сооружения системы гидрозолоудаления и золоотвалов достигает 16–17% от стоимости ТЭС, затраты на эксплуатацию – 7–10% от общих затрат ТЭС, что существенно влияет на себестоимость производства энергии. Золоотвалы для хранения золошлаковых смесей занимают большие площади (до 20000 тыс. га) и требуют значительных, все более увеличивающихся затрат на их содержание, а постоянное пополнение отвалов требует отвода новых земель для их складирования [5, 22, 23, 27, 60].

Таблица 5

Максимальное содержание металлов в различных ЗШМ России и мира

Содержание металла, г/т		Источник цитирования
Элемент	Содержание	
Li	298	[4, 6, 9, 14, 19, 25, 26, 28, 33, 34, 39, 43, 50, 56, 62, 64–66, 68, 69, 79, 82, 83, 89, 93, 94, 97, 100, 101, 103, 104, 106]
Be	20	
Sc	200	
V	280000	
Cr	15000	
Co	112	
Ni	48000	
Cu	3700	
Zn	16000	
Ga	3000	
Rb	202	
Sr	5000	
Y	480	
Zr	3000	
Nb	3000	
Mo	1000	
Ag	0.7	
Cd	28	
Cs	188	
Ba	7800	
La	100	
Ce	300	
Pr	14	
Nd	58	
Sm	12	
Eu	2	
Gd	12	
Tb	2	
Dy	9	
Ho	2	
Er	4	
Tm	0.7	
Yb	14	
Lu	0.7	
Hf	6	
Ta	2	
W	1500	
Pt	30	
Au	0.07	
Tl	2	
Pb	7.5	
Th	36	
U	67	
Ce	2700	

Таблица 6

Доля регионов РФ в образовании золошлаковых материалов в России [12, 23, 40]

Регион	% от накопленного в РФ количества ЗШМ
Европейская часть РФ	28
Урал	35
Сибирь	24
Дальний Восток	7
Московская область	6

Оценка степени опасности золошлаковых отходов ТЭС для окружающей среды и здоровья человека

Подавляющее большинство золошлаков относится к 5-му классу, то есть к практически неопасным отходам. За рубежом золошлаковые отходы ТЭС квалифицируются как безопасные, что отражено в основных нормативных документах ЕС [13]. Однако накопление в отвалах ЗШО создает постоянную угрозу загрязнения атмосферы и почвы в результате пыления, а также водоемов, в случае размыва ливневыми, тальми и паводковыми водами. В пределах ареала распространения зольной пыли происходит загрязнение почв целым рядом элементов. Зольное вещество активно гидратируется и частично растворяется в воде, в первую очередь, это касается S, Ca, Mg, Na и Sr. Растворимость зольных остатков существенно зависит от условий среды (кислой, щелочной или нейтральной). В целом, ЗШО являются источником негативного комплексного влияния на все компоненты природной окружающей среды. Это связано преимущественно с миграцией тяжелых металлов в природную окружающую среду как при механическом разносе техногенно-минеральных образований, так и в виде атмосферных и гидрогенных потоков рассеяния, которые формируют техногенные ореолы и аномалии тяжелых металлов, а в ряде случаев

и специфические ЗШО в виде техногенных грунтов с высокими концентрациями цветных и благородных металлов [30, 73, 88]. Показано, что это влияние имеет различный характер и сферу влияния. В результате взаимодействия с водой из золошлаковых отходов активно выщелачиваются фтор, цинк, свинец, кобальт, сурьма, марганец, стронций, хром, естественные радионуклиды и сера. В то же время в золоотвалах концентрируются лантан, цирконий, иттрий [34, 75]. В работе [16] показано, что на расстоянии свыше 3 км от золоотвала Читинской ТЭЦ-1 сформировался ореол гидрокарбонатно-сульфатных вод с повышенной минерализацией (более 1,0 г/л). Показано, что в местах нахождения ЗШО выявляются аномально высокие концентрации тяжелых металлов, радиоактивных элементов в грунтовых водах и почвах. Негативное влияние ЗШО на окружающую среду также обуславливается пылением и влиянием их на pH грунтовых вод [54, 55, 81, 85, 96]. Серьезную опасность вызывают ситуации, связанные с возможностью переполнения золоотвалов и угрозой прорыва дамб, что может приводить к сбросу содержимого золошлакохранилища в водоемы [55].

Таким образом, складирование ЗШМ в отвалах, несомненно, негативно влияет на окружающую среду, что делает необходимым увеличение уровня вовлечения золошлаковых материалов ТЭС в хозяйственный оборот,

путем их переработки с получением товарных продуктов в нескольких отраслях промышленности [53].

Пути использования зольно-шлаковых отвалов

В настоящее время уровень утилизации ЗШО в России достигает 4–5% от производства, что значительно ниже, чем в других развитых странах (в странах Европы в среднем — 50%, во Франции и Германии — 70%, в Финляндии — до 90%) [8]. Разработан целый ряд технических решений по использованию ЗШО. Намечились основные направления их использования:

- применение золошлаковых отходов в качестве добавок в различные строительные материалы, бетон для изготовления стеновых панелей [11, 15, 29, 42, 57, 67];
- использование образующегося в составе шлака ферросилиция в металлургической промышленности [17, 50];
- применение ЗШО в качестве фильтрующе-сорбирующего материала [6, 7, 61];
- в сельском хозяйстве в качестве микроудобрений [50];
- для нейтрализации кислых сточных вод [108].

В условиях современного состояния минерально-сырьевой базы, когда наблюдается тенденция обеднения вовлекаемых в переработку месторождений цветных, редких и редкоземельных металлов, ЗШО можно использовать как источник их добычи, что может быть дешевле на 20% и выше по сравнению с извлечением из промышленных руд за счет экономии на добыче сырья и геологоразведке. Также следует учесть и то, что дополнительное включение ЗШМ в хозяйственный оборот повлечет снижение расходов на их хранение в отвалах. В настоящее время в некоторых развитых странах, например США и других, разработаны и осваиваются государственные программы перевода промышленности на получение редких металлов из новых источников сырья. По этой программе уже часть продукции добывается из ЗШО ТЭС вместо традиционно используемых природных руд [5, 31, 45, 46, 48, 90].

С помощью выщелачивания можно извлекать золото, литий, ванадий, вольфрам, редкоземельные и другие элементы. Так, из золошлаковых отходов энергетических бурых углей извлекается до 40–67% титана, 5–77% бериллия, 70–87% меди, 50–81% марганца, 74–84% мышьяка, 48–60% ванадия и 62–83% галлия. Расчеты показывают, что в России только в Кемеровской области, где ежегодно накапливается около 2,5

млн. т ЗШО, объем производства РМ может составить более 30 т в год, из них — около 10 т Ti, Zr, Sr; > 3 т V; > 2 т Ga; < 1 т Nb, Ge [26, 47, 49].

Анализ обоснования выбора схем переработки золошлаковых материалов показывает, что все традиционные технологии извлечения редких и РЗЭ включают, как правило, две стадии:

- извлечение редких и редкоземельных элементов из минерального сырья в виде коллективного продукта (как правило, используется кислотная и щелочная экстракция);
- последующее его разделение (экстракция в системе «жидкость — жидкость», сорбция, осаждение в виде сульфида, или в комплексе с аммонием) [14, 32, 37, 38, 63, 66, 70, 72, 98].

Разработанные технологии позволяют добиться высокой степени извлечения ценных компонентов. Например, в работе [1] из золы, содержащей 190 г/т галлия, с помощью выщелачивания соляной кислотой извлекали в раствор до 85% Ga, который затем экстрагировали триакиламином. Технология позволяла извлечь до 77% металла. При щелочной обработке при 80 °С было извлечено до 98% галлия [14].

Показано, что из кислых растворов (рН 0,5–2,5) с высокими концентрациями железа и алюминия (1 г/л) можно извлекать РМ (лантан, церий, диспрозий, лютеций) в концентрации 50 мг/дм³ микропористым сульфокатионитом на основе сверхсшитого полистирола. Таким методом можно извлечь до 57% РМ [36]. В таблице 7 дано описание предлагаемых в литературе технологий для выщелачивания различных РЭ из нетрадиционного сырья разного происхождения, в том числе и ЗШО.

Анализ представленных данных показывает, что кислотное выщелачивание может обеспечить достаточно высокую степень извлечения различных РЭ, чтобы их затем можно было извлечь экстракцией, либо сорбцией. Однако представленные технологические схемы имеют и ряд недостатков: большинство авторов предлагает проведение выщелачивания при высоких температурах, что может быть сопряжено с высокими энергозатратами. Так как концентрация ценных металлов в ЗШМ невелика, требуется поиск путей снижения капитальных и эксплуатационных затрат. Одним из технологических подходов, обеспечивающих извлечение металлов из бедных руд, является кучное выщелачивание. Расчеты показывают, что данный подход требует меньших затрат для извлечения цветных металлов из бедного сырья, чем другие известные технологии [80].

Таблица 7

Технологии извлечения металлов из золошлаковых материалов

Металл	Описание технологии	Цитируемый источник
Ga	Выщелачивание HCl с последующей экстракцией триалкиламином, извлекается до 85% Ga	[1]
Sc и Y	Выщелачивание HCl при различных концентрациях кислоты (0,68–6,5 М), температурах (25–80 °С). Было исследовано и многократное выщелачивание одним раствором. При оптимальных условиях (3М HCl, 40 °С, плотности пульпы Т:Ж=1:5) Sc извлекался на 84%, Y – на 91%. Удавалось достигнуть концентраций Sc – 84 мг/л, Y – на 91 мг/л.	[25]
РМ (Y, La, Ce, Dy и др)	Исследовано выщелачивание РМ металлов из нескольких образцов зол разного происхождения. Золой выщелачивали азотной кислотой при 90 °С в течение 1 ч. РМ экстрагировали из раствора трибутилфосфатом. Извлекалось до 80% РМ	[35]
Cu и Cd	Исследовано выщелачивание из золы Cu и Cd щелочью в присутствии аммония. Показано, что при высоких концентрациях (5 г/л) аммоний увеличивает степень выщелачивания за счет образования комплекса.	[99]
Ba, Th, U, V, Zr	Было исследовано выщелачивание металлов из угля и ЗШМ (рН 1,0; 25 °С; Т:Ж=1:10). Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Mo, Ni, Pb, Th, U, V, Zr достигали максимальной степени выщелачивания за 32 ч.	[83]
V	Было исследовано кислотное и щелочное выщелачивание ванадия из золы. Показано, что в случае совместного использования прокаливания, кислотного выщелачивания и щелочного выщелачивания с последующим осаждением хлоридом аммония можно извлечь до 97% V.	[78]
Ga, V	Были исследованы различные режимы выщелачивания Ga и V гидроксидом натрия из золы. В оптимальных условиях (25 °С, NaOH 0,7–1,0 М, 6 ч) удавалось достигнуть 86% выщелачивания Ga, с последующим переосаждением для очистки. Выщелачивание V было низким (не более 64%).	[69]
Ge	Извлечение Ge окислительным обжигом при 250 °С с соляной кислотой. Было извлечено до 90% металла за 1 ч	[106]
Ge	Исследован процесс выщелачивания Ge из оксидной пыли соляной кислотой. В оптимальных условиях (Т:Ж=1:8, концентрации HCl 120 г/л, 2,5 ч, 90 °С) было извлечено 87% Ge.	[77]
Ge	Было исследовано выделение Ge из растворов, полученных из золы водным, кислотным и щелочным выщелачиванием, которые содержали 35, 140–256 и 787–1623 мг/л Ge. Удавалось достигнуть 90–93% осаждения Ge из раствора при осаждении сероводородом или органическими лигандами (бромиды бензилпирокатехина и цетилтриметиламмония).	[63]
V	Исследовали выщелачивание ванадия из каменного угля и его золы. При выщелачивании 5,4% серной кислотой каменного угля при 90 °С в течение 8 ч достигалось 75% выщелачивание ванадия. При выщелачивании золы угля 0,45% серной кислотой за 1 ч выщелачивалось 77% V.	[106]
Ge	Исследовано извлечение германия из ЗУ с использованием органического экстрагента с последующей сорбцией на резину. Германий извлекался из ЗУ водной экстракцией вместе с другими металлами. Извлечение германия достигало 97%.	[92]
In	Изучена возможность извлечения индия из отходов электронной промышленности. Технологическая схема включала в себя выщелачивание примесей (Mo, Al, Cr, Mg) NaOH при 100 °С в течение 30 мин., затем выщелачивание осадка HCl (0,3 М), затем экстракцию In (50 мМ) из раствора этилгексилэфиром 2-этилгексилфосфорной кислоты. Было извлечено 97% In.	[74]
V	Исследовалось выщелачивание ванадия из зол. Для выщелачивания использовались вода, 0,1М NaOH, 5 и 9% серная кислота, температуры 20, 60 и 80 °С. Показано, что в оптимальных условиях (60–80 °С, 5 и 9% серная кислота) в течение 60 мин. выщелачивается до 100% ванадия.	[93]
Sc	Выщелачивание кислотой в мягких условиях (комнатная температура и рН 4 жидкой фазы) и в более жестком режиме (температура 60 °С, рН 2,5). Исследована кинетика процесса сорбционного выщелачивания золы в течение 7 сут. и показано, что основная доля металлов (95%) переходит в фазу ионита за 30–60 мин. Sc из раствора извлекали катионитом с последующей элюцией его серной кислотой. В оптимальном режиме было извлечено до 85% Sc.	[39]
V	Изучено извлечение ванадия из каменного угля кислотным выщелачиванием с окислением NaClO ₃ с последующим соосаждением железом, обжигом осадка, щелочным выщелачиванием из осадка гидроксидом натрия, обжигом и водным выщелачиванием для получения пентоксида ванадия. Было извлечено до 97% V.	[102]

Перспективно применение микробных биогетехнологий кучного выщелачивания с использованием ацидофильных микроорганизмов, окисляющих серу и железо. Технологии биовыщелачивания бедных сульфидных руд в настоящее время широко применяются по всему миру, но разрабатываются для извлечения металлов из сульфидного сырья, являющегося источником энергии для ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов [76].

В работе [86] показано, что РЭ могут выщелачиваться из руды, содержащей пирит, в результате активности микроорганизмов: снижение рН и повышение концентрации окислителя (Fe^{3+}) в среде из-за окисления пирита приводило к выщелачиванию РМ.

ЗШО, в отличие от сульфидных руд, не включают в свой состав компонентов, которые могли бы являться энергетическим субстратом для микроорганизмов. Однако если использовать дешевый субстрат, при окислении которого микроорганизмами происходило бы необходимое для выщелачивания металлов снижение рН среды, то микробные биогетехнологии могли бы быть успешно применены для переработки ЗШМ. Одним из доступных субстратов может быть предложена элементная сера, образующаяся в результате очистки нефти и газа от серных соединений.

Элементная сера как энергетический субстрат для биотехнологии выщелачивания редких металлов и редкоземельных элементов из золошлаков

В настоящее время в мире производится примерно 70 млн. т элементной серы ежегодно, из них большая часть (почти 95%) не добывается на месторождениях серы, а является продуктом очистки углеводородного сырья от серных соединений. Крупнейшими производителями серы являются США, Канада, КНР, Россия, страны Персидского залива, Казахстан. Так как производство углеводородов в мире неуклонно растет, а экологическое природоохранное законодательство ужесточает требования к очистке нефти и газа от серных соединений, то производство серы в мире будет неуклонно увеличиваться. Спрос и цена на серу в мире колеблется, но за последние 10 лет не превысила 250\$ США за тонну. В целом, в ближайшее десятилетие ожидается сохранение превышения объемов производства серы над ее потреблением [10, 95]. Сера складывается в специальных хранилищах, называемых серными картами, крупнейшие из которых расположены в Канаде и Казахстане. При этом объемы невостребованной серы в отдельные годы достигали десятков миллионов тонн

[10]. В исследованиях, проведенных ранее, было установлено, что серные блоки, складываемые в хранилищах, могут окисляться под действием микроорганизмов, что потенциально может иметь отрицательные последствия для окружающей среды [84]. Таким образом, элементная сера, образующаяся при очистке нефтегазового топлива, может служить недорогим источником серной кислоты при микробном выщелачивании ЗШО.

Как было показано, элементная сера является лучшим энергетическим субстратом, по сравнению с тиосульфатом и тетрагидратом, для снижения значения рН культуральной жидкости аборигенного и экспериментально созданного сообществ ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов (АХМ) [24]. В результате окисления элементной серы при 28 °С экспериментально созданное сообщество АХМ снижало рН культуральной жидкости до более низкого значения (0,75), чем аборигенное, выделенное из промышленного биореактора при окислении флотоконцентрата сульфидной руды (0,98). Штаммы *Acidithiobacillus ferrooxidans* ТФО, *A. thiooxidans* ОI-8, *A. caldus* ОП-1 и *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* НТ-3 в процессе окисления элементной серы показали большую скорость снижения рН культуральной жидкости по сравнению с другими изученными штаммами видов *Acidithiobacillus* и *Sulfobacillus*. В результате адаптации сообщества микроорганизмов, созданного на основе экспериментального сообщества и вышеперечисленных штаммов, значение рН при окислении элементной серы за 6 сут. было снижено до 0,7 и 0,9 соответственно при 28 и 45 °С. Известно, что серная кислота даже при комнатной температуре и более высоком значении рН 4 в течение 7 сут. выщелачивала металлы из зольно-шлакового материала [39].

Заключение

Из всего вышесказанного следует, что разработка энерго- и ресурсосберегающих комплексных технологий извлечения из золошлаков ценных компонентов является актуальной задачей.

Во многих странах — России, США, Германии, Японии, Франции, Великобритании — проводятся исследования по технологиям извлечения редких и РЗЭ из золошлаков. Известна технология выщелачивания металлов из зольно-шлаковых отвалов концентрированными кислотами (азотная, серная, соляная). Технология дорогая, экологически опасная.

