

**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

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

К читателям. *Р.Г. Васильев* 4

Оригинальные статьи

Йодсодержащие натуральные биологически активные добавки на основе жиров из гидробионтов.
М.С. Петрова, Н.П. Боева 5

Изучение эффективности использования фильтратов нативных культур в глубинном культивировании штамма *Bacillus anthracis* СТИ-1.
В.В. Фокина, А.С. Кучеренко, А.Н. Шевцов, С.А. Швецов, И.Н. Седельников, С.Г. Исупов 11

Получение энергетического сырья с помощью аэробной переработки растительной биомассы отселекционированными дрожжами.
К.В. Горин, Е.Г. Борисенко 15

Применение метода масс-спектропии с индуктивно связанной аргонной плазмой для определения элементного состава биомассы штаммов лекарственных растений.
Л.И. Слепая, И.Е. Каухова, Н.С. Пивоварова, О.Н. Громова, М.В. Яковлева, И.И. Шантырь, М.А. Власенко 21

Оптимизация технологии очистки сточных вод с применением биопрепарата «Универсал».
М.Ю. Маркарова, Т.Н. Щемелинина, Д.В. Тарабукин, Е.М. Анчугова 28

Использование биопрепарата «Байкал ЭМ-1» для биоконверсии соломы яровой мягкой пшеницы.
В.Н. Дедков, И.А. Гнеушева, Н.Е. Павловская 33

Обзоры

Микроводоросли как потенциальный источник сырья для производства биоэтанола.
Э.Б. Намсараев, К.В. Горин, П.М. Готовцев, А.В. Комова, М.А. Ломоносова, В.В. Бутылин, А.А. Шаповалова, Р.Г. Васильев 38

Живые организмы как основа биотопливных элементов.
А.Н. Решетилов, В.К. Утешев, Т.А. Решетилова, Р.Г. Васильев 43

Максимальная эффективность конверсии солнечной энергии в биотопливо и пути ее повышения.
А.В. Комова, Э.Б. Намсараев, П.М. Готовцев, К.В. Горин, Г.У. Бадранова, Р.Г. Васильев 48

Электрохимическая импедансная спектроскопия в применении к исследованиям микробных биотопливных элементов.
А.Н. Решетилов, В.В. Емец, А.Н. Клюев, Т.А. Решетилова, Р.Г. Васильев 52

Математическое моделирование внутриклеточных процессов.
П.М. Готовцев, Э.Б. Намсараев, К.В. Горин, А.В. Комова, В.В. Бутылин, Г.У. Бадранова, М.А. Ломоносова 59

Страницы истории

К 10-летию основания Общества биотехнологов России имени Ю.А. Овчинникова 72

Хроника

Некролог. Памяти Фредерика Сенгера (1918–2013) 75

Правила для авторов 78

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. *R.G. Vasilov* 4

Original articles

- Iodized natural biologically active additives on the basis of oil from hydrobionts.
M.S. Petrova, N.P. Boeva 5
- Study of the efficiency of using filtrates of native cultures in a deep-laid cultivation of the strain *Bacillus anthracis* STI-1.
V.V. Fokina, A.S. Kucherenko, A.N. Shevtsov, S.A. Shvetsov, I.N. Sedelnikov, S.G. Isupov 11
- Preparation of energy raw materials using aerobic treatment of the plant biomass by means of selectioned yeast.
K.V. Gorin, E.G. Borisenko 15
- Application of mass spectrometry with inductively coupled argon plasma to determine the elemental composition of biomass strains of medicinal plants.
L.I. Slepyan, I.E. Kaukhova, N.S. Pivovarova, O.N. Gromova, M.V. Yakovleva, I.I. Shantir, M.A. Vlasenko 21
- Optimization of wastewater treatment technologies using biological product «Universal».
M.Y. Markarova, T.N. Schemelinina, D.V. Tarabukin, E.M. Anchugova 28
- Using biological product «Baikal EM-1» for the bioconversion of spring wheat straw.
V.N. Dedkov, I.A. Gneusheva, N.E. Pavlovskaya 33

Reviews

- The potential of microalgae as a source of raw materials for bioethanol production.
Z.B. Namsaraev, K.V. Gorin, P.M. Gotovtsev, A.V. Komova, M.A. Lomonosova, V.V. Butylin, A.A. Shapovalova, R.G. Vasilov 38
- Living organisms as the basis elements of biofuel.
A.N. Reshetilov, V.K. Uteshev, T.A. Reshetilova, R.G. Vasilov 43
- Maximal efficiency and the ways to increase solar energy conversion in biofuel.
A.V. Komova, Z.B. Namsaraev, P.M. Gotovtsev, K.V. Gorin, G.U. Badranova, R.G. Vasilov 48
- Electrochemical impedance spectroscopy applied to research of microbial fuel cells.
A.N. Reshetilov, V.V. Emets, A.N. Klyuev, T.A. Reshetilova, R.G. Vasilov 52
- Mathematical modeling of intracellular processes.
P.M. Gotovtsev, Z.B. Namsaraev, K.V. Gorin, A.V. Komova, V.V. Butylin, H.W. Badranova, M.A. Lomonosova 59

Pages of history

On the 10th anniversary of the Yu.A. Ovchinnikov Russian biotechnology society 72

The chronicle

Obituary. Frederick Sanger (1918–2013): in memoriam 75

Rules for authors 78

К читателям

В четвертом номере нашего журнала за 2013 год основная подборка работ посвящена проблемам биоэнергетики и сопредельной тематики. Эти исследования выполнены главным образом на базе НТК биоэнергетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт».

Профессор А.Н. Решетиллов с коллегами представили две статьи, в которых они рассматривают общие потенциальные возможности живых систем при создании биотопливных элементов, а также делают обзор с использованием собственных исследований по электрохимической импедансной спектроскопии применительно к задачам всестороннего изучения микробных биотопливных элементов.

В работе Э.Б. Намсараева и др. проведен анализ микроводорослей как возможного источника сырья для производства биоэтанола с рассмотрением механизмов автоферментации и гетероферментации. В исследовании А.В. Комовой с соавторами обсуждены вопросы о возможностях повышения эффективности конверсии солнечной энергии в биотопливо.

В статье К.В. Горина и Е.Г. Борисенко приводятся результаты исследования штамма специально отобранных дрожжей, выделенных из молока, для аэробной переработки растительной биомассы с конечной целью получения энергетического сырья.