На сегодняшний день разработано порядка 300 технологий переработки золошлаков, однако не более

10% реализованы практически. Это в основном технологии использования золошлаков из сухих систем золошлакоудаления в качестве наполнителя для производства различных строительных материалов, цемента.

В Институте микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН более 50 лет ведутся исследования по разработке фундаментальных основ биоготехнологий получения цветных и благородных металлов из полиметаллических сульфидных руд, которые были начаты под руководством члена-корреспондента РАН Г.И. Каравайко.

Наиболее распространенными биоготехнологиями металлов являются кучная/подземная и чановая (агитационная).

Кучная технология используется для выщелачивания цветных металлов из бедных, отвальных сульфидных руд. В настоящее время во всем мире с помощью бактерий получают значительные количества меди и урана подземным и кучным выщелачиванием. Процессы выщелачивания по этой технологии делятся годами, поэтому она приемлема с экономической точки зрения для переработки бедных сульфидных руд, содержащих цветные металлы.

Чановая технология извлечения золота из упорных мышьяксодержащих сульфидных руд начала разрабатываться в СССР в первой половине 1960-х годов. Совместными исследованиями сотрудников Московского института стали и сплавов, Института микробиологии АН СССР, Центрального научно-исследовательского геолого-разведочного института был внесен существенный вклад в разработку этой биоготехнологии.

В конце 1990-х годов сотрудники лаборатории хемолитотрофных микроорганизмов ИНМИ РАН приняли участие в полупромышленных испытаниях чановой биоготехнологии переработки концентратов упорных золотосодержащих сульфидных руд на золотоизвлекательной фабрике ЗАО «Полюс» на Олимпиадинском месторождении в зоне вечной мерзлоты в Красноярском крае. В 2001 году был построен первый в России БИО-цех с пятью линиями из шести реакторов объемом 450 м³. В 2007 году пущен второй БИО-цех с тремя линиями из шести реакторов объемом по 1000 м³. В настоящее время ЗАО «Полюс» перерабатывает до 8 миллионов тонн коренной неокисленной сульфидной руды в год при получении до 27 тонн золота.

В биотехнологиях выщелачивания цветных металлов и извлечения благородных металлов из сульфидного сырья не возникает потребность в источниках энергии

для микроорганизмов, так как ацидофильные хемолитотрофные микроорганизмы способны получать энергию при низких значениях рН, окисляя закисное железо, элементную серу и сульфидные минералы.

Зольно-шлаковые материалы не содержат энергетические субстраты для микроорганизмов, поэтому их необходимо дополнительно вносить. Наиболее подходящим энергетическим субстратом является элементная сера. Элементная сера является отходом нефтеперерабатывающей промышленности и так же, как зольно-шлаковые материалы, в больших количествах складировается, занимая большие территории и загрязняя их кислотой — продуктом естественного ее окисления природными сообществами ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов.

Одним из способов выщелачивания ценных металлов из зольно-шлаковых материалов может быть предложено использование сообществ ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов, образующих серную кислоту при окислении элементной серы, добавляемой к зольно-шлаковому материалу как источник энергии. Окисление элементной серы микроорганизмами идет при температурах 28–45 °С, что не требует высоких затрат энергии. Серная кислота для выщелачивания ценных элементов из зольно-шлакового материала образуется при окислении элементной серы микроорганизмами, поэтому не требуется высокого расхода серной кислоты, в отличие от технологий химического выщелачивания. В предлагаемой технологии к тому же утилизируется элементная сера, в больших объемах образующаяся в нефтеперерабатывающей промышленности в качестве отхода производства. Отвалы серы занимают большие территории и наносят существенный вред окружающей среде, закисляя почву и воду.

Предлагается разработка кучной и чановой биотехнологий выщелачивания ценных металлов и редкоземельных элементов из зольно-шлаковых отвалов на основе применения сообществ ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов, окисляющих элементную серу с образованием серной кислоты и не требующих внесения органических источников углерода для конструктивного метаболизма микроорганизмов:

- кучная биотехнология, предполагающая формирование кучи по аналогии с кучной технологией выщелачивания, например, меди из бедных медных руд; или подземная биотехнология, предполагающая те же мероприятия, что применяются при подземном выщелачивании урана. Основное различие — необходимость дополнительного внесения в выщелачиваемый материал

элементарной серы при кучной биотехнологии или обработки выщелачиваемого материала при подземной биотехнологии культуральной жидкостью, содержащей серную кислоту, образованную в отдельном реакторе при окислении элементарной серы.

- чановая биотехнология, предполагающая выщелачивание зольно-шлаковых материалов, смешанных в определенных пропорциях с элементарной серой, в биореакторах при отработанных оптимальных значениях плотности пульпы, соотношении золошлаки: элементарная сера и температуры.

Биотехнологии более дешевые по сравнению с технологиями химического выщелачивания и экологически безопасные. Выщелачивания ценных металлов и редкоземельных элементов при помощи микроорганизмов идет в мягких условиях: при температуре не выше 45 °С и серной кислотой, образуемой при окислении микроорганизмами элементарной серы.

Работа выполнена при поддержке государственного контракта Минобрнауки России № 14.515.12.0002.

Литература

1. *Абишева З.С., Длайда И.А., Пономарева Е.И.* // Цветные металлы. — 1994. — Вып. 3. — С. 36–38.
2. *Арбузов С.И.* // Геохимия. — 2007. — Т. 311. — № 1. — С. 77–83.
3. *Арбузов С.И.* Геохимия редких элементов в углях центральной Сибири. Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора геолого-минералогических наук. Томск: Томский политехнический университет, 2005. — 25 с.
4. *Бариева Э.Р., Егорова Е.С., Королев Э.А., Нуждин Е.В.* // Материалы международной научно-практической конференции «Казанская геологическая школа и ее роль в развитии геологической науки в России». — 2009.
5. *Бирюков В.В., Метелев С.Е., Сиротюк В.В., Шевцов В.Р.* // Сибирский торгово-экономический журнал. — 2008. — № 7. — С. 66–70.
6. *Блайда И.А., Слюсаренко Л.И., Сацюк К.А., Абишева З.С.* // WasteECo: сотрудничество для решения проблемы отходов. 6-я Международная конференция, 8–9 апреля 2009 г., Харьков, Украина.
7. *Варданян М.А.* // Труды Братского государственного университета. серия: естественные и инженерные науки — развитию регионов Сибири. — 2006. — № 1. — С. 12–17.
8. *Ватин Н.И., Петросов Д.В., Калачев А.И., Лахтинен П.* // Инженерно-строительный журнал. — 2011. — № 4. — С. 16–21.
9. *Ведягин А.А., Мишаков И.В., Хлебников Б.М. и др.* // Энциклопедия инженера-химика. — 2008. — № 10. — С. 21–26.
10. *Волошина О.А.* // Минеральные ресурсы России. Экономика и управление. — 2011. — № 4. — С. 68–73.
11. *Дарманская Т.А.* Очистка металлсодержащих сточных вод сорбционными материалами из отходов производства. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата технических наук. — Томский политехнический университет. 2008. — 17 с.
12. *Делицын Л.М., Власов А.С.* Комплексное использование углей на ТЭС // Горная промышленность. — 2001. — № 3.
13. *Дик Э.П., Соболева А.Н.* // Материалы II научно-практического семинара Золошлаки ТЭС: удаление, транспорт, переработка, складирование: материалы 2-го междунар. науч.-практ. семинара, Москва, 23–24 апреля 2009 г. — М.: Издательский дом МЭИ, 2009. — С. 65–68.
14. *Ежова Н.Н., Власов А.С., Сударева С.В., Делицын Л.М.* // Экология промышленного производства. — 2010. — Вып. 2. — С. 45–52.
15. *Еременко Е.В., Махотин В.С., Чумаков А.Е.* // Золошлаки ТЭС: удаление, транспорт, переработка, складирование: материалы 3-го междунар. науч.-практ. семинара, Москва, 22–23 апр. 2010. — М.: МЭИ, 2010. — С. 43–44.
16. *Замана Л.В., Усманова Л.И., Усманов М.Л.* // Вестник бурятского государственного университета. — 2010. — № 3. — С. 28–33.
17. *Заостровский А.Н., Солодов Г.А., Мурко В.И., Панин А.В., Токарева Т.С.* // Вестник Кузбас. ГТУ. — 2006. — № 2 (53). — С. 88–89.
18. *Зеликман А.Н., Коршунов Б.Г.* Металлургия редких металлов. — М.: Metallurgy, 1991. — 432 с.
19. *Ихисова И.П.* // Горный информационно-аналитический бюллетень. — 2008. — № 6. — С. 181–185.
20. *Калиниченко В.А., Петракова Н.Н.* // Горный информационно-аналитический бюллетень. — 2013. — № 2. — С. 270–275.
21. *Капустин Ф.Л., Уфимцев В.М.* // Золошлаки ТЭС: удаление, транспорт, переработка, складирование: материалы 3-го Междунар. науч.-практ. семинара, Москва, 22–23 апр. 2010. — М.: МЭИ, 2010. — С. 57–64.
22. *Кожмяко С.И., Бондарь Д.В., Шевцов В.Р.* // Золошлаки ТЭС: удаление, транспорт, переработка, складирование: материалы 2-го междунар. науч.-практ. семинара, Москва, 23–24 апр. 2009. — М.: МЭИ, 2009. — С. 48–52.
23. *Кожмяко С.И., Шевцов В.Р., Бондарь Д.В.* // Золошлаки ТЭС: удаление, транспорт, переработка, складирование: материалы 3-го междунар. науч.-практ. семинара, Москва, 22–23 апр. 2010. — М.: МЭИ, 2010. — С. 29–32.

24. Кондратьева Т.Ф., Пивоварова Т.А., Цаплина И.А., Булаев А.Г., Муравьев М.И., Журавлева А.Е., Григорьева Н.В., Меламуд В.С., Мощанецкий П.В. Селекция сообществ ацидохемолитотрофных микроорганизмов с высокой скоростью окисления элементной серы // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2013. — Т. 9. — № 1. — С. 5–13.
25. Концевой А.А., Михнев А.Д., Пашков Г.Л., Колмакова Л.П. // Журнал прикладной химии. — 1995. — Т. 68. — № 7. — С. 1075–1078.
26. Краснов О.С., Салихов В.А. // ИНТЕРЭКСПО ГЕО-СИБИРЬ (Сибирская государственная геодезическая академия, Новосибирск). — 2012. — Т. 1. — № 3. — С. 70–75.
27. Краснов О.С., Салихов В.А. // ИНТЕРЭКСПО ГЕО-СИБИРЬ (Сибирская государственная геодезическая академия, Новосибирск). — 2010. — Т. 3. — № 1. — С. 158–162.
28. Крылов Д.А. // Энергия: экон., техн., экол. — 2010. — № 4. — С. 44–50.
29. Ларичкин В.В., Ларичкина Н.И., Мокроусова Е.В., Немущенко Д.А., Гусев К.П. // Рециклинг отходов. — 2010. — № 3(27). — С. 18–20.
30. Макаров А.Б., Талалай А.Г. // Литосфера. — 2012. — № 1. — С. 172–176.
31. Меретуков М.А. // Цветные металлы. — 2012. — № 12. — С. 51–56.
32. Мязина В.И., Ихисоева И.П. // Горный информационно-аналитический бюллетень. — 2008. — № 6. — С. 191–194.
33. Нифантов Б.Ф., Заостровский А.Н., Занина О.П. // Вестн. КузбасГТУ. — 2006. — № 5(56). — С. 84–90.
34. Озерский А.Ю., Озерский Д.А., Кузнецов Г.И. // Разведка и охрана недр. — 2006. — № 11. — С. 42–46.
35. Патент РФ. 2007. № 2293134.
36. Патент РФ. 2010. № 2462523.
37. Патент РФ. 2011. № 24633.
38. Патент США. 2010. № 8177881.
39. Пашков Г.Л., Кузьмин В.И., Пантелева М.В., Кокорина А.Н. // J. of Siberian Federal University. Engineering & Technologies. — 2012. — Vol. 5. — No. 5. — P. 520–530.
40. Пинаев В.Е. // Электронный журнал «Исследовано в России». <http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2004/131.pdf>.
41. Польшкин С.И. Обогащение руд и россыпей редких и благородных металлов. — М.: Недра, 1987. — 428 с.
42. Порфирьева Р.Т., Герасимов В.В., Медведева Г.А., Ефимова В.А. // Известия КГАСУ. — 2005. — №1(3). — С. 95–97.
43. Пронин С.В. // Экологічна безпека. — 2008. — № 3–4. — С. 70–71.
44. РД 34.9.603–88. Методические указания по организации контроля состава и свойств золы и шлаков, отпускаемых потребителям тепловыми электростанциями. Введ. 01.01.1989. — М.: ВТИ, 1988.
45. Салихов В.А. // Вестник Кемеровского государственного университета. Экономика. — 2012. — № 1. — С. 182–186.
46. Салихов В.А. // Вестник Кемеровского государственного университета. Экономика. — 2012. — № 1. — С. 276–279.
47. Салихов В.А. // Вестник Томского государственного университета. — 2009. — № 327. — С. 163–168.
48. Салихов В.А. // Вестник Томского государственного университета. Экономика. — 2010. — № 2(10). — С. 69–75.
49. Салихов В.А. Перспективы развития малых наукоемких производств // Вестник Кемеровского государственного университета. Экономика. — 2011. — № 4. — С. 255–258.
50. Соловьев Л.П., Пронин В.А. // Современные наукоемкие технологии. — 2011. — № 3. — С. 40–42.
51. Фоеорборн Х.Й. // Золошлаки ТЭС: удаление, транспорт, переработка, складирование: материалы 3-го междунар. науч.-практ. семинара, Москва, 22–23 апр. 2010. — М.: МЭИ, 2010. — С. 22–28.
52. Целиковский Ю.К. // Энергетик. — 2006. — № 10. — С. 29–33.
53. Целиковский Ю.К. // Энергетик. — 2007. — № 2. — С. 11–15.
54. Целюк Д.И. Особенности техногенного воздействия золоотвалов средней Сибири на подземные воды. Автореферат. Всероссийский научно-исследовательский институт минерального сырья им. Н.М. Федоровского. — М., 2009.
55. Черенцова А.А. // Ученые заметки ТОГУ. — 2012. — Т. 3. — № 1. — С. 29–42.
56. Черепанов А.А., Кардаш В.Т. // Геология и полезные ископаемые мирового океана. — 2009. — № 2. — С. 98–115.
57. Шишелова Т.И., Самусева М.Н. // Успехи современного естествознания. — 2007. — № 8. — С. 24–26.
58. Шпирт М.Я. // Химия твердого топлива. — 2004. — № 6. — С. 62–84.
59. Щигельски Т., Хыцнар Я. // Золошлаки ТЭС: удаление, транспорт, переработка, складирование: материалы 3-го междунар. науч.-практ. семинара, Москва, 22–23 апр. 2010. — М.: МЭИ, 2010. — С. 33–37.
60. Эмдин С.В., Жабо В.В., Целиковский Ю.К. // Энергетик. — 2006. — № 9. — С. 11–13.
61. Ahmaruzzaman M. // Progress in Energy and Combustion Science. — 2010. — Vol. 36. — No. 3. — P. 327–363.
62. Armesto L., Merino J.L. // Fuel. — 1999. — Vol. 78. — No. 5. — P. 613–618.
63. Arroyo F., Font O., Fernandez-Pereira C., Querol X., Juan R., Ruiz C., Coca P. // J. of Hazardous Materials. — 2009. — Vol. 167. — No. 1–3. — P. 582–588.
64. Baba A., Gurdal G., Sengunalp F., Ozay O. // Environmental Monitoring and Assessment. — 2008. — Vol. 139. — No. 1–3. — P. 287–298.
65. Bhangare R.C., Ajmal P.Y., Sahu S.K., Pandit G.G., Puranik V.D. // International Journal of Coal Geology. — 2011. — Vol. 86. — No. 4. — P. 349–356.