В обстоятельном обзоре П.М. Готовцева с соавторами освещены актуальные вопросы математического моделирования внутриклеточных процессов, в том числе изучения основ компартиментализации и моделирования метаболических потоков при их следовании по метаболическим путям. Это — специальный раздел метабономики, который в настоящее время усиленно разрабатывается в различных научных группах.

Среди остального блока печатаемых работ нужно отметить статью М.С. Петровой и Н.П. Боевой из ВНИРО (Москва), в которой сообщается о разработке оригинальных технологий получения биологически активных добавок к пище на основе жиров гидробионтов с экстрактом морских водорослей. В.В. Фокина с коллегами из Кирова в продолжение серии публикаций, которые они периодически помещают в нашем журнале, представили результаты своих скрупулезных, высокопрофессиональных исследований по поддержанию и анализу культур возбудителя сибирской язвы — на этот раз с применением концентрированных фильтратов в глубинном культивировании. Фармацевты из Санкт-Петербурга — Л.И. Слепян и др. — делятся итогами изучения макро- и микроэлементного состава биомассы культур тканей лекарственных растений с помощью метода масс-спектропии с индуктивно связанной аргонной плазмой. М.Ю. Маркарова с соавторами (Институт биологии Коми научного центра УНЦ РАН, Сыктывкар) провели испытания образцов волокнистых материалов и модифицирующих агентов, предназначенных для иммобилизации нефтеокисляющих микроорганизмов препарата «Универсал» с целью биодеградации нефтепродуктов в сточных водах. Группа исследователей из Орла (Дедков В.Н. и др.) представили сообщение о применении биопрепарата «Байкал ЭМ-1» для биоконверсии соломы мягкой пшеницы и использования получаемого продукта в птицеводстве.

В заключение печатается некролог памяти Фредерика Сенгера, дважды лауреата Нобелевской премии по химии, скончавшегося 19 ноября с.г. в возрасте 95 лет. Ему была дарована долгая жизнь, в течение которой он достиг беспрецедентных результатов в постижении тайн химического строения биомолекул. Это был человек, личная скромность которого не давала повода к его подлинной общественной оценке и всенародному прославлению как выдающегося исследователя XX века. В узкокорпоративной профессиональной среде, безусловно, его имя всегда было окружено должным почтением.

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

ЙОДСОДЕРЖАЩИЕ НАТУРАЛЬНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ДОБАВКИ НА ОСНОВЕ ЖИРОВ ИЗ ГИДРОБИОНТОВ

М.С. ПЕТРОВА*, Н.П. БОЕВА

ФГУП «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии», Москва

Разработаны технологии получения биологически активных добавок к пище на основе жиров гидробионтов с экстрактом морских водорослей, которые содержат полиненасыщенные жирные кислоты омега-3, витамины А и Д, йод. Исследованы жирнокислотный состав данных биологически активных добавок, показатели их качества и безопасности, содержание йода, витаминов А и Д.

Ключевые слова: пищевой рыбный жир, пищевой тюлений жир, биологически активные добавки, полиненасыщенные жирные кислоты, морские водоросли.

Введение

В России от недостатка йода в организме страдают около 70% населения. Фактическое потребление йода жителями России составляет от 40–60 мкг йода в день, что является недостаточным.

Эксперты Всемирной организации здравоохранения установили и разработали рекомендуемые нормы ежедневного потребления йода: детям — 100 мкг, подросткам и взрослым — 150 мкг, беременным и кормящим женщинам — 200 мкг.

При недостатке йода в организме происходит сбой в работе важного органа, отвечающего за здоровье организма, — щитовидной железы. Недостаток йода приводит к нарушению синтеза гормонов щитовидной железы — тироксина и трийодтиронина и развитию таких заболеваний, как глухота, нарушение обмена веществ, замедление роста, понижение гемоглобина в крови, психические расстройства, заболевания печени и иных важных органов.

Морские водоросли — естественные концентраты минеральных элементов, таких как йод, калий, натрий, магний и др.; они являются наиболее «урожайными» растениями на земле, запасы которых в Мировом

океане исчисляются сотнями миллионов тонн. Йод, находящийся в водорослях, улучшает биосинтез белка, усвоение фосфора, кальция и железа, активизирует ряд ферментов.

Морская ламинария (*Laminaria japonica*) характеризуется наличием в ней органических соединений йода, содержание которого варьирует от 0,1 до 0,7% на сухое вещество. В слоевище растения содержатся (% массы сухой водоросли): полисахариды — альгиновая кислота до 27 и маннит до 21, минеральные вещества — от 30 до 44 (йод, калий, натрий, магний, бром, железо, марганец, соединения серы, фосфора и др.). Кроме того, ламинария содержит витамины В₁, В₂, В₁₂, А, С, Д, Е [6, 8].

В спирулине (*Spirulina platensis*) содержатся в оптимальных соотношениях важнейшие витамины: А, В₁, В₂, В₃, В₁₂, РР, С, Е, биотин и фолиевая кислота, макро- и микроэлементы: кальций, магний, фосфор, йод, цинк, медь, железо и др.

В разработанных на основе жиров гидробионтов биологически активных добавках, кроме йода и других микроэлементов, содержатся полиненасыщенные жирные кислоты омега-3, жирорастворимые витамины А и Д [1–4, 7].

Физиологическая активность жиров из гидробионтов определяется наличием в них полиненасыщенных жирных кислот омега-3, которые входят в состав многих структур тканей и участвуют в образовании клеточных мембран и соединительной ткани, способствуют нормализации жирового обмена, снижению уровня холестерина в крови, что положительно влияет на лечение гипертонии, атеросклероза, ишемической болезни сердца и других сердечно-сосудистых заболеваний.

© 2013 г. Петрова М.С., Боева Н.П.

* **Автор для переписки:**

Петрова Маргарита Сергеевна

к.т.н., старший научный сотрудник лаборатории технологии переработки водных биоресурсов ФГУП «ВНИРО»

107140 Москва, Верхняя Красносельская, 17

Тел.: +7(499) 264-90-76

E-mail: bav@vniro.ru

Материалы и методы

В качестве сырья и сопутствующих материалов для проведения исследований использовали пищевой рыбный жир из печени тресковых видов рыб, выделенный методом вытапливания при температуре 60–65 °С; пищевой тюлений жир, выделенный низкотемпературным способом; сушеные морские водоросли: *Laminaria japonica*, *Spirulina platensis*; этиловый спирт ректификат 96%.