66. Blissett R.S., Rowson N.A. // *Fuel*. – 2012. – Vol. 97. – P. 1–23.
67. Chandra N., Sharma P., Amritphale S.S., Baghel N.S., Pashkov G.L., Voskresenskaya E.N. // *Waste Management*. – 2008. – Vol. 28. – № 10. – P. 1993–2002.
68. Cordoba P., Ochoa-Gonzalez R., Fonta O., Izquierdo M., Querola X., Leivas C., Lopez-Anton M.A., Diaz-Somoano M., Martinez-Tarazona M.R., Fernandez C, Tomas A. // *Fuel*. – 2012. – Vol. 92 – No. 1. – P. 145–157.
69. Font O., Querol X., Juan R., Casado R., Ruiz C.R., Lopez-Soler A., Coca P., Garcia Pena F.G. // *J. of Hazardous Materials*. – 2007. – Vol. 139. – No. 3. – P. 413–423.
70. Haoran L., Yali F., Jianglong L., Xiaobing L., Zhuwei D. // *Rare Metals*. – 2008. – Vol. 27. – No. 2. – P. 116–120.
71. Haxel G, Hedrick J, Orris J. Rare earth elements critical resources for high technology // *United States Geological Survey Fact Sheet*. – 2002. – № 08702.
72. Ishaq M., Jan F.A., Shakirullah M., Ahmad I., Ali H. // *Arabian Journal of Geosciences*. – 2013. – online публикация на сайте журнала.
73. Izquierdo M., Querol X. // *International Journal of Coal Geology*. – 2012. – Vol. 94. – P. 54–66.
74. Kang H.N., Lee J.-Y., Kim J.-Y. // *Hydrometallurgy*. – 2011. – Vol. 110. – P. 120–127.
75. Khanra S., Mallick D., Dutta S.N., Chaudhuri S.K. // *Water, Air, and Soil Pollution*. – 1998. – Vol. 107. – No. 1–4. – P. 251–275.
76. Krebs W., Brombacher C., Bosshard P.P., Bachofen R., Brandl H. // *FEMS Microbiol. Rev.* – 1997. – Vol. 20. – No. 3–4. – P. 605–617.
77. Liang J., Wang H. // *Rare Metals*. – 2008. – Vol. 27. – No. 6. – P. 555–559.
78. Mayorov V.G., Nikolaev A.I., Kopkov V.K., Safonova L.A., Serba N.V. // *Russian Journal of Applied Chemistry*. – 2007. – Vol. 80. – No. 12. – P. 2020–2023.
79. Neupane G., Donahoe R.J. // *Fuel*. – 2013. – Vol. 104. – P. 758–770.
80. Norgate T., Jahanshahi S. // *Minerals Engineering*. – 2010. – No. 23. – P. 65–73.
81. Ochoa-Gonzalez R., Cuesta A.F., Cordoba P., Diaz-Somoano M., Font O., Lopez-Anton A., Querol X., Martinez-Tarazona M.R., Gimenez A. // *J. Environmental Management*. – 2011. – Vol. 92. – No. 10. – P. 2586–2589.
82. Patra K.C., Rautray T.R., Tripathy B.B., Nayak P. // *Applied Radiation and Isotopes*. – 2012. – Vol. 70. – No. 4. – P. 612–616.
83. Paul M., Seferinoglu M., Aycik G.A., Sandstroem A., Smith M.L., Paul J. // *International Journal of Mineral Processing* – 2006. – Vol. 79. – No. 1. – P. 27–41.
84. Pisz J. Characterization of extremophilic sulfur oxidizing microbial communities inhabiting the sulfur blocks of Alberta's oil sands. Master science thesis. – Saskatchewan: Department of soil science, University of Saskatchewan, 2008. – 99 p.
85. Popovic A., Radmanovic D., Djordjevic D., Polic P. // *Environmental Chemistry / Eds. Lichtfouse E., Schwarzbauer J., Robert D.* – Berlin, Heidelberg: Springer, 2005. – P. 145–151.
86. Sapsford D.J., Howell R.J., Geroni J.N., Penman K.M., Dey M. // *Minerals Engineering*. – 2012. – Vol. 39. – P. 165–172.
87. Seredin V.V. // *Geology of Ore Deposits*. – 2007. – Vol. 49. – No. 1. – P. 1–30.
88. Singh H., Kolay P.K. // *Water, Air, and Soil Pollution*. – 2009. – Vol. 198. – No. 1–4. – P. 87–94.
89. Sivapullaiah P.V., Baig M.A.A. // *Environmental Earth Sciences*. – 2010. – Vol. 61. – No. 8. – P. 1735–1744.
90. Syed S. // *Hydrometallurgy*. – 2012. – Vol. 115–116. – P. 30–51.
91. Tang Q., Liu G., Zhou C., Sun R. Distribution of trace elements in feed coal and combustion residues from two coal-fired power plants at Huainan, Anhui, China // *Fuel*. – 2013. In Press.
92. Torralvo F.A., Fernandez-Pereira C. // *Minerals Engineering*. – 2011. – Vol. 24. – P. 35–41.
93. Tsygankova M.V., Bukin V.I., Lysakova E.I., Smirnova A.G., Reznik A.M. // *Rus. J. of Non-Ferrous Metals*. – 2011. – Vol. 52. – No. 1. – P. 19–23.
94. Ugurlu A. // *Environmental Geology*. – 2004. – Vol. 46. – No. 6–7. – P. 890–895.
95. USGS Mineral Commodity Summaries, 2000–2012. <http://minerals.usgs.gov>.
96. Van der Sloot H.A., Zomeren A.V. // *Ecotoxicological Characterization of Waste / Eds. Moser H., Roembke J.* – New York: Springer, 2009. – P. 231–243.
97. Vijayan V., Behera S.N., Ramamurthy V.S., Puri S., Shahi J.S., Singh N. // *X-ray Spectrum*. – 1997. – Vol. 26. – P. 65–68.
98. Virolainen S., Ibane D., Paatero E. // *Hydrometallurgy*. – 2011. – Vol. 107. – P. 56–61.
99. Wang J., Ban H., Teng X., Wang H., Ladwig K. // *Chemosphere*. – 2006. – Vol. 64. – No. 11. – P. 1892–1898.
100. Wanga W., Qina Y., Song D., Wanga K. // *International J. of Coal Geology*. – 2008. – Vol. 75. – No. 2. – P. 81–87.
101. Xiang W., Han B., Zhou D., Nzihou A. // *International J. of Mining Science and Technology*. – 2012. – Vol. 22. – No. 3. – P. 405–409.
102. Ye P., Wang X., Wang M., Fan Y., Xiang X. // *Hydrometallurgy*. – 2012. – Vol. 117–118. – P. 108–115.
103. Yuan C.-G. // *Microchimica Acta*. – 2009. – Vol. 165. – No. 1–2. – P. 91–96.
104. Zandi M., Russell N.V. // *Environmental Monitoring and Assessment*. – 2007. – Vol. 131. – No. 1–3. – P. 509–526.

105. Zhang Y-M., Bao S-X., Liu T., Chen T-J., Huang J. // Hydrometallurgy. – 2011. – Vol. 109. – P. 116–124.
106. Zhu G., Wang J, Cheng Z., Zhao Y. // Rare Metals. – 2008. – Vol. 27. – No. 3. – P. 238–242.
107. Zhu Yang-ge. // Trans. Nonferrous met. soc. China. – 2010. – Vol. 20. – P. 107–111.
108. Ziemkiewicz P.Z., Knox A.S. // Coal Combustion Byproducts and Environmental Issues. – 2006. – P. 50–58.

ASH AND SLAG DUMPS OF THE OBJECTS HEAT AND POWER GENERATION AS A SOURCE OF PRECIOUS METALS AND RARE EARTH ELEMENTS

A.G. BULAEV, T.F. KONDRATYEVA

S.N. Vinogradsky Institute of Microbiology RAS, Moscow

At present there are about 300 ash recycling technology, but not more than 10% are realized in practice. This is basically a technology using ash from the dry ash handling systems as a filler for the production of various construction materials and cement. S.N. Vinogradsky Institute of Microbiology RAS during more than 50 years conducts researches on the development of the fundamental biogeotechnological bases for getting of nonferrous and precious metals from polymetallic sulphide ores. The most common metals are biogeotechnology heap / and underground tanks (agitation). The authors substantiate the efficiency of the development of biotechnology heap and vat leaching of precious metals and rare earth elements from ash and slag dumps on the basis of application of acidophilic chemolithotrophic communities of microorganisms that oxidize elemental sulfur to form sulfuric acid and not requiring organic carbon sources for constructive metabolism.

Keywords: biogeotechnology, slag heaps, precious metals, rare earth elements.

ВОЗМОЖНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ СБОРА МИКРОВОДОРОСЛЕЙ МЕТОДОМ ФЛОККУЛЯЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОФЛОККУЛЯНТОВ

П.М. ГОТОВЦЕВ*, М.А. ЛОМОНОСОВА, В.В. БУТЫЛИН, К.В. ГОРИН

НИЦ «Курчатовский институт», Москва

В обзоре проведен анализ существующих и прогнозируемых методов флокуляции для сбора микроводорослей с целью дальнейшей переработки с получением биотоплива или других продуктов. Среди наиболее адекватных методов особое внимание уделено вопросу создания биофлоккулянтов на основе дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* и анализу уже выполненных в данной области исследований. Показана перспективность дальнейших работ по исследованию способностей микроорганизмов к флокуляции.

Ключевые слова: биотопливо, микроводоросли, флокуляция, биофлоккулянты.

Введение

Получение биотоплива из водорослей сегодня вызывает значительный интерес многих научных групп. Основными преимуществами водорослей являются высокая скорость роста и то, что они не требуют площадей пахотных земель, необходимых для выращивания пищевых культур. Среди многочисленных видов водорослей определенный интерес вызывают фототрофные микроводоросли, которым для роста нужен свет, углекислый газ и небольшое количество минеральных веществ, которые, как правило, содержатся в природных водах [9]. Микроводоросли также отличаются высокой скоростью роста, что служит весьма важным фактором для производства биотоплива [8, 37]. Однако при их использовании возникает ряд сложностей, среди которых выделяется энергозатратность процесса подготовки микроводорослей к переработке [23]. Целью данного процесса является извлечение из воды либо концентрирование микроводорослей. Использование принудительной сушки, фильтр-прессования или центрифугирования требует серьезных затрат энергии, что негативно сказывается на себестоимости конечного продукта [19]. Другим и менее энергозатратным подходом к решению данной задачи является использование реагентов — флоккулянтов — для ускорения процесса осаждения биомассы. Далее будут

рассмотрены некоторые подходы к решению задач флокуляции микроводорослей.

Основные трудности при сборе микроводорослей из водной среды

Прежде чем проводить анализ особенностей сбора микроводорослей, рассмотрим обобщенно некоторые вопросы, связанные с взаимодействием отдельных клеток со средой. В случае, если мы анализируем процесс флокуляции, то в первом приближении силы, действующие на микроводоросли, можно рассматривать по аналогии с частицами, находящимися в воде [32]. Взвешенные в воде частицы обычно обладают поверхностным зарядом, который может быть положительным либо отрицательным. Для поддержания электрической нейтральности заряженные частицы будут притягивать ионы из раствора с противоположным зарядом (противоионы). Система, образованная зарядом поверхности частицы и связанными с ним противоионами в растворе, называется двойным электрическим слоем. Схематично двойной электрический слой представлен на рисунке 1.

Вблизи поверхности частицы противоионы формируют слой Штерна — плотный слой ионов, недоступный для других противоионов. По мере удаления от поверхности частицы-противоионы формируют диффузный слой как результат равновесия между электростатическим притяжением и тепловой диффузией. В результате разность потенциалов между поверхностью частицы и основным объемом раствора уменьшается в большей или меньшей мере экспоненциально при увеличении расстояния от поверхности частицы.

© 2013 г. Готовцев П.М., Ломоносова М.А., Бутылин В.В., Горин К.В.

* Автор для переписки:

Готовцев Павел Михайлович

к.т.н., НИЦ «Курчатовский институт»

123182 Москва, пл. Академика Курчатова, 1

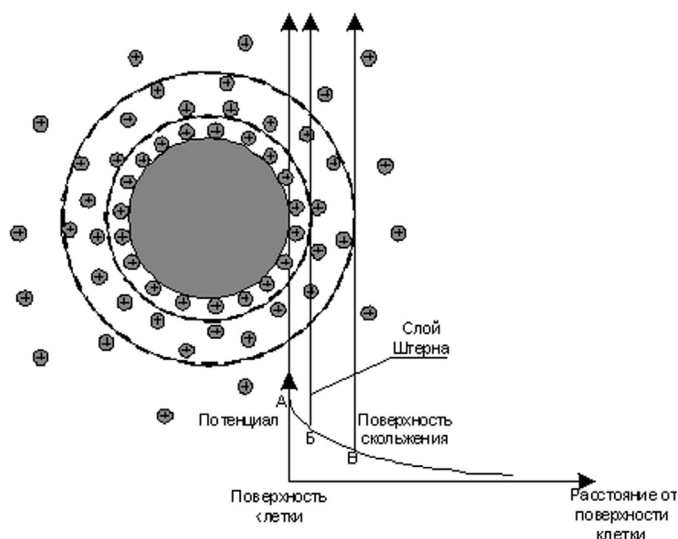


Рис. 1. Структура двойного электрического слоя. А — потенциал поверхности клетки; Б — потенциал Штерна; В — ζ потенциал

Облака противоионов вокруг заряженных частиц в растворе приводят к образованию электрического отталкивания между частицами. ζ -потенциал — это разность потенциалов основного объема раствора и слоя противоионов, которые остаются связанными с заряженной частицей при ее движении в растворе (поверхность скольжения). ζ -потенциал можно относительно легко оценить, исходя из мобильности заряженных частиц в электрическом поле; следовательно, он является важным индикатором степени отталкивания между заряженными частицами в растворе. Когда значение ζ -потенциала велико (>30 мВ, положительное или отрицательное), имеет место сильное отталкивание между частицами, и раствор считается стабильным. Когда значение ζ -потенциала близко к нулю, частицы могут приближаться друг к другу до тех пор, пока не попадут под действие сил Ван-дер-Ваальса. Когда это произойдет, частицы соединятся в агрегаты, и будет наблюдаться явление флокуляции или коагуляции.

Как и другие устойчивые суспензии частиц, суспензии клеток микроводорослей стабилизируются зарядом поверхности клеток. Этот заряд появляется преимущественно благодаря наличию карбоксильных ($-\text{COOH}$) или аминогрупп ($-\text{NH}_2$) на поверхности клеток [32]. Карбоксильные группы диссоциируют и имеют отрицательный заряд при $\text{pH} > 4-5$, тогда как аминогруппы не заряжены при таких значениях pH . Это приводит к образованию отрицательного заряда поверхности при $\text{pH} > 4-5$ [32].

Концентрация биомассы в биореакторах зависит от их типа: так, в открытых реакторах она может достигать

0,5 г/л, в то время как в фотобиореакторах 5 г/л [31, 32]. Так что для выделения водорослей требуется каким-то образом избавиться от значительного объема воды [6, 26]. Использование термических или механических методов извлечения потребует существенных затрат тепла и электроэнергии, что негативным образом скажется на себестоимости конечного продукта. Очевидно, что важной задачей является разработка методов флокуляции для выделения микроводорослей из воды. К настоящему времени уже показано, что при использовании рыночных флокулянтов можно достичь с 0,5 г/л концентрации биомассы в осадке, равной 10–50 г/л [38]. Также в зависимости от типа флокулянта, вида водорослей и их концентрации определяется и его доза. Она может составлять от 10 до 50 мг/л и выше. Таким образом, при обработке 1000 л раствора из фотобиореактора с концентрацией биомассы 5 г/л можно теоретически получить до 5 кг сухих микроводорослей. При дозе 50 мг/л для флокуляции придется затратить 50 г флокулянта. При промышленном производстве речь будет идти о переработке десятков или даже сотен тонн раствора, поэтому затраты на флокулянт будут вносить определенный вклад в себестоимость конечного продукта. Рассмотрим далее те виды флокулянтов, которые могут найти применение при извлечении микроводорослей из водной среды.

Наиболее очевидным подходом к извлечению микроводорослей является использование промышленных коагулянтов и флокулянтов. Среди таких веществ наибольшее распространение получили соединения на основе солей алюминия и железа и полимерные флокулянты. Соли металлов успешно применялись для флокуляции микроводорослей (в частности, *Dunaliella* [2]), однако их использование приводило к высоким концентрациям металлов в осадке [24]. Промышленные полимерные флокулянты, как правило, содержат в своей основе полиакриламид. Их использование приводит к тому, что в массе осевших микроводорослей может находиться акриламид, который является токсичным соединением [5]. Таким образом, для решения задачи по сбору микроводорослей необходимо рассмотреть возможности по разработке новых, более безопасных и эффективных флокулянтов.

Одним из первых соединений биологического происхождения, которые намечались для использования в качестве флокулянта, является хитозан. Данное соединение ранее рассматривалось и как промышленный флокулянт для очистки сточных вод различных видов. Появление задачи по сбору микроводорослей вновь повысило интерес к данному соединению [7].

Химическая формула хитозана следующая (рис. 2):

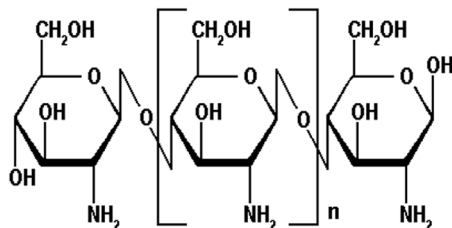


Рис. 2. Химическая формула хитозана

Хитозан относят к полисахаридам, его мономером является N-ацетил-1,4-β-D-глюкопиранозамин. Как видно из формулы, молекула хитозана содержит аминогруппы; чем выше число n, тем больше аминогрупп в молекуле. Благодаря этому биополимер проявляет катионные свойства.

Источником хитозана служит природный хитин, который обычно извлекают из панцирей ракообразных. Такой источник делает данный биополимер более дорогим по сравнению с традиционными флокулянтами. Однако у хитозана есть существенное преимущество — под действием таких ферментов, как хитиназа или хитобиаза, хитозан разлагается до N-ацетил-D-глюкозамина и D-глюкозамина. Эти ферменты являются микробными, что позволяет сделать вывод о том, что хитозан представляет собой биоразлагаемое соединение.

Основной трудностью при использовании хитозана для сбора микроводорослей является то, что данное соединение эффективно при низких значениях pH, в то время как культуры микроводорослей, наоборот, характеризуются pH выше 7 [7]. Также следует отметить плохую растворимость хитозана в воде, что требует проводить активное перемешивание среды на начальной фазе образования флокул. Последнее, в свою очередь, ведет к росту энергозатрат на организацию процесса флокуляции по сравнению с традиционными полимерными флокулянтами.

В то же время рассмотренные полимеры (как синтетические, так и хитозан) становятся неэффективными в растворах с большой ионной силой [31], что делает затруднительным их применение для сбора водорослей, растущих в морской воде.

Микроорганизмы способные к флокуляции

Способность некоторых микроорганизмов вступать в адгезионные взаимодействия или инициировать процесс флокуляции в настоящее время вызывают значительный интерес [33, 35, 39]. Проявление этих

свойств микроорганизмами определяется характеристиками поверхности клеток, влияние на которые также оказывает и окружающая среда. Гены, ответственные за характеристики поверхностей клеток, определяются достаточно сложными регуляторными путями. Так, например, для дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* адгезионные механизмы регулируются большим количеством сигнальных путей [20, 34]. В то же время природные флокулирующие свойства могут быть амплифицированы, и полученные таким образом штаммы могут найти применение в промышленности.

Флокуляция дрожжей описывается как обратимый, неполовой, Са-зависимый процесс образования флокул в жидкой фазе, содержащих значительное количество клеток [4, 28]. Этот процесс находит все более широкое применение при производстве алкогольных напитков, биоэтанола и даже таких лекарственных препаратов, как инсулин [1]. Указанный интерес объясняется тем, что быстрое осаждение дрожжевой массы в ферментере позволяет существенно сэкономить на дальнейших процессах разделения (таких как фильтр-прессование или центрифугирование). Так, например, в случае производства биоэтанола флокуляция дрожжей позволила понизить себестоимость продукции за счет сокращения переменных издержек на электроэнергию [39]. Способности дрожжей к флокуляции вызывают существенный интерес и в таких отраслях, как производство биодизеля и биополимеров, агрохимии.

На сегодняшний день вопрос о флокулирующих способностях бактерий практически не исследован [1]. Тем не менее было показано, что флокуляция с участием бактерий происходит при очистке хозяйственно-бытовых сточных вод, что положительно сказывается на дальнейших процессах обезвоживания осадка [14]. Исследования флокулирующих свойств бактерий продемонстрировали, что в процесс флокуляции вовлечены внеклеточные полимеры [29], но их свойства отличаются от лектинов и адгезинов, которые идентифицированы в дрожжах [22].

Таким образом, если рассматривать в ближайшей перспективе биофлокулянты для сбора микроводорослей, то они могут быть разработаны на основе изученных дрожжевых культур.

Механизм флокуляции *Saccharomyces cerevisiae*

Основная гипотеза процессов с участием лектина была разработана Teunissen A.W., Steensma H.Y. (1995) [30]. Данная гипотеза подразумевает, что расположенные на поверхности клеток специфичные белки

флоккулины распознают и связываются с α -маннан карбогидратами расположенной рядом клетки дрожжей. Также в работе [18] делается предположение, что ионы Ca^{2+} могут выступать в роли кофактора в установлении активной конформации поверхностных белков.

Белки флоккулины (FLO) включают в себя домен лектина и играют основную роль в процессе флоккуляции. Данный факт был показан в работах по экспрессии генов FLO, при которой нефлоккулирующая *S. cerevisiae* стала активно образовывать флокулы [10, 36].

Остановимся на роли ионов Ca^{2+} . Как было сказано выше, наличие этих ионов необходимо для осуществления процесса флоккуляции с участием белков флоккулинов. Так как данный ион выступает в роли кофактора, то он связывается в процессе флоккуляции, за счет чего и снижается его концентрация в растворе. Таким образом, теоретически использование *S. cerevisiae* может привести к снижению кальциевой жесткости в воде. С другой стороны, отсутствие данного катиона приведет к ингибированию процесса флоккуляции. Однако было показано [15, 16], что и другие двухвалентные металлы могут выступать в роли кофактора. Авторы этих работ определили, что в данной роли могут выступать ионы Cu^{2+} , Ni^{2+} и Zn^{2+} . Таким образом, *S. cerevisiae* может выступать как средство биологической очистки сточных вод от тяжелых металлов [16].

В то же время отмечается, что подобный механизм флоккуляции с участием кофактора протекает в случае взаимодействия клеток дрожжей с микроводорослями [17]. То есть, возможна организация процесса флоккуляции, интенсивность протекания которого теоретически можно регулировать концентрацией катионов кальция в среде. Также следует подчеркнуть, что по сравнению с полимерами, применяемыми в качестве флокулянтов, клетка — достаточно крупный объект, который, будучи основой для флокулы, должен оседать быстрее. Следовательно, в случае использования клеток в роли флокулянта должна существенно вырасти скорость осаждения.

Из генов, регулирующих способность дрожжей к флоккуляции, наиболее изученным является FLO11. Обзор экспрессии данного гена представлен в [21] и [35]. Исследования данного гена показали, что регулирование его транскрипции определяется возможностями питания клетки и специфическим составом среды в процессе роста. На сегодня гораздо меньше информации получено о других генах, ответственных за образование флоккулинов. Так, авторы работы [35] предполагают, что гены FLO могут контролироваться аналогичными (но не идентичными) путями, как и FLO11. Подтверждением

данного предположения служит тот факт, что у генов FLO1 и FLO11 те же самые активаторы транскрипции — Flo8p [13] и Mss11p [3]. В ряде исследований отмечается [12, 25, 27], что на экспрессию гена FLO1, как и FLO11, оказывают влияние факторы внешней среды. К таким факторам относят возможное голодание по азоту и/или углероду, а также pH и, возможно, ионную силу окружающего клетку раствора. Также предполагается, что гены FLO подвержены эпигенетическому контролю под действием специфических промоторов, что позволяет клеткам *S. cerevisiae* переключаться между состоянием с активной экспрессией генов и состоянием с «отключенными» генами FLO [11, 20].

Заключение

Снижение затрат на всех этапах технологических процессов получения и переработки биомассы даст возможность повысить конкурентоспособность биотоплив. Задача сбора микроводорослей также с каждым годом становится все более актуальной, поскольку данный процесс с использованием рыночных технологий оказывается весьма энергозатратным. Ведется поиск как новых синтетических полимеров на роль флокулянтов, так и биологических соединений или систем. Как видно из представленных данных, среди потенциальных биофлокулянтов наибольший интерес представляют белки флоккулины. На сегодня свойства этих белков и сам процесс биофлоккуляции в недостаточной степени изучены, однако уже полученные данные позволяют говорить о потенциальной перспективности данного подхода. От использования клеток с белками флоккулинами ожидается целый ряд преимуществ, из которых можно отметить следующие:

- более эффективную флоккуляцию за счет большей скорости осаждения;
- теоретическую возможность возвращать часть флокулянта при обработке осадка;
- возможность контроля в определенных пределах процессов флоккуляции за счет изменения концентрации Ca^{2+} в среде.

В этом контексте интересной задачей является поиск и анализ других потенциальных продуцентов флокулинов и сопоставление их эффективности с *S. cerevisiae*. Не менее важным является дальнейшее исследование молекулярно-биологического понимания работы генов FLO и анализ факторов, влияющих на их экспрессию. Полученные результаты могут найти применение не только для решения задачи сбора микроводорослей, но

и в других областях, где требуется организация процесса флокуляции. В этой связи необходимо отметить, что участие ионов двухвалентных тяжелых металлов в качестве кофактора уже рассматривается как потенциальная технология для удаления из сточных вод тяжелых металлов [15, 16].

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации. Государственный контракт от 22.03.2013 г. № 14.516.11.0020.

Литература

1. Bauer F.F., Govender P., Bester M.C. Yeast flocculation and its biotechnological relevance // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 88. – P. 31–39.
2. Ben-Amotz A. and Avron M. The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella* // *Trends Biotechnol.* – 1990. – Vol. 8. – P. 121–125.
3. Bester M.C., Pretorius I.S., Bauer F.F. The regulation of *Saccharomyces cerevisiae* FLO gene expression and Ca²⁺-dependent flocculation by Flo8p and Mss11p // *Curr. Genet.* – 2006. – Vol. 49(6). – P. 375–383.
4. Bony M., Thines-Sempoux D., Barre P., Blondin B. Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* flocculation protein Flo1p // *J. Bacteriol.* – 1997. – 1997. – Vol. 179(15). – P. 4929–4936.
5. Bratby J. Coagulation and Flocculation in Water and Wastewater Treatment. – IWA Publishing, 2006.
6. Brennan L. and Owende P. Biofuels from microalgae – a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products // *Renew. Sust. Energy Rev.* – 2010. – Vol. 14. – P. 557–577.
7. Chang Y.-R. and Lee D.-J. Coagulation-membrane filtration of *Chlorella vulgaris* at different growth phases // *Drying Technol.* – 2012. – Vol. 30. – P. 1317–1322.
8. Chisti Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol // *Trends Biotechnol.* – 2008. – Vol. 26. – P. 126–131.
9. Dismukes G.C., Carrieri D., Bennette N., Ananyev G.M., Posewitz M.C. Aquatic phototroph: efficient alternatives to land-based crops for biofuels // *Current Opin. Biotechnol.* – 2008. – No. 19. – P. 235–240.
10. Govender P., Domingo J.L., Bester M.C., Pretorius I.S., Bauer F.F. Controlled expression of the dominant flocculation genes FLO1, FLO5, and FLO11 in *Saccharomyces cerevisiae* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2008. – Vol. 74(19). – P. 6041–6052.
11. Halme A., Bumgarner S., Styles C., Fink G.R. Genetic and epigenetic regulation of the FLO gene family generates cell surface variation in yeast // *Cell.* – 2004. – Vol. 116(3). – P. 405–415.
12. Jin Y.-L., Speers R.A. Effect of environmental conditions on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Am. Soc. Brew. Chem.* – 2000. – Vol. 58. – P. 108–116.
13. Kobayashi O., Yoshimoto H., Sone H. Analysis of the genes activated by the FLO8 gene in *Saccharomyces cerevisiae* // *Curr. Genet.* – 1999. – Vol. 36(5). – P. 256–261.
14. Liu X.W., Sheng G.P., Yu H.Q. Physicochemical characteristics of microbial granules // *Biotechnol. Adv.* – 2009. – Vol. 27(6). – P. 1061–1070.
15. Machado M.D., Janssens S., Soares H.M.V.M., Soares E.V. Removal of heavy metals using a brewer's yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*: advantages of using dead biomass // *J. Appl. Microbiol.* – 2009. – Vol. 106(6). – P. 1792–1804.
16. Machado M.D., Santos M.S., Gouveia C., Soares H.M., Soares E.V. Removal of heavy metals using a brewer's yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*: the flocculation as a separation process // *Bioresour. Technol.* – 2008. – Vol. 99(7). – P. 2107–2115.
17. Mendez M. et al. Induction of flocculation in photosynthetic organisms, WO 2009158658. 2009a.
18. Miki B.L.A., Poon N.H., James A.P., Seligy V.L. Possible mechanism for flocculation interactions governed by gene Flo1 in *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Bacteriol.* – 1982. – Vol. 150(2). – P. 878–889.
19. Molina Grima E. et al. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics // *Biotechnol. Adv.* – 2003. – Vol. 20. – P. 491–515.
20. Octavio L.M., Gedeon K., Maheshri N. Epigenetic and conventional regulation is distributed among activators of FLO11 allowing tuning of population-level heterogeneity in its expression // *Plos Genetics.* – 2009. – Vol. 5(10). e1000673.
21. Palecek S.P., Parikh A.S., Kron S.J. Sensing, signalling and integrating physical processes during *Saccharomyces cerevisiae* invasive and filamentous growth // *Microbiology.* – 2002. – Vol. 148(Pt 4). – P. 893–907.
22. Park C., Novak J.T. Characterization of lectins and bacterial adhesins in activated sludge flocs // *Water Environ. Res.* – 2009. – Vol. 81(8). – P. 755–764.
23. Posten C. and Schaub G. Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels – a process view // *J. Biotechnol.* – 2009. – Vol. 142. – P. 64–69.
24. Rwehumbiza V.M. et al. Alum-induced flocculation of pre-concentrated *Nannochloropsis salina*: residual aluminium in the biomass, FAMES and its effects on microalgae growth upon media recycling // *Chem. Eng. J.* – 2012. – Vol. 200–202. – P. 168–175.
25. Sampermans S., Mortier J., Soares E.V. Flocculation onset in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of nutrients // *J. Appl. Microbiol.* – 2005. – Vol. 98(2). – P. 525–531.
26. Schlesinger A. et al. Inexpensive non-toxic flocculation of microalgae contradicts theories; overcoming a major hurdle to

- bulk algal production // *Biotechnol. Adv.* – 2012. – Vol. 30. – P. 1023–1030.
27. Soares E.V., Seynaeve J. The use of succinic acid, as pH buffer, expands the potentialities of utilisation of a chemically defined medium in *Saccharomyces cerevisiae* flocculation studies // *Biotechnol. Lett.* – 2000. – Vol. 22. – P. 859–863.
28. Stratford M. Evidence for two mechanisms of flocculation in *Saccharomyces cerevisiae* // *Yeast.* – 1989. – Vol. 5. – Spec. No. – S441–445.
29. Subramanian S.B., Yan S., Tyagi R.D., Surampalli R.Y., Lohani B.N. Isolation and molecular identification of extracellular polymeric substances (EPS) producing bacterial strains for sludge settling and dewatering // *J. Environ. Sci. Health. A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* – 2008. – Vol. 43(13). – P. 1495–1503.
30. Teunissen A.W., Steensma H.Y. Review: the dominant flocculation genes of *Saccharomyces cerevisiae* constitute a new subtelomeric gene family // *Yeast.* – 1995. – Vol. 11(11). – P. 1001–1013.
31. Uduman N. et al. Dewatering of microalgal cultures: a major bottleneck to algae-based fuels // *J. Renew. Sust. Energy.* – 2010. – Vol. 2(012701). <http://dx.doi.org/10.1063/1.3294480>.
32. Vandamme D., Foubert I., Muylaert K. Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production // *Trends in Biotechnology.* – 2013. – Vol. 31. – No 4. – P. 233–239.
33. Verran J., Whitehead K. Factors affecting microbial adhesion to stainless steel and other materials used in medical devices // *Int. J. Artif. Organs.* – 2005. – Vol. 28(11). – P. 1138–1145.
34. Verstrepen K.J., Jansen A., Lewitter F., Fink G.R. Intragenic tandem repeats generate functional variability // *Nat. Genet.* – 2005. – Vol. 37(9). – P. 986–990.
35. Verstrepen K.J., Klis F.M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts // *Mol. Microbiol.* – 2006. – Vol. 60(1). – P. 5–15.
36. Wang D.L., Wang Z.Y., Liu N., He X.P., Zhang B.R. Genetic modification of industrial yeast strains to obtain controllable NewFlo flocculation property and lower diacetyl production // *Biotechnol. Lett.* – 2008. – Vol. 30(11). – P. 2013–2018.
37. Wijffels R.H. and Barbosa M.J. An outlook on microalgal biofuels // *Science.* – 2010. – Vol. 329. – P. 796–799.
38. Wileman A. et al. Rheological properties of algae slurries for minimizing harvesting energy requirements in biofuel production // *Bioresour. Technol.* – 2011. – Vol. 104. – P. 432–439.
39. Zhao X.Q., Bai F.W. Yeast flocculation: new story in fuel ethanol production // *Biotechnol. Adv.* – 2009. – Vol. 27(6). – P. 849–856.

POSSIBLE TECHNOLOGIES FOR THE COLLECTION OF MICROALGAE FLOCCULATION METHOD USING BIOFLOCCULANTS

P.M. GOTOVTSEV, M.A. LOMONOSOVA, V.V. BUTYLIN, K.V. GORIN

National Research Centre «Kurchatov Institute», Moscow

The review analyzes the current and projected flocculation methods for the collection of microalgae for further processing to produce biofuels or other products. Among the most appropriate techniques, special attention is paid to creating bioflocculants based on yeast cells *Saccharomyces cerevisiae* and analysis already done in this field of research. The prospects of further studies of the ability of microorganisms to flocculation.

Keywords: biofuel, microalgae, flocculation, bioflocculants.

ЮБИЛЕЙНЫЕ ДАТЫ 2013 ГОДА В ГЕНЕТИКЕ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ*

К 100-летию выхода в свет
книги У. Бэтсона «Проблемы генетики»



Мировое значение Бэтсона. В 2013 году исполняется 100 лет со времени публикации известной книги Уильяма Бэтсона «Проблемы генетики». Рассмотрению данной книги журнал уже посвящал статью, правда, в другом аспекте — в связи с комментариями Н.И. Вавилова ее текста на страницах принадлежавшего ему фундаментального произведения его английского учителя (Воробьев В.С., Воробьева О.В. Вавилов и Бэтсон: ученик и учитель: новые исторические находки. К 120-летию со дня рождения Н.И. Вавилова // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2007. — Т. 3. — № 4. — С. 53–64). Однако другая юбилейная дата требует иного ракурса, а именно: ретроспективного анализа значения выхода в свет классической книги одного из основателей генетики и даже автора самого этого термина.

Прежде всего, по традиции необходимо привести краткую биографию Бэтсона. Он родился 8 августа 1861 года в Уитби, графство Йоркшир. Отец работал преподавателем в Сент Джон колледже в Кембридже, был гуманитарием по убеждениям и не одобрял увлечений сына естественными науками. В 1879 году Уильям Бэт-

сон поступил в Сент Джон колледж, где его интересы постепенно сосредоточились на биологии под влиянием учителей — А. Седгвика и У.Ф.Р. Уэлдона.

В 1883 и 1884 годах во время летних каникул работал у У.К. Брукса в США. В 1884–1886 гг. занимался изучением филогении хордовых. Его интересы сосредоточились на изучении морского беспозвоночного *Balanoglossus*, которое он определил как представителя иглокожих (по современной номенклатуре баланоглосс отнесен к *Hemichordata*). Им показан энтероцельный способ образования целомов у этого животного. Он обнаружил у *Balanoglossus* нотохорд и выдвинул гипотезу о происхождении *Chordata* из *Echinodermata*.

Следует подчеркнуть, что на формирование Бэтсона как исследователя значительное влияние оказала эмбриологическая школа Ф.М. Бальфура в Кембриджском университете и американский зоолог У.К. Брукс. В результате была заложена надежная основа, которая и определила дальнейшую научную судьбу Бэтсона.

Примерно в эти годы его концепции вступили в противоречие с традиционной биологией. С 1886 по 1894 годы он собирал материал по изменчивости у животных, на основе которого стал развивать идею прерывистой изменчивости организмов. Свои взгляды Бэтсон обобщил в труде «Materials for the study of variation» (1894). В последующие годы он начал исследовать проблему передачи наследственных признаков, ставя эксперименты со скрещиванием. По сути на стыке этих двух линий исследования — наследственности и изменчивости — он пришел к пониманию истинного значения опытов Г. Менделя.