Показатели качества: кислотное и перекисное числа определяли по ГОСТ 7635-85 «Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Методы анализа». Состав жирных кислот определяли на хроматографе «Shimadzu GC-9A» на капиллярной колонке с внутренним диаметром 0,25 мм, длиной 25 м и нанесенной фазой FFAР с предварительным метилированием липидов по методике ВНИРО.

Показатели безопасности определяли по ГОСТ 30178-96 «Сырье и продукты пищевые. Метод определения токсичных элементов». Определение хлорорганических пестицидов проводили с использованием газового хроматографа, модель HRGC-412 с детектором электронного захвата и кварцевой капиллярной колонки SE-54 длиной 25 м, с внутренним диаметром 0,32 мм и толщиной неподвижной фазы 0,25 мкм.

Результаты и обсуждение

Во ВНИРО в последние годы для профилактики заболеваний, связанных с дефицитом йода и других микроэлементов, которыми богаты морские водоросли, разработаны биологически активные добавки к пище: «Биафишенол с морскими водорослями» из пищевого рыбного жира с экстрактом ламинарии и спирулины и «Тюленол с морскими водорослями» из пищевого тюленьего жира с добавлением экстракта из ламинарии и спирулины [5].

Технология получения биологически активных добавок состояла из трех этапов:

- получение и очистка от примесей пищевого рыбного жира из печени тресковых видов рыб и пищевого тюленьего жира из подкожного сала тюленей;
- получение спиртового экстракта морских водорослей (ламинарии и спирулины);
- смешивание жира из гидробионтов с экстрактом морских водорослей.

Печень тресковых рыб является ценным и перспективным сырьем для производства пищевого рыбного жира и биологически активных добавок, поэтому нами

были изучены общий химический состав (табл. 1), биологическая ценность и показатели качества и безопасности некоторых тресковых видов рыб.

Таблица 1

Общий химический состав печени тресковых видов рыб

| Наименование объекта | Содержание в печени, % | | | |
|----------------------|------------------------|---------|----------|---------|
| | Влага | Белок | Липиды | Зола |
| Минтай | 31,3±0,5 | 9,5±0,3 | 58,1±0,5 | 1,1±0,1 |
| Треска | 29,6±0,5 | 8,1±0,3 | 61,3±0,5 | 1,0±0,1 |
| Макрурус | 30,8±0,5 | 9,4±0,3 | 58,7±0,5 | 1,1±0,1 |

Анализируя данные таблицы 1, можно отметить высокое содержание жира в исследуемых образцах печени тресковых рыб от 58 до 61%.

Изучение жирнокислотного состава показало, что в печени тресковых рыб отмечено высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) до 34,5%, в том числе до 23% биологически активных ПНЖК омега-3.

В таблице 2 представлены данные о содержании витаминов А и Д в печени рыб. Отмечается высокое содержание витамина А — от 900 до 2500 МЕ/г и витамина Д — до 700 МЕ/г, что делает их особенно ценными при получении пищевого рыбного жира.

Таблица 2

Содержание витаминов А и Д в липидах печени рыб, МЕ/г

| Печень | Витамин А | Витамин Д |
|----------|-----------|-----------|
| Минтай | 2400 | 175 |
| Треска | 900 | 100 |
| Макрурус | 1100 | 700 |

Наряду с изучением биологической ценности липидов печени рыб были исследованы показатели их качества и безопасности, микробиологические показатели, которые соответствовали Единым санитарно-эпидемиологическим и гигиеническим требованиям к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю).

На основании результатов проведенных исследований составов печени тресковых рыб можно сделать вывод, что печень вышеперечисленных объектов целесо-

образно направлять на изготовление пищевого рыбного жира и биологически активных добавок.

Получение пищевого рыбного жира из тресковых видов рыб проводили тепловым способом. Для этого размороженную на воздухе до температуры минус $2 \div 0$ °С, печень измельчали до размера $3 \div 5$ мм. Вытапливание жира проводили глухим паром при температуре $60-65$ °С в течение $30-50$ мин. при непрерывном перемешивании.

Для получения пищевого тюленевого жира из покровного сала тюленей был изучен химический состав сала тюленей, который характеризуется высоким содержанием — до 90% — липидов. Фракционный состав липидов подкожного сала представлен до 88% триглицеридами, до 2,6% — фосфолипидами, до 1,4% — диглицеридами и прочими минорными фракциями.

Биологическая ценность липидов покровного сала тюленей определяется наличием в них биологически активных жирных кислот: ПНЖК омега-3 до 30%, в том числе биологически активных ПНЖК докозагексаеновой и эйкозапентаеновой до 19%, витамина F — до 7% .

По показателям качества безопасности и по микробиологическим показателям липиды покровного сала тюленей соответствовали Единым санитарно-эпидемиологическим и гигиеническим требованиям к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю).

На основании результатов проведенных исследований липидов подкожного сала тюленей можно сделать вывод, что подкожное сало тюленей — перспективное сырье для получения пищевого жира и биологически активных добавок.

Низкотемпературный способ получения пищевого жира из покровного сала тюленей включал в себя следующие рациональные технологические параметры: измельчение подкожного сала до размера частиц $2 \div 3$ мм при температуре минус $10 \div 5$ °С, центрифугирование при 3000 об./мин. в течение 25 минут.

Полученные пищевые жиры-полуфабрикаты из гидробионтов при необходимости подвергали дальнейшей дополнительной дообработке: сепарированию, дезодорированию, рафинации, осветлению и пр.

Получение спиртового экстракта морских водорослей включало в себя следующие технологические стадии (рис. 1):

1. *Смешивание и измельчение морских водорослей.* Ламинарию и спирулину смешивали в соотношении 1:1 и измельчали на гомогенизаторе.

2. *Экстракция водорослей этиловым спиртом.* Экстракцию проводили при соотношении 1 часть смеси водорослей и 4 части этилового спирта.

3. *Перемешивание смеси.* Проводили при температуре 60 °С с помощью механической мешалки в течение $1-2$ часов.

4. *Настаивание спиртового экстракта с водорослями.* Настаивание проводили в течение двух недель.

5. *Фильтрация.* Фильтрацию экстрагированных компонентов из водорослей в спиртовом растворе проводили через рамный фильтр.