1900-й год стал рубежным в биологии в связи с переоткрытием идей и фактов Менделя. Об этом Бэтсон узнал из работы Хуго де Фриза и стал сторонником Менделя, начав распространять генетические представления среди друзей и коллег. Однако на родине Дарвина менделизм вызвал неприятие большинства специалистов, причем среди них оказался один из учителей Бэтсона — Уэлдон. Объединились на антименделевском фронте представители качественной, описательной биологии и биометрики.

Видя такую позицию и осознавая вероятность повторного забвения трудов Менделя, Бэтсон стал активно бороться за утверждение законов наследственности. Для этого он вначале перевел с немецкого на английский язык классическую работу Менделя. Дальше последовала

* Материал подготовлен В.С. Воробьевым

публикация в 1902 году книги Бэтсона «Менделевские принципы наследственности» (кстати, 100 лет назад, в 1913 году вышло в свет ее третье издание).

Бэтсон активно разрабатывал научные и методические основы нового направления, сделав Кембриджский университет центром притяжения для всех его сторонников. Опыты Менделя он расширил на животных. Мало-помалу именно на английской земле фактически стала формироваться новая наука, которой Бэтсон придумал краткое, звучное, точное по содержательному смыслу и сразу же прижившееся наименование — «генетика». Это слово он упомянул в 1905 году в письме Алану Седгвику, а в 1906 году обнародовал его на международной конференции по гибридизации растений в Лондоне. Будучи в 1908—1910 гг. профессором генетики Кембриджского университета, Бэтсон продолжил целенаправленную работу по утверждению этой науки, сумев воспитать сильных учеников — Р. Паннета, Э.Р. Саундерса, Л. Донкастера и др. и организовать круг последователей. Наконец, вместе с Р. Паннетом он в 1910 году основал в Англии новый журнал «*Journal of Genetics*», который издавался до 1977 года, после чего прекратил существование и был возрожден в 1985 году под тем же названием, но только в ведении Индийской академии наук в Бангалоре (ныне в сотрудничестве с издательством «*Springer*»). Венцом всей этой деятельности стало назначение Бэтсона в 1910 году директором Садоводческого института в Мертоне, близ Лондона (институт носил имя благотворителя — Джона Иннеса).

В этой цепи действий печатание в 1913 году книги «Проблемы генетики» стало знаковым событием. Оно как бы подводило определенный итог деятельности 50-летнего ученого.

События Первой мировой войны нарушили нормальный ход событий, однако в послевоенные годы ритм работы бэтсоновского института был возобновлен. К этому времени авторитет Бэтсона неизмеримо вырос и стал общепризнанным.

Ученый был оригинально мыслящим исследователем и начиная с молодых лет отличался тем, что не боялся идти против традиционных взглядов и умел защищать свое мнение, как это было в случае отстаивания идей Менделя.

Бэтсону принадлежит ряд теоретических положений в генетике. Так, в 1905 году он предложил теорию «присутствия-отсутствия» для объяснения возникновения новых признаков вследствие выпадения тормозящих факторов. Вместе с Р. Паннетом он в 1906 году открыл сцепление генов (вопреки представлениям Менделя) в экспериментах

по скрещиванию душистого горошка. Данный феномен в дальнейшем был всесторонне изучен Т. Морганом с коллегами в опытах на дрозофиле. Парадоксально, но Бэтсон не признал хромосомной теории наследственности, разработанной Морганом, считая ее материалистической. При этом при передаче наследственных факторов он отдавал предпочтение не материальным элементам, а внутренним силам. Даже возникновение изменчивости он объяснял нематериальными причинами.

Признание Бэтсона на родине было велико. В 1904 году он был удостоен медалью Дарвина, в 1914 году был избран президентом Британской ассоциации для продвижения науки, в 1920 г. награжден королевской медалью.

Умер ученый 8 февраля 1926 года.

Бэтсон и Россия. Бэтсон бывал в России в 1880-х годах в экспедиции и в 1925 году. В 1923 году он был избран иностранным членом-корреспондентом Российской академии наук, в 1925 г. — иностранным членом-корреспондентом АН СССР.

В 1913—1914 гг. в его Садоводческом институте стажировался недавний выпускник Николай Вавилов, что оказало значительное влияние на формирование его научно-методологических позиций в плане приверженности генетике.

В сентябре 1925 г. Бэтсон в качестве почетного гостя прибыл в Россию на празднование 200-летия Российской академии наук. Николай Иванович Вавилов опекал и сопровождал своего учителя при посещении научных учреждений Ленинграда и Москвы, которые произвели должное впечатление на гостя. Во время этого посещения был сделан ряд памятных фотографий, на которых запечатлен Бэтсон в кругу известных ученых (Оскар Фохт, Ю.А. Филипченко и др.). По возвращении на родину Бэтсон написал статью, в которой объективно проанализировал состояние биологической науки в послереволюционной России (эта статья была напечатана на русском языке в 1999, 2000 гг.). Спустя полгода выдающийся генетик умер. Н.И. Вавилов написал некролог, в котором провел подробный анализ научной деятельности Бэтсона и его вклада в становление генетики.

Идеи Бэтсона поначалу не прививались в России, что в значительной степени объяснялось противодействием К.А. Тимирязева, который с огромным накалом эмоций и пафосности пропагандировал дарвинизм в России и не хотел ничего слышать о генетике. Тем не менее труды Бэтсона получали должную оценку благодаря Н.И. Вавилову, Н.К. Кольцову, Ю.А. Филипченко и др. Но после ухода из жизни этих ученых в лысенковское

время критика Тимирязевым Бэтсона была использована против утверждения генетики в СССР. При этом в целом применялась тактика если не официального запрещения, то умолчания о его вкладе в науку и неиздания работ.

В результате информация о выдающемся английском ученом на русском языке явно не достаточна, и поэтому профессиональное научное сообщество должно компенсировать такой пробел. Юбилейные даты дают формальную возможность для этого.

Литература о Бэтсоне:

1. *Bateson Beatrice*. William Bateson, F.R.S., Naturalist. — Cambridge University Press, Cambridge, 1928 (мемуары жены, изданные после смерти ученого в 1926 г.; переизданы в 1985 г.).
2. *Вавилов Н.И.* Вильям Бэтсон (W. Bateson). 1861–1926. Памяти учителя // Труды по прикладной ботанике и селекции. — 1925 [1926]. — № 5. — С. 499–511 (переиздание в кн.: Вавилов Н.И. Жизнь коротка, надо спешить. — М.: Сов. Россия, 1990. — С. 148–169).
3. *Лобацкая Т.Е.* Уильям Бэтсон: у истоков генетики // Вестн. РАН. — 2003. — Т. 73. — № 9. — С. 830–837.
4. *Лобацкая Т.Е.* У. Бэтсон и его вклад в становление и развитие генетики / Автореф. дисс. доктора биол. наук. — М., 2007. — 43 с.
5. *В.С. Воробьев, О.В. Воробьева.* Вавилов и Бэтсон: ученик и учитель: новые исторические находки. К 120-летию со дня рождения Н.И. Вавилова // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2007. — Т. 3. — №4. — С. 53–64.
6. *Bateson W.* Materials for the study of variation. — L., 1894.
7. *Bateson W.* Mendel's principles of heredity, 3 ed. — Camb., 1913.
8. *Bateson W.* Problems of genetics. — New Haven: Yale Univ. Press; London: Humphrey Milford, Oxford Univ. Press, 1913. — 259 p. (имеется электронная версия: <http://archive.org/details/problemsofgeneti00bate>).
9. http://en.wikipedia.org/wiki/William_Bateson.
10. <http://www.jic.ac.uk/Corporate/services-and-products/library/batesongallery.htm> (фотоальбом).

Структура книги «Проблемы генетики». Нами рассматривается первое издание этого знаменитого труда.

Книга представляет собой объемистый том в 259 страниц, отпечатанный на плотной, полукartonной бумаге, с черно-белыми иллюстрациями и двумя цветными

вклейками. В ней содержится предисловие, оглавление, 11 глав, предметный и авторский указатели. Она включает в себя курс Силлимановских мемориальных лекций, прочитанных У. Бэтсоном в Йельском университете (США) в 1907 году. Книга была напечатана в августе 1913 г. тиражом 1000 экземпляров. В числе предшественников Бэтсона в качестве Силлимановских лекторов (начиная с 1901 г.) были многие выдающиеся ученые, включая и его соотечественников: Дж. Дж. Томсона, Ч. Шеррингтона, Э. Резерфорда.

То, что собрание лекций вышло в свет через 6 лет после их прочтения, отразилось на содержании книги. Поэтому Бэтсон внес некоторые добавления, например, к главе 9, в которой он привел новые результаты 1912 года. Но в целом научные данные соответствуют уровню 1907 года — времени реального чтения лекций.

Главы книги имеют следующие названия: «Проблемы вида и разновидностей»; «Меристические явления»; «Классификация изменчивости»; «Мутационная теория»; «Изменчивость и среда»; «Влияние внешних условий»; «Бесплодие гибридов» и др.

Огромное значение этой книги для развития науки начала XX века бесспорно, о чем неоднократно говорили как современники, так и исследователи более позднего периода. Не менее значимой остается и историческая роль данного труда одного из основателей генетики.

Н.И. Вавилов дал наиболее точные характеристики книги своего учителя: «В 1913 году выходит замечательная книга Бэтсона под названием «Проблемы генетики», которая представляет собой критический обзор основных генетических проблем. Можно сказать, что во всей генетической литературе 20-го века эта книга занимает исключительное место по своей пронизательности, свежести; можно перечитывать книгу эту много раз... Критика учения о приобретенных признаках и мутационной теории была наиболее выпукло сделана Бэтсоном. Его книга «Проблемы генетики» многих из нас заставила коренным образом переменить свои взгляды на вопросы о мутациях, о ламаркизме».

В связи со столетним юбилеем выхода книги редколлегия журнала считает целесообразным дать факсимильное воспроизведение одной из ее основополагающих глав — главы 9 «Влияние измененных условий: адаптация»*, которую очень высоко ценил Николай Иванович Вавилов. В конце текста данной главы дается небольшой комментарий.

* Bateson W. Problems of genetics. — New Haven: Yale Univ. Press; London: Humphrey Milford, Oxford Univ. Press, 1913. — P. 187–212.

PROBLEMS OF GENETICS

BY

WILLIAM BATESON, M.A., F.R.S.

DIRECTOR OF THE JOHN INNES HORTICULTURAL INSTITUTION, HON. FELLOW OF ST. JOHN'S COLLEGE, CAMBRIDGE, AND FORMERLY PROFESSOR OF BIOLOGY IN THE UNIVERSITY

WITH ILLUSTRATIONS



NEW HAVEN: YALE UNIVERSITY PRESS
LONDON: HUMPHREY MILFORD
OXFORD UNIVERSITY PRESS
MCMXIII

TABLES OF CONTENTS.

CHAPTER	PAGE
I. INTRODUCTORY. THE PROBLEM OF SPECIES AND VARIETY.....	I
II. MERISTIC PHENOMENA.....	31
III. SEGMENTATION, ORGANIC AND MECHANICAL.....	60
IV. THE CLASSIFICATION OF VARIATION AND THE NATURE OF SUBSTANTIVE VARIATION.....	83
NOTE TO CHAPTER IV.....	94
V. THE MUTATION THEORY.....	97
NOTE TO CHAPTER V.....	116
VI. VARIATION AND LOCALITY.....	118
VII. LOCAL DIFFERENTIATION—continued. OVERLAPPING FORMS.....	146
VIII. LOCALLY DIFFERENTIATED FORMS—continued. CLIMATIC VARIETIES.....	164
IX. THE EFFECTS OF CHANGED CONDITIONS.....	187
X. THE EFFECTS OF CHANGED CONDITIONS—continued. THE CAUSES OF GENETIC VARIATION.....	212
XI. THE STERILITY OF HYBRIDS. CONCLUDING REMARKS.....	233
APPENDIX TO CHAPTER X.....	250
INDEX.....	251

CHAPTER IX

THE EFFECTS OF CHANGED CONDITIONS: ADAPTATION

In the attempt to conceive a process by which Evolution may have come about, the first phenomenon to be recognized and accounted for is specific difference. With that recognition the outline of the problem is defined. The second prerogative fact is adaptation. Forms of life are *on the whole* divided into species, and these species *on the whole* are adapted and fit the places in which they live. To many students of Evolution, adaptation has proved so much more interesting and impressive than specific diversity that they have preferred it to the first place in their considerations.

Whether this is, as I believe, an inversion of the logical order or not, there is one most serious practical objection to such preference, that whereas specific diversity is a subject which can be investigated both by the study of variation and by the analytical apparatus which modern genetic science has developed, we have no very effectual means of directly attacking the problems of Adaptation.

The absence of any definite progress in genetics in the last century was in great measure due to the exclusive prominence given to the problem of Adaptation. Almost all debates on heredity centered in that part of the subject. No one disputes that the adaptation of organisms to their surroundings is one of the great problems of nature, but it is not the primary problem of descent. Moreover, until the normal and undisturbed course of descent under uniform conditions is ascertained with some exactness, it is useless to attempt a survey of the consequences of external interference; nor as a rule can it be even possible to decide with much confidence whether such interferences have or have not definite consequences. Those, for example, who debated with enthusiasm whether acquired characters are or are not transmitted were constantly engaged in discussing occur-

188 PROBLEMS OF GENETICS

rences which we now know to be ordinary features of descent under uniform conditions, and the origin of variations which were certainly not caused directly by circumstances at all. In the absence of any factorial analysis, or of any conception of what factorial composition means and implies, no one knew what varieties might be expected from given parents. The appearance of any recessive variety was claimed as a consequence of some treatment which might have been applied to the parents. There was no possible standard of evidence or means of controlling it, and thus the discussion was singularly unfruitful. Before we can tell how the course of descent has departed from the normal, we must know what the normal would have been if we had let alone. We are still far from having such knowledge in adequate measure, but it does now exist in some degree, and we are steadily approaching a position from which we shall be able to form fairly sound estimates of the true significance of evidence for or against the proposition that environmental treatment can produce positive disturbances in the physiological course of descent.

Thus described, the field for consideration is very wide. Though the effects of changed conditions were especially studied in the hope of solving the problem of adaptation by direct observation, that, as all are now agreed, is but a part of a more general question. We must ask not only do changed conditions produce an *adaptive* response on the part of the offspring, but whether they produce any response on the part of the offspring at all. It is not in doubt that by violent means, such as starvation or poisoning of the reproductive cells, effects of a kind, stunting and deformity for instance, can be made evident, just as similar effects may follow similar treatment during embryonic or larval life. Apart from interferences of this class, are there any that may be reasonably invoked as modifying the course of inheritance?

No epitome of the older evidence for the inheritance of adaptive changes is here required. That has often been collected, especially by Weismann, who exposed its weaknesses so thoroughly as to carry conviction to most minds, and showed that whether the phenomenon occurs or not, no one can yet prove

that it does. Belief in these transmissions, after being almost universally held, was with singular unanimity abandoned. This change in opinion, though doing credit to the faith of the scientific community in evidential reasoning, is the more remarkable inasmuch as the strength of the idea was not derived from the minute amounts of supposed facts now demolished. On the contrary, it was really an instinctive deduction from a wide superficial acquaintance with the properties of animals and plants. They *can* accommodate themselves to circumstances. They *do* make responses sometimes marvellously appropriate to demands for which they can scarcely have been prepared. What more natural than to suppose that the permanent adaptations have been achieved by inherited summation of such responses? No one had actually been driven to believe in the inheritance of adaptative changes because bitches which had been docked had been known to give birth to tailless puppies, or because certain wheat in Norway was alleged to have become acclimatized in a few generations. Evidence of this kind was collected and produced rather as an ornamental appendix to a proposition already accepted, and held to be plainly demonstrated by the facts of nature. Looked at indeed in that preliminary and uncritical way, the case is simply overwhelming. Those who desire to see how strong it is should turn to Samuel Butler's *Life and Habit*, and even if in reading they reiterate to themselves that no experimental evidence exists in support of the propositions advanced, the misgiving that none the less they may be true is likely to remain. Making every deduction for the fact that the wonders of adaptation have been grossly exaggerated, and that marvels of fitness and correspondence between means and ends have grown out of mere anthropomorphic speculations, there is much more left to be accounted for than can at all comfortably be accepted as the product of happy accidents. So oppressive are these difficulties that we can scarcely blame those who imagine that the study of heredity is primarily directed to the problem of the transmission of acquired characters, a preconception still almost universal among the laity.

But since the belief in transmission of acquired adaptations

arose from preconception rather than from evidence, it is worth observing that, rightly considered, the probability should surely be the other way. For the adaptations relate to every variety of exigency. To supply themselves with food, to find it, to seize and digest it, to protect themselves from predatory enemies whether by offence or defence, to counter-balance the changes of temperature, or pressure, to provide for mechanical strains, to obtain immunity from poison and from invading organisms, to bring the sexual elements into contact, to ensure the distribution of the type; all these and many more are accomplished by organisms in a thousand most diverse and alternative methods. Those are the things that are hard to imagine as produced by any concatenation of natural events; but the suggestions that organisms had had from the beginning innate in them a power of modifying themselves, their organs and their instincts so as to meet these multifarious requirements does not materially differ from the more overt appeals to supernatural intervention.

The conception, originally introduced by Hering and independently by S. Butler, that adaptation is a consequence or product of accumulated *memory* was of late revived by Semon and has been received with some approval, especially by F. Darwin. I see nothing fantastic in the notion that memory may be unconsciously preserved with the same continuity that the protoplasmic basis of life possesses. That idea, though purely speculative and, as yet, incapable of proof or disproof contains nothing which our experience of matter or of life at all refutes. On the contrary, we probably do well to retain the suggestion as a clue that may some day be of service. But if adaptation is to be the product of these accumulated experiences, *they must in some way be translated into terms of physiological and structural change*, a process frankly inconceivable.

To attempt any representation of heredity as a product of memory is, moreover, to substitute the more obscure for the less. Both are now inscrutable; but while we may not unreasonably aspire to analyse heredity into simpler components by ordinary methods of research, the case of memory is altogether different. Memory is a mystery as deep as any that even psy-

chology can propound. Philosophers might perhaps encourage themselves to attack the problem of the nature of memory by reflecting that after all the process may in some of its aspects be comparable with that of inheritance, but the student of genetics, as long as he can keep in close touch with a profitable basis of material fact, will scarcely be tempted to look for inspiration in psychical analogies.

For a summary of the recent evidence I may refer the reader to Semon's paper¹ where he will find a collection of these observations described from the standpoint of a convinced believer. At the outset one cannot help being struck by the fact that of the instances alleged, very few, even if authentic, show the transmission of acquired modifications which can in any sense be regarded as adaptative, and many are examples not so much of a transmission of characters produced in the parents as of variation induced in the offspring as a consequence of treatment to which the parents were submitted, the parents themselves remaining apparently unmodified. No one questions the great importance of evidence of this latter class as touching the problem of the causes of variation, but it is not obvious why it is introduced in support of the thesis that acquired characters are inherited.

It is most difficult to form a clear judgment of the value of the evidence as a whole. To doubt the validity of testimony put forward by reputable authors is to incur a charge of obstinacy or caprice; nevertheless in matters of this kind, where the alleged phenomena are, if genuine, of such exceptional significance, belief should only be extended to evidence after every possible source of doubt has been excluded. We believe such things when we must, but not before. At the very least we are entitled to require that confirmatory evidence should be forthcoming from independent witnesses. So far as I have seen, this requirement is satisfied in scarcely any of the examples that have been lately published, and until it is, judgment may reasonably be suspended.

In some cases, however, the facts are not doubtful. Standfuss, by subjecting pupae of *Vanessa urticae* to cold, produced

¹ Semon, R., Der Stand der Frage nach der Vererbung erworbener Eigenschaften, published in *Fortschr. der naturw. Forschung*, Bd. 11, 1910.

the now well-known temperature-aberrations in which the dark pigment is greatly extended. He put together in a breeding-cage 32 males and 10 females showing this modification in various degrees. Two of these females died without leaving young. Seven produced exclusively normal offspring. From the eighth female 43 butterflies were bred, and of these there were four (all males) which to a greater or less extent exhibited the aberrational form.² The mother of this family was the most abnormal of the 10 females originally put in.

Fischer's experiment with *Aretia caja* was on similar lines. From pupae which had been frozen almost all the moths which emerged showed aberrational markings. A pair of these mated and produced 173 young which pupated. Those which emerged early were all normal, but of those which emerged late, 17 had in various degrees abnormal markings like those of the parents.³ In neither of these examples is there any question as to the facts. Both observers have great experience and give full details of their work.

As regards *Vanessa urticae*, however, it must be recalled that Fischer himself showed that in Nymphalids somewhat similar aberrations could be produced both by heat and by cold, and even by centrifuging the pupae. Frh. von Linden produced a transitional form of the same aberration in *V. urticae* by the action of carbonic acid gas.⁴ It is highly probable that the appearance is due to a morbid change, perhaps an arrest of development, which may be brought about by a great diversity of causes. In the experiments the cause probably was a diseased condition of the tissues of the mother herself. She had been subjected to freezing sufficiently severe to prevent the proper development of the pigments and some of the ovarian cells presumably suffered also. It will be observed that the only specimens which were affected were the offspring of the most abnormal female, and of them only four out of forty-three showed any change.

The same interpretation probably applies to the cases in

² Standfuss, M., *Denks. Schweiz. naturf. Ges.*, XXXVI, 1898, p. 32.

³ Fischer, E., *Allg. Ztschr. f. Entomologie*, Bd. VI, 1901.

⁴ Out of 12 pupae treated 8 died and of the 4 survivors, one only was affected. See M. v. Linden, *Archiv. Rassen- u. Gesells.*, 1904, I.

Arctia caja. In this species the markings are well known to be liable to great variation. As Barrett says, even in nature individuals are rarely quite alike, and an immense number of strange forms occur in collections.⁵ These are greatly sought after by some collectors, especially in England, where they fetch high prices at auctions, and it is notorious that most of them come from Lancashire and the West Riding of Yorkshire. It is commonly supposed that the breeders of that district subject them to abnormal conditions, and especially to unnatural feeding, but I know no clear evidence that this is true. From whatever cause it is certain that the natural pattern is, in some strains at all events, very easily disturbed.

The elaborate experiments of Schröder with *Abraxas grossulariata* are difficult to follow and are complicated by the fact that the series which was submitted to abnormal temperatures was derived from an abnormal original pair. From the evidence given it is not clear to me whether the temperature had a distinct effect. This insect, like *Arctia caja*, produces an immense number of variations (especially in the amount of the black pigment) and as most of these are, I believe, reared in domestication for sale, it is highly probable that the species is easily influenced by cultural conditions.

Schröder describes two other experiments which have been accepted by Semon and other supporters of the view that acquired characters are transmitted. In the first, *Phratra vitellinae*, a phytophagous beetle living on the undersides of leaves, was used. It naturally feeds on *Salix fragilis*, a species without a felt, or tomentum, on the underside of the leaves. Larvae were transferred to another willow (near *S. viminalis*) which has the undersides of the leaves felted. The larvae took readily to the new food, pushing the tomentum before them as they gnawed the leaves. They came to maturity and when they were about to lay their eggs they were given a free choice between *S. fragilis* and the tomentose species. The greater number of ovipositions,

⁵ For illustrations see Oberthur's *Études d'Entom.*, 1896, where many of these curious aberrations are represented; also Barrett, *Lepid. Brit. Islands*, II, pp. 71 and 72.

is bred in captivity these irregularities of behaviour do or do not occur when the larvae are fed on uninjured leaves.

The famous case of Schübeler's wheat is revived by Semon. The story will be familiar to most readers of the literature of the subject. Briefly it is that annuals, especially wheat and maize, raised from seed in Central Europe take more time in coming to maturity and ripening than similar plants raised in Norway, where the summer days are much longer. The received account is that he imported seed especially of maize and of wheat from Central Europe to Norway and found that in successive years the period of growth and ripening was increasingly reduced. After two generations seed of the accelerated wheat was sent back to Breslau where it was grown, and was found to ripen rather more slowly than in Norway, but much more quickly than the original stock had done. The facts recorded by Schübeler⁶ are that he received seed from Eldena, which is on the Baltic near Greifswald. The variety is described as "*100 tägiger Sommer Weizen*," but no more exact record of its behaviour in Germany is given. This wheat, grown at Christiania in 1857, took 103 days to harvest. Its seed was again grown in Christiania in 1858, and took 93 days, and sown again in 1859 it took only 75 days, 28 days less than in the first year of cultivation in Norway. Seed of the 1858 crop was sent to Breslau, and grown there by Roedelius in 1859; it took 80 days. Evidently before such a record can be used as proving an inheritance of acquired characters numbers of particulars should be forthcoming. The view that Johannsen has taken is that the result was probably due to unconscious selection of the earlier individuals among a population consisting of many types of various compositions. Some effect may no doubt be ascribed to that cause, but I cannot think that alone it would account for the results. My impression is rather that they were produced by differences in the cultivation and especially in the seasons. Research of an elaborate character would be necessary in order to eliminate the various sources of error, and nothing of the kind has been done; nor does Semon allude to these difficulties in prominently adducing Schübeler's evidence. A

⁶ Schübeler, F. C., *Die Kulturpflanzen Norwegens*, 1862, especially pp. 24 and 28.

219, took place on *fragilis*, and there were 127 on the tomentose bush, which we are told was six times as large as the *fragilis*. The larvae from *fragilis* were next put on the tomentose species and reared on it. When they became imagines they were similarly given their choice, with the result that there were 104 ovipositions on the tomentose species and only 83 on *fragilis*. In the next generations there were 48 ovipositions on the tomentose and 11 on *fragilis*. Finally the fourth generation made 15 ovipositions on the tomentose and none on *fragilis*.

The difficulty about such experiments is obviously that one has no assurance that the change of instinct, in so far as there is any, may not be a mere consequence of the captivity. It must, besides, be extremely difficult to arrange the experiment so that there is really an equal choice between the two bushes, when one stands beside the other. Przibram, in quoting this case, considers that as the tomentose bush was about six times as large as the *fragilis*, some indication of the relative attractiveness of the two may be obtained by dividing the ovipositions on the larger bush by six, but I imagine the matter must be much more complex.

Schröder's second example is not more convincing, in my opinion, though Semon regards it as one of the most important pieces of evidence. It concerns a leaf-rolling moth, *Gracilaria stigmatella*, the larva of which is said normally to make its house by bending over the tips of the willow leaves on which it feeds. Schröder placed larvae on leaves from which the tips had been cut, and these larvae made their houses by rolling over the sides of the leaves. Their offspring were again fed on leaves without tips, and as before, they rolled in the leaf-margins either on one side or both. The offspring of this second generation were then fed on entire leaves. There were 19 houses made by these (?19) larvae, and of them 15 were normal, made by folding down the tips of the leaves, while 4 were abnormal, made by rolling in the leaf-margins. Schröder says that in nature he has only twice seen abnormal houses; but it is clearly essential not only that the frequency of such variability in nature should be thoroughly examined, but also that we should know whether when the species

difference of even three weeks in time of harvesting may easily be due to variation in the season. It would in any case be difficult to analyse the meteorological conditions, and to decide how much effect in postponing or accelerating the harvest might be due to cold days, to cloudy days, to wet weather, to fluctuations in average temperature, to hot days, and other such incidents occurring at the different periods of growth, even if they were specially watched while the experiments were in progress, and at this distance of time such analysis is practically impossible. Without careful simultaneous control-experiments this evidence is almost worthless. The director of the Meteorological Office⁷ has, however, kindly sent me some details of the weather at Breslau from 1857 to 1860, and I notice that as a matter of fact July, 1859, was an exceptionally hot month, having an average of 2.67° C. above the mean for the twenty years 1848-1867. June in that year was slightly (0.31° C.) below the mean and May slightly above it (0.18° C.). August was also abnormally hot, 2.35° C. above the average. The Breslau wheat was sown on May 19 and harvested on August 6. There was a cold spell from May 11 to 14, which this wheat escaped, as it was sown on May 19. In the other years the cold spell came much later. These elements of the weather may possibly have done something to hurry the ripening in 1859. It is unfortunate that we are not told how long similar wheat from Breslau seed took to ripen in that year.

As regards the Norway cultivations we have the average monthly temperatures recorded by Schübeler, though he does not discuss them in connection with this special problem. It is quite clear that 1857, in which the period was 103 days, was an exceptionally cold summer, especially as regards the months of June and July, but though there was, so far as the temperature

⁷ I am obliged to him and to Dr. E. Gold for much trouble taken to answer my questions. Some idea of the kind of weather indicated by an average of 2.76° C. above the mean may be got from a comparison with the year 1911, which most people will remember as one of the hottest summers they have known. The July of that year was in east and southeast England about 4° F. above the mean but 2.67° C. means about 4.8° F. above the mean. At Greenwich July, 1859, was about 6.5° F. above the average.

records go, no great difference between 1858 and 1859, the year 1859, in which the period of ripening was the shortest, was somewhat colder in Norway than 1858. But we have the further difficulty that there were ten days difference in sowing, for in 1858 the sowing was made on May 14, and in 1859 on May 24. With all these possibilities uncontrolled, and indeed unconsidered, I am surprised that Semon should claim these experiments as one of the chief supports for his views.

Schübeler's other allegations respecting the influence of climate on plants grown in various places and especially at different elevations in Norway have been destructively criticised by Wille⁸ to whose paper readers interested in the subject should refer.

Before the appearance of Wille's criticisms Wettstein⁹ made a favourable reference to Schübeler's work, accepting his conclusion. He states also that he has himself made analogous experiments with flax, finding that the length of the period of development and a series of morphological characters show an adaptation to local conditions, and that on transference of seed to other conditions the previous effects are maintained. No details, however, are given, and I do not know if anything more on the subject has appeared since. The other examples cited by Wettstein, such as the observations of Cieslar on forest-trees and those of Jakowatz on gentians seem to me open to all the usual objections applicable to evidence of this kind. Such work, to be of any value for the purpose to which it is applied, must be preceded by a study of the normal heredity and of the variations of the species.

Most of the recent writers (Semon, Prizbram, etc.) on the inheritance of acquired characters accept the story of Brown-Séguard's guinea pigs, which are said to have inherited a liability to peculiar epileptiform attacks induced in their parents by various nervous lesions.

The question has been often debated and several observers have repeated the experiments with varying results, some failing

⁸ Wille, N., *Biol. Cbltt.*, XXV, 1905, p. 521.

⁹ Wettstein, R. von, *Der Neo-marckismus u. seine Beziehungen zum Darwinismus*, Jena, 1903.

that the loss of toes in the offspring may have been due to mutilation by the mother, following his experience in a case in which the tails of mice in succeeding litters were thus devoured, and there can be little doubt that in this suggestion lies the clue to the explanation of the whole mystery. Graham Brown concludes that it may be supposed with every degree of probability that the "transmission" was due to injuries inflicted upon the young by their parents. With this conclusion most people will now be disposed to agree, and we may hope that we shall hear the last of this curious myth — to the elucidation of which a vast quantity of research has been devoted.

The series of experiments made by Kammerer with various Amphibia have attracted much attention and have been acclaimed by Semon and other believers in the transmission of acquired characters as giving proof of the truth of their views. With respect to these observations the chief comment to be made is that they are as yet unconfirmed. Many of the results that are described, it is scarcely necessary to say, will strike most readers as very improbable; but coming from a man of Dr. Kammerer's wide experience, and accepted as they are by Dr. Prizbram, under whose auspices the work was done in the Biologische Versuchsanstalt at Vienna, the published accounts are worthy of the most respectful attention.

The evidence relates chiefly to three distinct groups of occurrences:

1. Modification in *Alytes obstetricans*, the Midwife Toad, affecting both the structure and the mode of reproduction, induced by compulsory change of habits.

2. Modification in the mode of reproduction of *Salamandra atra* and *maculosa* induced by compulsory change of habits.

3. Modification in the colour of *Salamandra maculosa* induced by change in the colour of the soil on which the animals were kept.

1. I will take first the case of *Alytes*,¹² because it is the most

¹² Kammerer's chief paper on this subject is in *Arch. f. Entom.*, 1909, XXVIII, p. 447, and it is to this that the paginal references in the present text relate. His previous paper appeared *ibid.*, 1906, XXII, p. 48. An account of his further experiments with *Alytes* is given in *Natur*, 1909-10, Heft 6, p. 95.

to confirm Brown-Séguard, others finding evidence which in various degrees supported his conclusions. Recently a new and especially valuable paper has been published by Mr. T. Graham Brown¹⁰ which goes far towards settling this outstanding question. He states that "the Brown-Séguard phenomenon is nothing more or less than a specific instance of the scratch-reflex," and it is due to a raised excitability of the mechanism of this reflex. This raised excitability is the character acquired as a consequence, for instance, of the removal of part of one great sciatic nerve. The nature of this raised excitability and its causation are discussed and elucidated, but this part of the work is not essential to the present consideration. Mr. Graham Brown in his summary of conclusions remarks that it is very difficult to see how this condition of raised excitability can be transmitted to the offspring, and this comment which might be made in reference to any of the alleged cases certainly applies with special cogency to the present example.

He then calls special attention to three observations:

1. That guinea pigs which had a "trophic" change in the foot, as a result of division of the great sciatic nerve, have repeatedly been seen to nibble the feet of other guinea pigs which had this change in the foot from the same causes.

2. That accidental injury to the toes may be followed by the Brown-Séguard phenomenon in an otherwise normal animal.

3. That in several instances the young of guinea pigs which exhibited the phenomenon have been noticed to have one or more toes eaten off by the mother.

Brown-Séguard noticed that almost all his animals in which the great sciatic was divided acquired the "epilepsy" and nibbled those parts of their feet in which sensation had been lost. Of the offspring of such animals he found that a very small proportion exhibited a malformation of the feet, and of these some showed the "epilepsy." The proportion which showed the "epilepsy" was one to two per cent. of the offspring.

Morgan¹¹ is quoted by Graham Brown as having suggested

¹⁰ T. Graham Brown, *Proc. Roy. Soc.*, 1912, vol. 84, B, p. 555. This paper gives full reference to the previous literature of the subject.

¹¹ Morgan, T. H., *Evolution and Adaptation*, New York, 1903.

definite example, and because it is the case which most readily admits of repetition and verification.

The habits of *Alytes obstetricans* are well known. The animals copulate on land. As the strings of eggs leave the female they are entangled by the hind legs of the male, and being adhesive they stick to him and undergo their development attached to his back and legs. The number of eggs varies from 18 to 86, a number much smaller than is usual in toads and frogs which lay their eggs in water. The eggs are large and full of yolk.

There are two breeding seasons, one about April and the other about September, and a winter hibernation. Not only animals brought in from outside, but their offspring reared in domestication maintain these normal habits in confinement, if the temperature does not exceed 17° C. (pp. 499 and 534).

If, however, the temperature be artificially raised and kept at 25-30° C., the males do not attach the eggs to themselves when spawning occurs on land but let them lie. The adhesion of the eggs is said to be hindered by the comparatively rapid drying of their surfaces.

More usually in the high temperatures the animals *take to the water* and copulate there. The eggs are ejected into the water, and as their gelatinous coverings immediately swell up, they do not stick to the males.