6. *Промывка осадка.* Осадок — смесь водорослей сливали на фильтр и промывали небольшим количеством этилового спирта в ту же самую емкость, где находилась основная этиловая вытяжка морских водорослей.

7. *Выпаривание экстрактов морских водорослей.* Проводили на выпарной установке до получения 30% концентрации морских водорослей и 70% этилового спирта.

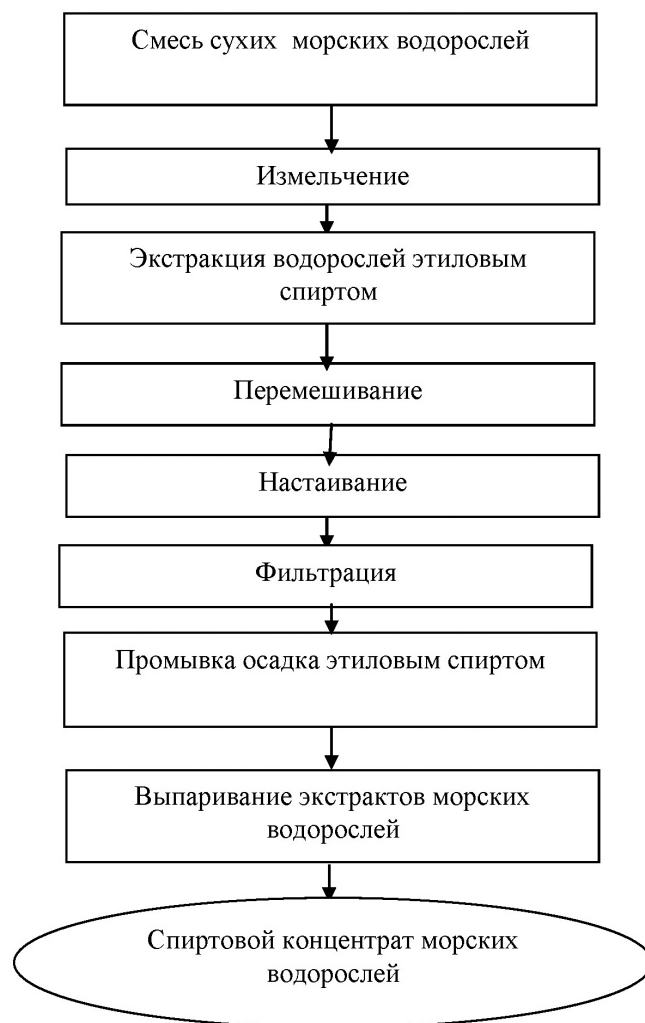


Рис. 1. Технологическая схема получения спиртового экстракта морских водорослей

Затем полученный концентрат морских водорослей смешивали с рыбным или тюленьим жиром в соотношении 1:10. Полученная смесь представляет собой концентрат морских водорослей в жире гидробионтов.

Концентрат морских водорослей в жире добавляется в пищевой рыбный или тюлений жир в соотношении 1:2 и тщательно перемешивается.

Полученный продукт, состоящий из жира гидробионтов и экстракта морских водорослей, является био-

логически активной добавкой, которую направляют на капсулирование, упаковывание и маркирование.

Разработанные биологически активные добавки были охарактеризованы по содержанию полиненасыщенных жирных кислот омега-3, жирорастворимых витаминов А, Д, содержанию йода, показателям качества и безопасности.

С целью изучения биологической ценности полученных биологически активных добавок был определен их жирнокислотный состав (табл. 3).

Таблица 3

Жирнокислотный состав биологически активных добавок, % от суммы жирных кислот

| Кислоты (код) | БАД «Биафишенол с морскими водорослями» из жира печени тресковых рыб с экстрактом морских водорослей | БАД «Тюленол с морскими водорослями» из тюленьего жира с экстрактом морских водорослей |
|---|--|--|
| 14:0 | 4,17 | 4,52 |
| 14:1 | 0,10 | 1,04 |
| 16:0 | 12,01 | 7,55 |
| 16:1 ω7 | 14,13 | 24,85 |
| 16:2 ω7 | 0,47 | 0,51 |
| 16:3 ω4 | 2,04 | 1,07 |
| 18:0 | 2,43 | 3,80 |
| 18:1 ω9 | 25,41 | 23,01 |
| 18:2 ω6 | 2,72 | 3,05 |
| 18:3 ω3 | 1,32 | 1,95 |
| 18:4 ω3 | 0,25 | 0,30 |
| 20:1 ω9 | 3,75 | 2,01 |
| 20:4 ω6 | 0,75 | 0,37 |
| 20:5 ω3 | 10,35 | 8,57 |
| 22:1 ω11 | 1,85 | 1,05 |
| 22:2 ω6 | 0,52 | 0,12 |
| 22:4 ω3 | 0,45 | 0,36 |
| 22:5 ω3 | 2,53 | 6,03 |
| 22:6 ω3 | 14,45 | 10,62 |
| 24:1 | 0,30 | 0,26 |
| Сумма насыщенных жирных кислот | 18,61 | 15,87 |
| Сумма мононенасыщенных жирных кислот | 45,54 | 51,18 |
| Сумма полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) | 35,85 | 32,95 |
| Сумма ω3 ПНЖК 20:5 ω3 и 22:6 ω3 | 24,80 | 19,19 |

При изучении состава и количественного содержания жирных кислот липидов полученных биологически активных добавок выявлено, что в составе жирных кислот отмечается повышенное содержание суммы ПНЖК, которое колеблется от 33 до 36% от общей суммы кислот, причем на сумму биологически активных ПНЖК омега-3 приходится до 25%.

Результаты анализов по содержанию в биологически активных добавках йода, витаминов А и Д показали, что содержание йода варьирует от 35 до 50 мкг/г, витамина А – от 0,07 до 0,2 мг/г, витамина Д – от 2,0 до 2,3 мкг/г.

Показатели качества и безопасности биологически активных добавок представлены в таблицах 4 и 5.

Полученные данные по всем требованиям соответствовали Единым санитарно-эпидемиологическим и гигиеническим требованиям к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю) (Единым требованиям).

В соответствии с рекомендуемыми Минздравом России уровнями потребления пищевых и биологически активных веществ (по МР 2.3.1.1915-04) были проведены расчеты.

Таблица 4

Показатели качества биологически активных добавок

| Наименование показателя | БАД «Биафишенол с морскими водорослями» из жира печени тресковых рыб с экстрактом морских водорослей | БАД «Тюленол с морскими водорослями» из тюленьего жира с экстрактом морских водорослей | ПДК по Единым требованиям |
|--|--|--|---------------------------|
| Перекисное число, ммоль O ₂ /кг | 3,1 | 2,7 | 10,0 |
| Кислотное число, мг КОН/г | 1,8 | 1,1 | 4,0 |

Таблица 5

Данные показателей безопасности биологически активных добавок

| Наименование определяемого показателя | ПДК по Единым требованиям | БАД «Биафишенол с морскими водорослями» из жира печени тресковых рыб с экстрактом морских водорослей | БАД «Тюленол с морскими водорослями» из тюленьего жира с экстрактом морских водорослей |
|---------------------------------------|---------------------------|--|--|
| Токсичные элементы, мг/кг, не более | | | |
| Кадмий | 0,2 | 0,01 | 0,005 |
| Свинец | 1,0 | 0,04 | 0,3181 |
| Ртуть | 0,3 | 0,01 | 0,007 |
| Токсичные соединения, мг/кг, не более | | | |
| ГХЦГ | 0,1 | 0,03 | 0,07 |
| ДДТ и метаболиты | 0,2 | 0,0000<10мкг | 0,0000<10мкг |
| Радионуклиды, Бк/кг, не более | | | |
| Цезий-137 | 130 | н/о | н/о |
| Стронций-90 | 100 | н/о | н/о |

Биологически активные добавки, приготовленные из жиров гидробионтов с морскими водорослями, выпускают в капсулах по 0,3 г; при употреблении в день 12–15 капсул они обеспечивают суточную норму йода на 64%, полиненасыщенных жирных кислот омега-3 – на 60%, витамина А – на 48%, витамина Д – на 48%.

Заключение

Для профилактики заболеваний, связанных с дефицитом йода, во ВНИРО разработаны и утверждены Роспотребнадзором с получением Санитарно-эпидемиологического заключения на нормативно-техническую документацию и Свидетельства о государственной регистрации следующие биологически активные добавки к пище: «Биафишенол с морскими водорослями» из пищевого рыбного жира с экстрактом ламинарии и спирулины и «Тюленол с морскими водорослями» из пищевого тюленьего жира с добавлением экстракта из ламинарии и спирулины.

Полученные биологически активные добавки характеризуются высоким содержанием биологически активных ПНЖК омега-3 до 25%, йода – до 50 мкг/г, витамина А – до 0,2 мг/г и витамина Д – до 2,3 мкг/г.

Благодаря включению в свой рацион биологически активных добавок на основе жиров гидробионтов с добавлением экстрактов из морских водорослей в сочетании с такими продуктами питания, как рыба, морская

капуста, молоко, яйца, овощи, человечество может избежать дефицита йода, который в сочетании с другими микроэлементами играет важную роль в нормальном функционировании организма человека.

Литература

1. Боева Н.П., Сергиенко Е.В., Бредихина О.В., Баскакова Ю.А. Печень атлантических макрурусов – сырье для производства пищевого рыбного жира // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2013. – Т. 9. – № 1. – С. 14–19.
2. Воскресенский Н.А., Лагунов Л.Л. Технология рыбных продуктов. – М.: Пищевая промышленность, 1968. – 422 с.
3. Кизеветтер И.В. и др. Технология обработки водного сырья. – М.: Пищевая промышленность, 1976. – 695 с.
4. Левачев М.М. Жиры рыб в диетотерапии гиперлипотедемий и гипертонии. – М.: ВНИИМИ, 1988. – 85 с.
5. Петрова М.С. Обоснование и разработка технологии биологически активной добавки к пище «Лецитин в тюленьем жире». Автореферат. – М.: Изд-во ВНИРО, 2009. – 24 с.
6. Подкорытова А.В. Морские водоросли-макрофиты и травы. – М.: Изд-во ВНИРО, 2005. – 175 с.
7. Ржавская Ф.М. Жиры рыб и морских млекопитающих. – М.: Пищевая промышленность, 1976. – 470 с.
8. Справочник по химическому составу и технологическим свойствам водорослей, беспозвоночных и морских млекопитающих / Под ред. В.П. Быкова. – М.: Изд-во ВНИРО, 1999. – 262 с.

IODIZED NATURAL BIOLOGICALLY ACTIVE ADDITIVES ON THE BASIS OF OIL FROM HYDROBIONTS

M.S. PETROVA, N.P. BOEVA

All-Russian Research Institute of Fisheries and Oceanography, Moscow

It was developed a technology for production of biologically active food additives on the basis of the oil of hydrobionts with seaweed extract, which contain polyunsaturated fatty acids omega-3, vitamins A and D, iodine. Fatty acid composition of these biologically active additives, their quality and safety, content of iodine, vitamin A and D were investigated.

Keywords: food fish oil, food seal oil, biologically active additives, polyunsaturated fatty acids, seaweed.

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ФИЛЬТРАТОВ НАТИВНЫХ КУЛЬТУР В ГЛУБИННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ШТАММА BACILLUS ANTHRACIS СТИ-1

В.В. ФОКИНА*, А.С. КУЧЕРЕНКО, А.Н. ШЕВЦОВ, С.А. ШВЕЦОВ,
И.Н. СЕДЕЛЬНИКОВ, С.Г. ИСУПОВ

Научно-исследовательский центр Федерального государственного казенного учреждения
«33 Центральный научно-исследовательский испытательный институт»
Министерства обороны Российской Федерации, Киров

Показана возможность применения концентрированных фильтратов в культивировании штамма *Bacillus anthracis* СТИ-1 в шуттель-аппарате. Дана сравнительная характеристика нативных культур, приготовленных с применением нескольких фильтратов, в разное время развития культуры.

Ключевые слова: фильтрат культуральной жидкости, глубинное культивирование, *Bacillus anthracis*, шуттель-аппарат, жидкая питательная среда.

Введение

Поиск факторов, способствующих увеличению концентрации вегетативных клеток и спор в глубинном культивировании сибиреязвенных бактерий, имеет большое практическое значение. Значительное увеличение концентрации спор сибиреязвенного микроба обеспечит снижение экономических затрат при производстве био-препаратов на основе вакцинных штаммов *B. anthracis*.