The offspring thus derived from the parents subjected to heat for one breeding-period only, whether they were laid in water or on land, did not show departures from the normal type.

Kammerer states next, however, that in subsequent breeding-periods the same parents frequently take to the water to breed, though they have become quite accustomed to the heated chamber; and furthermore that if such animals, having thus lost their instinct to brood their young, be transferred to ordinary temperatures they do not readily reassume their normal habits, but for several breeding seasons — at least four — will take to the water. These parents lay from 90 to 115 eggs, which are small and contain little yolk, and the larvae, on hatching, breathe with their embryonic gills until they are absorbed instead of being broken off as normally.

The offspring thus abnormally developed when they mature are said never to brood their eggs. If they are derived from the earlier spawnings of their parents, before, that is to say, the parents had been submitted to the changed conditions long enough to transmit their effects, they lay on land; but if they are derived from the later spawnings, they lay in the water. These changes of habit are manifested without the continued application of the abnormal experimental conditions, and, as I understand the account, in normal conditions of temperature.

If the abnormal experimental conditions are continued, the toads always lay in water, and their eggs become progressively smaller and more numerous. The larvae in the fourth generation acquire three pairs of gills instead of one pair, and are in other respects also different from the normal form.

Respecting the *Alytes* bred in this way Kammerer makes the very striking statement that the males in the third generation (p. 535) have roughened swellings on their thumbs and that in the fourth generation (pp. 516 and 535) these swellings develop black pigment. Together with the appearance of this secondary sexual character there is hypertrophy of the muscles of the fore-arm. To my mind this is the critical observation. If it can be substantiated it would go far towards proving Kammerer's case. *Alytes*, among toads and frogs, is peculiar in that the males do not develop these lumps in the breeding season, and the fact may no doubt be taken to be correlated with the breeding habits, copulation occurring on land and not in water as is usual with Batrachians. It is to be expressly noticed that these lumps on the thumbs or arms of male toads and frogs are not merely pigmented swellings, but are pads bearing numerous minute horny black spines, which are used in holding the females in the water. The figures which Kammerer gives (Taf. XVI, figs. 26 and 26a) are quite inadequate, and as they merely indicate a dark patch on the thumbs it is not possible to form any opinion as to the nature of the structure they represent.

The systematists who have made a special study of Batrachia appear to be agreed that *Alytes* in nature does not have these structures; and when individuals possessing them can be pro-

subsequent publication.¹⁵ This later paper goes somewhat fully into the question of the difference in behaviour between the normal and modified individuals, describing the ways in which the males and females possessing the acquired character could be recognised from the males and females which were normal, but in this account I find no reference to the development of the "Brunfischwielen" — the horny pads on the hands of the males. As these structures would be of special value in such a diagnosis the omission of any allusion to them calls for explanation. Kammerer claims the evidence as proof of Mendelian segregation in regard to an acquired character, the first example recorded. Pending a repetition of the experiments there is no more to be said.

2. *The Mode of Reproduction of Salamandra atra and maculosa.*¹⁶ — *Salamandra maculosa*, the common lowland form, with yellow bands or spots, deposits its young in water, generally as gill-bearing tadpoles, with a wide, swimming tail, though occasionally they are born still enclosed in the egg-capsule out of which they soon hatch. Spawning extends over a considerable period, often many weeks, and during the season one female may bear more than 50 young.

S. atra, the black Alpine form, produces its young on land. They are born without gills, ready to breathe air, and with the rounded tail of the adult. These differences may, as Kammerer says, naturally be regarded as adaptations to the Alpine conditions. Moreover, the female bears only two young in a season, and this reduction in the number must be taken to be a consequence or condition of viviparity. There are many eggs in the ovary, but all except the two which are destined to develop degenerate and form a yolk-material on which these two survivors feed.

Kammerer gives a long account of the various conditions to which he subjected both species. The treatment was complicated

¹⁵ *Festschrift zum Andenken an Gregor Mendel*, being vol. XLIX of the *Verh. Naturf. Ver. in Brünn*, 1911, p. 98.

¹⁶ Kammerer's chief papers on this subject are *Archiv für Entom.*, XVII, 1904, and *ibid.*, XXV, 1907. An epitome of results is also given by him in *12 Flugschrift d. Deutsch. Ges. f. Züchtungskunde*, Berlin, 1910.

duced for inspection it will, I think be time to examine the evidence for the inheritance of acquired characters more seriously. I wrote to Dr. Kammerer in July, 1910, asking him for the loan of such a specimen¹³ and on visiting the Biologische Versuchsanstalt in September of the same year I made the same request, but hitherto none has been produced. In matters of this kind much generally depends on interpretations made at the time of observation; here, however, is an example which could readily be attested by preserved material. I notice with some surprise that in a later publication on the same subject no reference to the development of these structures is made (see below).

The statements here given represent but a small part of Kammerer's papers on the subject. He gives much further information as to the course of the experiments, especially in regard to the fate of the eggs laid on land and the aberrations induced in them by treatment. The ramifications of the experiments are, however, very difficult to follow, and as I am not sure that I have always understood them I must refer the reader to the original.

More recently Kammerer has published¹⁴ a most curious account of experiments in crossing his modified and abnormal *Alytes*, derived from the water-eggs, with normal individuals.

In the first case the cross was made between a normal female and an abnormal male. The offspring were normal in their habits. In the next generation bred from these almost exactly a quarter showed the abnormal instinct.

The reciprocal cross was made between an abnormal female and a normal male. In this case the offspring were abnormal in their behaviour; but the second generation bred from them showed three quarters abnormal and one quarter normal.

Certain details as to numbers and sexes of the various families bred in the course of this amazing experiment are given in a

¹³ In reply to my letter Dr. Kammerer who was then away from home very kindly replied that he was not quite sure whether he had killed specimens of *Alytes* with "Brunfischwielen" or whether he only had living males of the fourth generation, but that he would send illustrative material.

¹⁴ Kammerer, P., *Natur*, 12 December, 1909, Heft 6, p. 95, repeated in *12 Flugschrift d. Deutsch. Ges. f. Züchtungskunde*, Berlin, 1910.

in many ways, but the essential statements are, as regards *S. maculosa*, that when no water was provided in which the young might be born, they were dropped on land, larger and in a later stage of development and of a darker colour than is normal; that the larvae so born gradually diminished in number until only two were deposited in each breeding-period; that dissection showed that the other ova degenerated to form a yolk-material. The larvae so produced reached maturity. The summary of results describes their behaviour, stating that they produced:

(a) *In water*, either (1) very advanced, large-headed larvae 45 mm. long (instead of 25–30 mm.) with gills already reduced, which had awkward, embryo-like movements, and in some few days metamorphosed into small perfect salamanders; or (2) moderately advanced, properly proportioned larvae, 40–41 mm. long, provided with large gills of (at first) intrauterine character, which were reduced during aquatic life.

(b) *On land*, small (26 mm. long) larvae with rudimentary gills, having the body rounded instead of being flattened from above downwards, and an elongated narrow head, which were unable to live in deep water. These larvae changed to the salamander colour in 10–12 days, and after four weeks metamorphosed into salamanders 29 mm. long.

(c) In the foregoing cases the experimental conditions were not continued, or in other words, basins of water were provided in which they could spawn. But if the experimental conditions are continued, these *Salamandra maculosa* which were born newt-like (viz., not in a larval condition), are themselves newt-bearing from the first time they give birth, using the dry land, and bringing forth only two young, the normal number for the births of *S. atra*. These young are 40–41 mm. long, and are dark-coloured, resembling greatly the normal new-born *S. atra*.

This epitome of the observations illustrating the inheritance of acquired characters has been very widely quoted, and may not unnaturally be taken to summarize a wide experience of the modified animals. Reference to the details given in the same paper shows that, as alleged, each of the four types of behaviour enumerated was witnessed *once* only in the case of each

of four females, no two agreeing with each other. As to the number of the males or their habits nothing is said. The first female, *a* (1), bore five young; the second, *a* (2), bore two, of which one was a partial albino; the third, *b*, produced four young; and the fourth, *c*, two as already stated.

In the case of *c* the details show that the female gave birth immediately after being transferred from the open-air terrarium to one indoors, which contained no basin of water. This is the example of the consequences which follow on a continuance of the experimental conditions.¹⁷

As regards *S. atra* the converse is reported. Various means were used to induce them to eject their young prematurely in water, such as massaging the sides of the mothers, or raising the temperature to 25° or 30° C., with various degrees of success. But afterwards it was found that specimens collected wild at an elevation of about 1,000 metres responded to much simpler treatment, and gave birth prematurely in water when they were kept in a large shallow basin of water not so deep but that they could everywhere touch the bottom with their feet and keep their heads above the surface. With specimens collected at higher elevations this treatment was inoperative, and the suggestion is made that *S. atra* at the lower confines of its habitat partakes more of the nature of *maculosa* than do the individuals from greater heights; for Kammerer argues that pools suitable for breeding must be more uncommon at those elevations than they are lower down.

In the earlier paper¹⁸ Kammerer states that newly caught females of *S. atra* often give birth in the water, and show an undoubted preference for doing so. He describes also how he once saw several females, wild in their natural habitat, lay their young in a rain-puddle at 1,800 metres elevation, but the larvae thus born were fully formed.

When the deposition of the young as larvae has become

¹⁷ "Bei Fortdauer der Versuchsbedingungen sind als Vollmilche geborene Salamandra maculosa gleich bei der ersten Geburt abermals voll molchgebärend, benutzen zum Geburtsakt das trockene Land, und zwar unter Erreichung der (bei Salamandra atra normalen) Embryonen-Zweizahl," Kammerer, 1907, p. 49.

¹⁸ 1904, p. 56.

3. *Modification of the Colour of Salamandra maculosa induced by Change in the Colour of the Soil on which the Animals were kept.*—Kammerer speaks of this as the most convincing of all his experiments on the transmission of acquired characters. So far, however, no full account of them has been published.²¹ The statement is that when salamanders are kept in yellow surroundings the yellow markings gradually in the course of years increase in amount relatively to the black ground colour. Conversely by keeping the animals on black garden soil, the yellow may be greatly diminished in quantity until it largely disappears. (The account in *Natur* adds that very moist conditions also favour the increase of yellow, and that with less moist conditions the yellow diminishes.) From each kind, the (induced) yellower and the (induced) blacker, a second generation was raised, on soil of neutral colour, and each family was later divided into two parts, half being put on black and half on yellow ground.

As regards the offspring of those which had lived on black soil no positive result had been reached up to the date of publication, but it is stated that these young resembled their parents in having the yellow distributed in *irregular spots*.

As regards the offspring of those which had lived on yellow soil the account follows up the story of that part of the offspring which were put on yellow soil again. It is stated that these, though derived from parents with irregular spots, developed the yellow as *longitudinal bands*.

This account is given with slight differences of expression in the three places to which I have referred. On returning from Vienna in 1910 I consulted Mr. G. A. Boulenger in reference to the subject, and he very kindly showed me the fine series from many localities in the British Museum, and pointed out that in nature the colour-varieties can be grouped into two distinct types, descriptive of the state of the larvae, which I have not attempted to represent, but the account here given contains all that seemed essential to an understanding of the more important features of the account.

²¹ The first appeared in *Natur*, 1909-10, Heft 6, p. 94; and the second, which contains coloured plates of the animals, in the lecture already referred to, *12 Flugschr. d. Deut. Ges. f. Züchtungskunde*, Berlin, 1910, p. 26. In the paper in *Mendel Festschrift*, 1911, the subject is continued, but no more is added as to this part of the experiment.

"habitual"¹⁹ with *S. atra*, three to nine larvae may be produced at one spawning period, from 35 to 45 mm. long, with gills at most 8 mm. long, and a tail-fin 2-3 mm. broad. Such larvae are generally coffee-brown, or grey (instead of black), and show other minor differences.

The summary states that when grown to maturity they become in their turn larva-bearing, and go into the water to bring forth. Their young are more than two (3 to 5 being the numbers observed) with a length of 33-40 mm. or of 21-23 mm. at birth. They are light grey, spotted (mottled with lighter and darker colour), have relatively short gills (8 to 9 mm. at most) and a broad tail-fin (3 mm. wide). At metamorphosis they are relatively long (44 mm.) and one of them had some yellow pigment.

Here again this summary is, as a matter of fact, describing the behaviour of two mothers, of which one produced three, and the other five young.

To my mind these experiments suggest that the reproductive habits of both species, if closely observed, will be found to be subject to considerable variation, and I think it not impossible that each species is, especially in confinement, capable of being a good deal deflected from its normal behaviour. Moreover, there seems to me no great improbability in the idea that there is an interdependence between the number of young and the stage of maturity in which they are born. But, at the same time, the case as told by Kammerer strikes me as proving too much. If each species is so sensitive to conditions that the normal procedure is gravely modified in one generation, and if that modification can reappear in a pronounced form in the next generation without a renewal of the disturbing conditions, it becomes extremely difficult to understand how the regularity which each species is believed to display in nature can be maintained. Surely both species might be expected to be in confusion. From a passage in Kammerer's earlier paper (1904, p. 55) on the subject, I infer that he also would expect considerable irregularity in the natural behaviour, but that he has not investigated the point.²⁰

¹⁹ Throughout Kammerer's papers this is used almost as a technical term. It means, I presume, that the feature was manifested more than once.

²⁰ It should be stated that the papers contain a quantity of detail, especially

one in which the yellow of the body is irregularly distributed in spots and one in which this yellow is arranged for the most part in two longitudinal bands which may be continuous or interrupted. *The spotted form is, as he showed me, an eastern variety, and the striped form belongs to western Europe.* Mr. E. G. Boulenger²² has since published a careful account of the distribution of the two forms. The spotted he regards as the typical form, var. *typica*, and for the striped he uses the name var. *taeniata*. The typical form occupies eastern Europe in general, including Austria and Italy, extending as far west as parts of eastern France. The var. *taeniata* is found all over France, excepting parts of the eastern border, Belgium and western Germany, Spain and Portugal. Of the very large series examined there was only one specimen (Lausanne) which could not with confidence be referred to one or other of the two varieties. Mr. E. G. Boulenger points out that both varieties inhabit very large areas, and live on soils of most different colours and compositions. Both are liable to variations in the amount and the shade of the yellow, but that any suggestion that *taeniata* belongs especially to yellow soils and *typica* to black soils is altogether inadmissible. He expresses surprise that Kammerer should not allude to these peculiarities in the geographical distribution of the two forms. He suggests further that it is more likely that some mistake occurred in Kammerer's observations than that the east European *typica* should, in the course of a generation, have been transformed into the west European *taeniata* by the influence of yellow clay soil.

In his last paper on the subject Kammerer states incidentally²³ that he has found the *striped form recessive to the spotted*. No evidence for this statement is given, and I have not found any other reference to crosses effected between the two natural types. If, however, this representation is correct, it is conceivable that the production of *taeniata* from *typica* was in fact the re-appearance of a recessive form. The plate which Kammerer gives in illustration of his modified parent figures a single animal at four stages, and though it is certainly more like the spotted than

²² E. G. Boulenger, *Proc. Zool. Soc.*, 1911, p. 323.

²³ *Mendel Festschrift*, 1911, p. 84.

the striped form, it has a certain suggestion of the striped arrangement, such as I can well imagine being produced in the heterozygote.²⁴

In continuation²⁵ of the experiments on the colour of *S. maculosa* Kammerer publishes an account of elaborate experiments in grafting ovaries of the various forms, modified and unmodified, into each other, and describes the offspring which followed. Before pursuing this part of the inquiry I am disposed to wait until the earlier steps have been made much more secure than they yet are.

More recently Kammerer has published similar statements in regard to the inheritance of characters induced in various lizards by keeping them in abnormal temperatures, high and low. The changes induced affected in some species the colours, in others the reproductive habits. Respecting these examples I feel the same scepticism that I have indicated in regard to the others, somewhat heightened by the fact that insufficient evidence is given both regarding the behaviour of these various species in captivity when not subjected to abnormal temperatures, and in the wild state.

Respecting this part of the evidence Mr. G. A. Boulenger has lately published a criticism²⁶ from which I extract the following passages. Referring to a previous note²⁷ on the question of the melanism of the various insular forms of *Lacerta muralis* he writes: "I also alluded (*l. c.*) to the theories that have been propounded to explain the melanism of various insular forms. This is a subject which has been lately taken up by Dr. Kammerer at the Biologische Versuchsanstalt in Vienna, and he claims to have produced nigrinos artificially by a very strong elevation of the temperature, accompanied by extreme dryness. Dr. Werner²⁸ has already opposed his own experiments to those of Kammerer, artificial melanism having been produced by him in *Lacerta oxycephala* by keeping two very light specimens from

²⁴ 12 Flugschrift. Deut. Ges. Züchtungskunde, 1910, Fig. 15, P. Reihe.

²⁵ Mendel Festschrift, 1911, p. 83.

²⁶ Field, 1912, 30 March.

²⁷ Ibid., 1904, p. 863.

²⁸ Mith. Naturw. Ver. a. d. Univ. Wien, 1908, p. 53.

pads and that they could transmit these novelties to descendants raised in normal conditions. Till evidence of this kind is published by at least two independent observers investigating similar material, I find it easier to believe that mistakes of observation or of interpretation have been made than that any genuine transmission of acquired characters has been witnessed.

Meanwhile there is no denying that the origin of adaptational features is a very grave difficulty. With the lapse of time since evolutionary conceptions have become a universal subject of study that difficulty has, so far as I see, been in nowise diminished. But I find nothing in the evidence recently put forward which justifies departure from the agnostic position which most of us have felt obliged to assume.²⁹

APPENDIX TO CHAPTER IX.

Professor G. Klebs, as is well known to students of evolutionary phenomena, has for several years been engaged in investigations relating to the inheritance of acquired characters. In his many publications on the subject the issue has always been represented as more or less uncertain.