Бактерии рода *Bacillus* отличаются способностью к синтезу как антибиотиков, токсинов, протеаз, амилаз, аминокислот, так и других биологически активных веществ, в том числе метаболитов, которые выделяются из клеток в культуральную среду. Так, в фильтратах культуральной жидкости *Bacillus subtilis* была обнаружена щелочная протеиназа, необходимая для активации спорогенеза [8, 9, 11].

Фильтраты культуральной жидкости, содержащие различные растворимые вещества, используются для приготовления лечебных препаратов [1], белково-витаминных кормов [5].

Известно, что применение культуральной жидкости в глубинном культивировании лактобактерий, бифи-

добактерий, *Bacillus subtilis* [7], *Escherichia coli* М-17 [3] оказывает стимулирующее действие на рост и развитие микробных клеток, проявляющееся в увеличении биомассы. При этом отмечен несколько больший стимулирующий эффект фильтрата культуральной жидкости в отличие от нефильтрованной культуральной жидкости и «пасты» клеток [7].

Кроме того, культуральные жидкости *Bifidobacterium longum*, *Streptococcus faecalis* проявляют как десмутагенные, так и биоантимутагенные свойства, что позволило создать на их основе эффективные пробиотики [2, 6].

Биологически активные метаболиты образуются в процессе роста клеток бактерий в питательных средах и накапливаются в культуральной жидкости. Максимальное накопление этих веществ имеет место в логарифмической и стационарной фазах роста культуры микроорганизмов [6, 7].

Цель работы — оценить возможность использования концентрированных фильтратов культуральной жидкости сибиреязвенного микроба в глубинном культивировании штамма *Bacillus anthracis* СТИ-1 для увеличения концентрации клеток и спор.

Материалы и методы

В работе использовали вакцинный штамм *Bacillus anthracis* СТИ-1.

Для выращивания сибиреязвенного микроба использовали жидкую питательную среду на основе 1%-

ного солянокислотного гидролизата рыбной кормовой муки, в которую вводили: $3,6 \text{ г} \cdot \text{дм}^{-3}$ глюкозы, $0,6 \text{ г} \cdot \text{дм}^{-3}$ хлористого кальция, $0,15 \text{ г} \cdot \text{дм}^{-3}$ сернокислого марганца.

Приготовление концентрированного фильтрата культуральной жидкости (КФКЖ) осуществляли при глубинном выращивании штамма *B. anthracis* СТИ-1 в ферментере Биор-0,1, при температуре культивирования — $33 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Из аппарата с выращиваемой культурой отбирали пробы через каждые 2 часа роста. Измеряли оптическую плотность проб на фотоэлектроколориметре КФК-2 для установления фазы роста культуры. Рост и физиологическое состояние культуры клеток оценивали по осмооптическому эффекту [4, 10]. Культуральную жидкость отбирали из ферментера по 2 дм^3 и фильтровали через стерильные мембранные модули на основе полипропилена с диаметром пор $0,2 \text{ мкм}$. Полученный фильтрат концентрировали в 10 раз на установке, оснащенной модулями на основе нитратцеллюлозы с номинальной отсечкой по молекулярной массе 20 кДа .

Каждый КФКЖ контролировали на наличие бактериальных клеток высевом КФКЖ в бульон Хоттингера и в тиогликолевую среду. Посевы инкубировали в термостате при температуре $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Наличие роста бактерий определяли визуально при микроскопии мазков, окрашенных по Граму, в бульоне Хоттингера через сутки роста, а в тиогликолевой среде — через 7 и 14 суток.

Определение стимулирующего эффекта КФКЖ на увеличение концентрации спор в нативной культуре проводили по ранее разработанной нами методике. В опытных вариантах приготовленные КФКЖ вводили в культуральную жидкость сибиреязвенного микроба в количестве $0,3 \text{ см}^3$. В контрольные колбы вместо КФКЖ добавляли по $0,3 \text{ см}^3$ питательной среды. Культивирование осуществляли в шуттель-аппарате в стеклянных колбах объемом 250 см^3 с 30 см^3 жидкой питательной среды при температуре $33 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 34–40 часов. Пробы отбирали каждые 4 часа по 2 см^3 и оценивали концентрацию жизнеспособных клеток и устанавливали фазу роста культуры сибиреязвенного микроба. Полноту спорообразования определяли в мазках, окрашенных по Цию — Нильсену. Общую концентрацию спор определяли по счету в камере Горяева, биологическую концентрацию — «чашечным методом», отсутствие посторонних микроорганизмов — в мазках, окрашенных по Граму. При наличии в культуре 90% свободно расположенных нормально окрашенных спор процесс считали завершенным.

Действие КФКЖ определяли по отношению количества вегетативных клеток и спор штамма *B.*

anthracis СТИ-1 в 1 см^3 культуральной жидкости, после введения КФКЖ к количеству вегетативных клеток или спор штамма *B. anthracis* СТИ-1 в 1 см^3 культуральной жидкости контрольной пробы и выражали в процентах.

Для сравнения стимулирующего действия КФКЖ штамм *B. anthracis* СТИ-1 выращивали в жидких питательных средах на основе 1%-ного солянокислотного и панкреатического гидролизата рыбной кормовой муки.

Результаты и обсуждение

Изучение динамики роста культуры *B. anthracis* СТИ-1 позволило выделить фазы ее развития при глубинном культивировании (рис. 1).

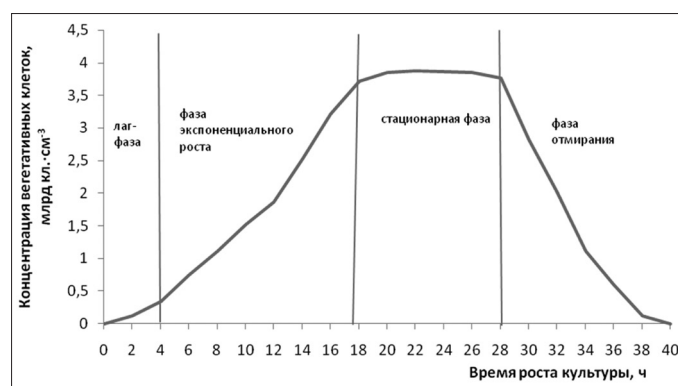


Рис. 1. Динамика роста культуры *B. anthracis* СТИ-1 в жидкой питательной среде

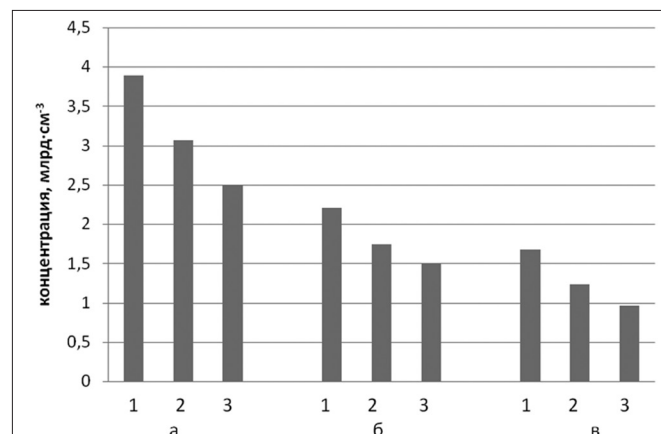


Рис. 2. Влияние на биомассу клеток (а), общую (б) и биологическую (в) концентрации спор концентрированного фильтрата 12-часовой культуры штамма *B. anthracis* СТИ-1 (1), фильтрата 12-часовой культуры штамма *B. anthracis* СТИ-1 (2); концентрация клеток/спор в контроле (3)

Изучение культуральной жидкости *B. anthracis* СТИ-1 (рис. 2) показало, что клетки, выращенные в жидкой питательной среде на основе 1%-ного соляно-

кислотного гидролизата рыбной кормовой муки, выделяли регуляторный комплекс метаболитов, который оказывал влияние на фазовое состояние популяции клеток, увеличение концентрации вегетативных клеток и спор. Концентрированный фильтрат культуральной жидкости обладал большим стимулирующим эффектом по сравнению с неконцентрированным фильтратом (см. рис. 2). Биологически активные метаболиты клеток *B. anthracis* СТИ-1, присутствующие в культуральной жидкости, оказывают стимулирующее действие на рост вегетативных клеток бактерий, на накопление биомассы и, в конечном итоге, на увеличение количества формируемых ими спор.

На предварительном этапе исследований было изучено, на какой стадии роста культуры штамма *B. anthracis* СТИ-1 и в какое время введения КФКЖ обладал наибольшим биологическим эффектом. В первом варианте вводили КФКЖ 12-часовой культуры, во втором — 24-часовой и в третьем варианте использовали КФКЖ, полученный из культуральной жидкости, отобранной по окончании культивирования. КФКЖ вносили в следующие часы роста культуры: засев микроорганизмов в питательную среду (τ_1), логарифмическая фаза (τ_2) — 8 час. роста, стационарная фаза роста культуры при появлении единичных спор (τ_3).

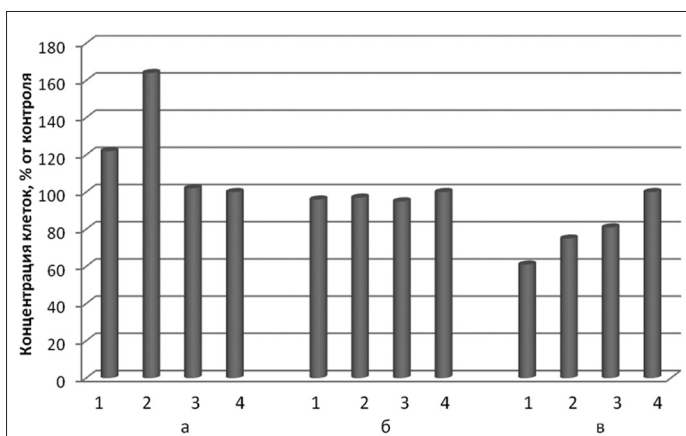


Рис. 3. Влияние КФКЖ 12-часовой культуры (а), 24-часовой культуры (б) и культуральной жидкости, отобранной по окончании культивирования (в), на концентрацию вегетативных клеток штамма *B. anthracis* СТИ-1. (1) — введение КФКЖ в τ_1 , (2) — введение КФКЖ в τ_2 , (3) — введение КФКЖ в τ_3 , (4) — контроль

Результаты эксперимента показали (рис. 3), что положительным воздействием обладали метаболиты и ферменты, накапливающиеся в экспоненциальной фазе развития культуры в жидкой питательной среде на основе

1%-ного солянокислотного гидролизата рыбной кормовой муки и введенные дополнительно в популяцию клеток сибиреязвенного микроба, находящуюся в логарифмической фазе роста. При этом увеличение общей концентрации клеток произошло в среднем на 68% по сравнению с контролем. Введение культуральной жидкости, отобранной по окончании культивирования, оказало угнетающее действие на вегетативные клетки сибиреязвенного микроба. Это объясняется, по-видимому, накоплением токсичных продуктов обмена в культуральной жидкости и выделением ферментов, вызывающих лизис вегетативных клеток. По нашему мнению, КФКЖ 24-часовой культуры по воздействию на концентрацию клеток занимает промежуточное положение. Стационарная фаза роста характеризуется сбалансированным (уравновешенным) размножением и отмиранием (под действием продуктов обмена) бактерий. Вследствие этого в каждую единицу времени в культуральной жидкости имеется определенное количество метаболитов как стимулирующих развитие, так и оказывающих лизирующее действие на клетки. Поскольку формирование преспор и единичных спор происходит в стационарной фазе, введение фильтратов культуральной жидкости в этот период не оказывает стимулирующего влияния на микробную популяцию.

Аналогичный эффект был нами получен при изучении влияния КФКЖ на рост штамма *B. anthracis* СТИ-1 при выращивании в жидкой питательной среде на основе панкреатического гидролизата рыбной кормовой муки (рис. 4).