Desiring to know how the matter now stands according to Professor Klebs' present judgment I wrote to him asking him to favour me with a brief general statement. This he most kindly sent in a letter dated 8th July, 1912.

As such a statement will be read with the greatest interest by all who are watching the progress of these studies I obtained permission to publish it as follows:

8. Juli 1912

Ihre lebenswürdige Anfrage will ich sehr gern beantworten, obwohl ich sie nicht so beantworten kann wie ich erwünschte. Ihr Skeptizismus in der Frage der Uebertragung erworbener Charaktere auf die Nachkommen ist nur zu berechtigt. Meine Versuche mit Veronica sind nicht beweisend, da es mir bisher nicht gelungen ist eine einigermaße konstante Varietät mit verlaubten Infloreszenze zu erzeugen. In Bezug auf mein Semper vivum bin ich allerdings noch heute der Meinung dass

²⁹As to the experiments of Klebs relating to the transmission of acquired characters, see Appendix.

Ragusa for a whole summer in very damp conditions. Neither is Kammerer's theory in accordance with the distribution of the black lizards, as pointed out by Werner. Kammerer also finds that those forms which are known to produce melanic races in a state of nature, lend themselves more readily than the others to the success of his experiments. But he shows himself misinformed when he states that the variety called *Lacerta fumana* belongs to the category of those of which black forms are not known. He overlooks the fact, first pointed out by Scherer in 1904, and which I can confirm, that the black lizard from Mellisello near Lissa in the Adriatic is unquestionably derived from the lizard from Lissa, which he correctly regards as not separable from *L. fumana*. . . ."

"Another colour modification which Dr. Kammerer states that he obtained by raising the temperature is the assumption by the female of the typical *Lacerta muralis* of the bright red colour of the lower parts which often distinguishes the male from the female, and which was not shown by the individuals of the latter sex kept by him under normal conditions. He quotes various authorities to show that the lower parts are never red in the females, but he has omitted to consult others who say the contrary. Thus Bedriaga (1878 and 1879) remarks that a so-called var. *rubriventris* of the typical wall lizard has the lower parts red in both sexes."²⁹

In reading such papers as those of Semon or Kammerer the thought uppermost in my mind is that to multiply illustrations of supposed transmission of acquired characters is of little use until some one example has been thoroughly investigated. If we had certain assurance that even a single unimpeachable case could be repeated at will, the whole matter would assume a more serious aspect. If, for instance, Kammerer were able to show us *Alytes* males with horny pads on their hands, it would be something tangible; still more, if the experiment were repeated by others until no doubt remained that the offspring of *Alytes* which had bred in water for some three generations did acquire these

²⁹As to the variations of *Lacerta muralis* in Western Europe and North Africa see Boulenger, G. A., *Trans. Zool. Soc.*, 1905, vol. XVII, p. 351.

die starke künstliche Veränderung der Blüte einen Einfluss auf einzelnen Nachkommen gehabt hat. Ich habe seither nichts darüber veröffentlicht: die Mehrzahl der anomalen gefüllten Blüten war leider steril. Von einem weniger veränderten Exemplar erhielt ich einige Sämlinge, aber sie haben noch nicht geblüht. Es kann sich in diesem Falle nur um eine *Nachwirkung in der ersten Generation* handeln, vergleichbar jenen Fällen in denen Samen von Bäumen aus den hohen Alpen in der Ebene gewisse Nachwirkungen zeigen. Aber es ist bisher kein sicherer Fall bekannt in den der künstliche herbeigeführte Charakter mehrere Generationen hindurch unter der gewöhnlichen "normalen" Bedingungen übertragen worden ist.

Auf der andere Seite sind diese negativen Resultaten nicht entscheidend. Denn wie wenig ist in dieser Beziehung überhaupt ernstlich versucht worden! Und zweifellos geht die Sache nicht so einfach.

Ich versuche es mit anderen Pflanzen weil ich der Meinung bin dass es möglich sein müsse wenigstens solche neuen Varietäten zu erzeugen, wie sie die Gartenvarietäten entsprechen.

Aber bis jetzt leider sind die Versuche nicht gelungen, weder mir noch irgend einem anderen.

Комментарий к главе 9
книги У. Бэтсона «Проблемы генетики»

В перепечатанной главе из труда Бэтсона обсуждаются две проблемы: специфические различия и адаптация. Он считает, что отсутствие прогресса генетики в XIX веке объясняется переоценкой роли адаптации. Существовавшие в те годы обзоры, в том числе сделанные Вейсманом, свидетельствовали о том, что нет доказательств наследования приобретенных признаков.

Однако начало XX столетия, несмотря на возрождение и подтверждение идей Менделя, вновь ознаменовалось всплеском интереса к ламаркизму. Именно это вынудило Бэтсона внимательно изучить и оценить исследования наиболее последовательных адептов данного направления. Среди них он особенно выделил Р. Семона и П. Каммерера, обсуждению работ которых посвящена большая часть главы.

Вначале он сосредоточился на критике Семона, реанимировавшего представление Геринга и С. Батлера о том, что адаптация является следствием или продуктом накопленной «памяти». Бэтсон делает заключение, что попытка представить наследственность продуктом памяти вносит еще больше неясности в решение проблемы и в целом доказательства Семона и его ссылки на других авторов (Шредер и др.) не состоятельны: здесь скорее речь идет о проблеме причин изменчивости. Не принимает Бэтсон и достоверность выводов о наследственной передаче приобретенных признаков, сделанных Фишером, Штандфуссом, Пржибрамом и др.

Но самому пристальному разбору были подвергнуты эксперименты венского биолога Пауля Каммерера (1880—1926) — одного из ярких ламаркистов начала XX века. Чтобы перед современными исследователями лучше воссоздать ситуацию столетней давности, необходимо дать краткую характеристику дел и личности Каммерера. Он был очень колоритным человеком, с огромным лбом, выступающим волевым подбородком. В молодые годы одновременно учился зоологии в Венском университете и занимался в консерватории.

Каммерер ставил опыты в основном на амфибиях: протей, огненная саламандра, жаба-повитуха (были осуществлены также эксперименты и на ящерицах). Метод был основан на выращивании и получении новых поколений земноводных в нехарактерных для них условиях среды, например, изменении окраски субстрата, на котором содержали особей. В опытах с огненными

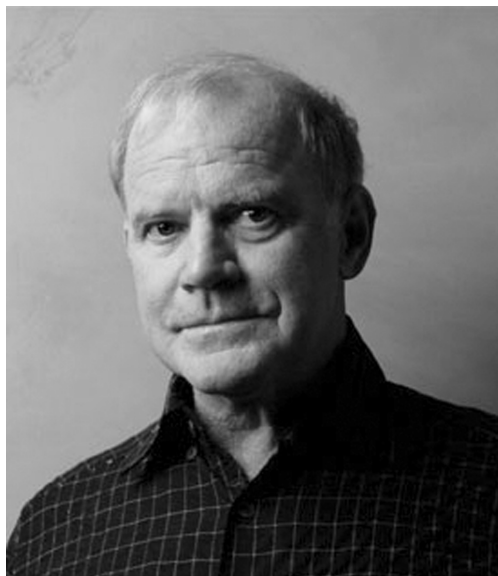
саламандрами отмечалось преобладание либо желтой, либо черной окраски в зависимости от условий содержания. В последующих поколениях констатировалось усиление эффекта. В экспериментах с *Alytes* было найдено появление в третьем поколении у самцов несвойственных им половых мозолистых бугорков, в четвертом поколении — их пигментация. Все результаты активно публиковались и демонстрировались посетителям венской лаборатории.

Революционному порыву масс в советской России крайне импонировала доктрина любого рукотворного воздействия на внешнюю среду: идеи омоложения, бессмертия витали в воздухе. Булгаков не случайно столь колоритно описал обстановку того времени в «Роковых яйцах» и «Собачем сердце». Жесткий математический детерминизм менделевских законов сдерживал полет фантазии российских читателей Ламарка. Поэтому стальная воля Каммерера в отстаивании ламаркизма пришлась ко двору — он стал профессором Московского университета, ему прочили место в Коммунистической академии. Были переведены на русский язык его книги: «Омолаживание и долговечность» (1922), «Смерть и бессмертие» (1925) и др. Однако после очередной разгромной публикации, на этот раз в журнале «Nature» (1926), где он был уличен в фальсификации, ученый покончил жизнь самоубийством.

В лице Бэтсона Каммерер имел очень стойкого оппонента, который исследовал и комментировал его результаты в научной печати, запрашивал у своего венского коллеги (в соответствии с традициями ученых того времени) экспериментальные образцы для проверочных опытов, но не получал ответа. В главе 9 рассмотрено несколько работ Каммерера разных лет (в основном 1909—1910 гг.) с подробным объективным анализом. На этом основании Бэтсон делает заключение: «...Опыты Каммерера с разными земноводными (в частности, с жабой-повитухой и саламандрой) привлекают много внимания, но до сих пор их не удалось повторить...».

В целом приведенная глава четко показывает, как аргументированно английский исследователь отстаивает позиции генетики, видя отсутствие доказательств у сторонников учения Ламарка. Об этом очень хорошо сказал Н.И. Вавилов: «Великолепная глава. Эта глава — лучший обзор критики доказательств в пользу наследования приобретенных признаков» (это ремарка Николая Ивановича на полях собственной книги «Problems of genetics», о чем уже сообщалось нами в публикации 2007 года).

К 30-летию изобретения полимеразной цепной реакции



В 1983 году американский биохимик Кэри Муллис, работавший в компании «Цетус», изобрел метод, позволяющий многократно увеличивать количество ДНК-материала в биологических пробах за счет так называемой полимеразной цепной реакции (ПЦР). Новый метод позволил амплифицировать ДНК в ходе многократных последовательных удвоений исходной молекулы ДНК с помощью ДНК-полимеразы.

Идея метода полимеразной цепной реакции в общих чертах была сформулирована Кэри Муллисом в 1983 году. Суть заключалась в обеспечении взаимодействия четырех компонентов:

- сегмент двойной спирали ДНК (матричная, или темплатная ДНК, предназначенная для копирования);
- два олигонуклеотидных праймера (короткие отрезки односпиральной ДНК, каждый из которых комплементарен одной из коротких последовательностей матричной ДНК);
- нуклеотиды;
- ДНК-полимераза.

Чередую процессы нагревания и охлаждения этой смеси, достигается цель многократного умножения матричной ДНК (за 30 циклов в течение нескольких минут производится более миллиарда копий исходной последовательности ДНК). Это давало возможность за несколько часов нарабатывать из следов генетического материала в микрограммах приемлемые для последующих исследований количества.

В 1984 году К. Муллис доложил о своем изобретении на семинаре компании «Цетус», а статьи об этом

были напечатаны в «Science» (1985) и «Nature» (1986). Сразу же метод ПЦР стал быстро распространяться в практике и приобрел большую популярность.

Публикация в «Science» 1985 года была предварительной в плане описания метода ПЦР: оно дано кратко, основной акцент делался на диагностические возможности серповидной анемии. А вот в статье 1986 года метод ПЦР представлен в деталях: Mullis K., Faloona F., Scharf S., Horn G., and Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction // Cold Spring Harbor Symposium in Quantitative Biology. — 1986. — Vol. 51. — P. 263–273.

В 1986 году метод ПЦР был существенно улучшен за счет использования ДНК-полимеразы из термофильных бактерий (известно, что обычная ДНК-полимераза инактивируется в ходе многократных циклов нагревания-охлаждения). Наиболее распространена Taq-полимераза, изготовленная из бактерий *Thermus aquaticus*. К числу недостатков этого фермента относится вероятность внесения ошибочного нуклеотида.

Метод ПЦР получил широкое распространение в биологической и медицинской практике: для диагностики заболеваний, для клонирования и выделения новых генов и др. Метод ПЦР был запатентован компанией «Цетус.» Срок действия патента истек в 2005 году. Изобретатель метода Кэри Муллис в 1993 году был удостоен Нобелевской премии «за вклад в развитие методов химии на основе ДНК — за изобретение метода полимеразной цепной реакции» (половинная премия вместе с канадским биохимиком Майклом Смитом).

Кэри Муллис родился 28 декабря 1944 года в г. Ленуар (Северная Каролина, США). Учился в Технологическом институте (штат Джорджия), степень доктора философии (биохимия) получил в Калифорнийском университете (Беркли) в 1972 г. Работал физиологом в Канзасском университете, с 1977 по 1979 гг. занимался фармацевтической химией в Калифорнийском университете (Сан-Франциско). В 1979 году начал работать биохимиком в компании «Цетус» в Эмервилле (Калифорния). Здесь он занимался синтезом олигонуклеотидов, что привело его к созданию метода ПЦР.

После разработки своего метода К. Муллис был приглашен на работу в ряд ведущих компаний. Присуждение Нобелевской премии еще более утвердило его авторитет и признание.

Кэри Муллис — человек разносторонних интересов. В 1998 году он опубликовал автобиографию «Танец без покровов в поле разума» (Mullis K. Dancing Naked in the Mind Field. — Pantheon Books, New York,

1998). Ему принадлежит ряд неожиданных суждений, например, об отсутствии доказательств связи ВИЧ со СПИДом.

Более подробно о методе ПЦР см. статью профессора А.В. Чемериса и др. в нашем журнале: Чемерис А.В., Магданов Э.Г., Гарафутдинов Р.Р., Вахитов В.В. Как исключить появление ложно-положительных результатов при проведении полимеразной цепной реакции? // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2012. — Т. 8. — № 3. — С. 34–45.

К 10-летию полной расшифровки генома человека

2013 год обозначает еще одну дату — 10-летие полной расшифровки структуры генома человека. Недавно отмечалось 10-летие расшифровки чернового варианта генома человека, осуществленного в 2001 году. К этой дате на сайте «Nature» был подготовлен специальный тематический выпуск «The human genome at 10». Но вот прошло еще два года, и опять открывается возможность ретроспективного взгляда на истекшее 10-летие.

Известно, что первые исследования по декодированию генома человека в рамках одноименного международного проекта начались в 1995 году. Промежуточный результат в виде чернового варианта был достигнут к 2001 году, и в торжественной обстановке об этом было заявлено в США в присутствии президента США Била Клинтона и премьер-министра Великобритании Тони Блера. И вот через два года, в апреле 2003 года была обнародована весть о полной расшифровке генома человека — на этот раз в присутствии президента Джорджа Буша младшего и лидеров еще пяти стран (Великобритании, Германии, Китая, Франции, Японии). На реализацию проекта «Геном человека» было истрачено 300 млн. долларов.

С тех пор неоднократно сообщалось об уточнениях структуры человеческого генома. В мае 2006 года было объявлено о другом этапе на пути к завершению проекта — публикации в журнале «Nature» последовательности последней хромосомы 1. Еще одна важная веха — в 2007 году напечатали полную расшифровку генома человека. При этом сообщалось о стоимости процедуры — около 1 млн. долларов.

Сейчас благодаря методическому прогрессу стоимость секвенирования существенно снизилась — она составляет 50000 долларов. Прогнозируется через определенное время сумма порядка 1000 \$.

К настоящему времени сообщено о выполнении определения полного генома у разных этнических групп, включая палеогеном так называемого «денисовского человека» (останки из алтайской пещеры). Был в том числе исследован геном первооткрывателя структуры ДНК — Джеймса Уотсона. Это был подарок 79-летнему ученому от фирм, занимающихся расшифровкой генома человека — 454 Life Sciences и BSM Human Genome Sequencing Center. Расшифровка генома Уотсона длилась 2 месяца и стоила 2 млн. долларов. Вообще период 2007–2012 гг. был временем интенсивного накопления данных по геномике человека, главным образом по этногеномике и других аспектам.

Еще в 2003 году директор Национального института исследований генома человека Национального института здоровья США Фрэнсис Коллинс сказал, что на основе анализа полной нуклеотидной последовательности ДНК можно будет оказывать персонализированную, профилактическую помощь с оценкой индивидуальных рисков. То есть, речь идет о медицине будущего, или медицине P4 (predictive, preventive, personalized, participatory), создателем которой является американский биолог Лерой Худ, автор метода автоматического секвенирования геномов. Сейчас, через 10 лет уже часть таких планов начала реализовываться.

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, резюме на русском и английском языках; 3) остальные материалы (письма в редакцию, хроникальные сообщения, рецензии и т.д.) представляются в произвольной форме.
4. Требования к оформлению содержания рукописи (таблицы, графики, формулы, фотографии, рисунки и др.). Рисунки прилагаются отдельно к тексту рукописи в бумажном и электронном виде в формате TIF или JPEG. Таблицы помещаются по ходу текста или прилагаются отдельно. Порядок оформления иллюстративного и иного дополнительного (пояснений, примечаний, благодарностей и т.д.) материала к текстам обычный.
5. Требования к цитированной литературе: Список литературы оформляется или в алфавитном порядке (вначале — литература на русском языке, затем — на иностранных), или по порядку упоминания и ссылок в тексте при использовании цифр. В последнем случае номер цитированного источника берется в тексте в квадратные скобки. Оформление отдельного источника литературы осуществляется в соответствии с общепринятыми

для научных изданий библиографическими требованиями, включая международные установки (Index Medicus и др.).

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



Подписано к печати 30.09.13
Формат 60/90¹/₈. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 6,0. Тираж 1000 экз.

ООО «Издательство «БИОСФЕРА»
109147 Москва, ул. Марксистская, 20, стр. 8
Тел.: +7 (495) 763-18-41; E-mail: biosphere@biorosinfo.ru

ОБЩЕСТВО БИОТЕХНОЛОГОВ РОССИИ ИМ. Ю.А. ОВЧИННИКОВА

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

Главными целями деятельности ОБР являются:

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

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

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

ОБР имеет отделения в 57 регионах России и объединяет свыше 3000 членов.

ОБР является членом Европейской федерации биотехнологии.

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

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

Членство в ОБР является бесплатным для физических лиц.

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

Тел.: +7 (495) 648-09-13

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