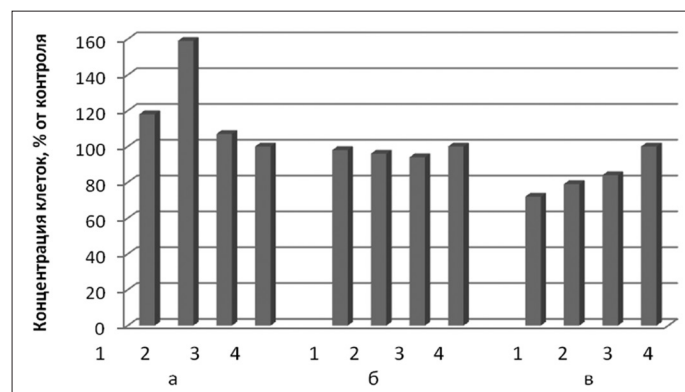


Рис. 4. Влияние концентрированного фильтрата культуральной жидкости 12-часовой культуры (а), 24-часовой культуры (б) и культуральной жидкости, отобранной по окончании культивирования (в), на концентрацию вегетативных клеток штамма *B. anthracis* СТИ-1 в жидкой питательной среде на основе панкреатического гидролизата рыбной кормовой муки. (1) — введение КФКЖ в τ_1 , (2) — введение КФКЖ в τ_2 , (3) — введение КФКЖ в τ_3 , (4) — контроль

Заключение

Таким образом, в результате проведенного исследования выявлено, что при глубинном выращивании сибиреязвенных бактерий в культуральную жидкость выделяется комплекс биологически активных метаболитов с молекулярной массой от 20 кДа, способный оказывать как стимулирующее, так и ингибирующее действие на развитие микробной популяции и ее фазовые переходы. Показано, что данный эффект зависит как от времени отбора вышеуказанного комплекса из культуральной жидкости, так и от стадии развития микробной культуры, в которую он вводится. Нами установлено, что данный регуляторный комплекс метаболитов, влияющий на изменение времени фазового перехода роста культуры, накапливается в экспоненциальной фазе развития микробной популяции. Биологически активные вещества, накапливающиеся в культуральной жидкости по окончании стационарной фазы, также обладают ингибирующим действием. В дальнейших исследованиях представляется целесообразным определить компонентный состав фильтратов культуральной жидкости в зависимости от фазового состояния популяции клеток, а также выделить отдельные фракции комплекса биологически активных метаболитов и изучить их влияние на развитие популяции, включая спорообразование.

Литература

1. Брико Н.И. и др. Чувствительность бета-гемолитических стрептококков к антибиотикам и альтернативным препаратам // Антибиотики и химиотерапия. — 1998. — № 7. — С. 26–30.
2. Воробьева Л.И., Чердынцева Т.А., Абилов С.К. Биоантимутагенное действие культуральной жидкости *Streptococcus faecalis* против мутагенеза, индуцированного 2-нитрофлуореном у *Salmonella typhimurium* TA 1538 и TA 98 // Микробиология. — 1996. — Т. 65. — № 1. — С. 79–83.

3. Ладыгина А.В. Взаимодействие *Bifidobacterium bifidum* штамм 1 и *Escherichia coli* штамм М-17 в бифидоколе, изготовленном при совместном культивировании производственных штаммов: автореф. дис. ... канд. биол. наук: защищена 12.04.2009; утв. 12.04.2009. — М.: Наука, 2009. — 28 с.
4. Пат. 2037805 Российская Федерация. Способ определения содержания живых микробов в препарате / Швецов С.А.; заявитель и патентообладатель НИЦ ФБУ «33 ЦНИИ Минобороны России». № 5066427/13; заявл. 28.08.1992; опубл. 19.06.1995.
5. Пат. 291859 Российская Федерация. Способ получения белково-витаминного корма / Честнов С.Н.; заявитель и патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью «БИОПРОТЕИН». № 2007147178/13; заявл. 21.12.2007; опубл. 20.06.2010.
6. Савицкая И.С., Шигаева М.Х., Наурызбаев А.Ж. Перспективы использования культур с антимутагенной активностью для приготовления бифидобактерина // Микробиология. — 2000. — № 2. — С. 234–238.
7. Ушакова Н.А. и др. Изучение механизмов пробиотического действия штамма *Bacillus subtilis* 8130 // Прикладная биохимия и микробиология. — 2006. — Т. 42. — № 3. — С. 285–291.
8. Цаплина И.А. Биосинтез микроорганизмами нуклеаз и протеаз. — М.: Наука, 1990. — 275 с.
9. Чюрлис Т.К., Ужкуренас А.П. Химия протеолитических ферментов. — Вильнюс: Изд-во ААЭП, 1983. — 133 с.
10. Швецов С.А., Ковтун А.Л., Богатырев А.А. и др. Использование фотометрических характеристик плазмолитической реакции бактерий для экспресс-анализа функционального состояния микробов *Yersinia pestis* вакцинного штамма ЕВ / В кн.: Актуальные проблемы профилактики инфекционных заболеваний: Тез. докл. Межведомственной науч. конф. Киров, 26–28 марта 1991 г. - Киров: НИИМ, 1991. — С. 21–27.
11. Sonenshein A.L. Hoch J.A., Losick R. *Bacillus subtilis* and other Gram-positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics. — Hardcover: ASM Press, 1993. — 1020 p.

STUDY OF THE EFFICIENCY OF USING FILTRATES OF NATIVE CULTURES IN A DEEP-LAID CULTIVATION OF THE STRAIN *BACILLUS ANTHRACIS* STI-1

V.V. FOKINA, A.S. KUCHERENKO, A.N. SHEVTSOV, S.A. SHVETSOV,
I.N. SEDELNIKOV, S.G. ISUPOV

Research Center of «33 Central Research and Development Testing Institute», RF Ministry of Defense, Kirov

The possibility of applying of concentrated filtrates in the cultivation of the strain *Bacillus anthracis* STI-1 in the shüttel apparatus was shown. The comparative features of the native cultures prepared in application of several filtrates at various times of the culture progress were given.

Keywords: filtrate of the culture broth, deep-laid cultivation, *Bacillus anthracis*, shaker, liquid nutrient medium.

ПОЛУЧЕНИЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО СЫРЬЯ С ПОМОЩЬЮ АЭРОБНОЙ ПЕРЕРАБОТКИ РАСТИТЕЛЬНОЙ БИОМАССЫ ОТСЕЛЕКЦИОНИРОВАННЫМИ ДРОЖЖАМИ

К.В. ГОРИН^{1*}, Е.Г. БОРИСЕНКО²

¹ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,

² ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет пищевых производств», Москва

В работе рассмотрена селекция дрожжей из молока млекопитающих. Проведен ПЦР-анализ для идентификации выделенных штаммов дрожжей, построено филогенетическое дерево. Был получен штамм *Pichia anomala* 9a, способный активно накапливать биомассу на негидролизованном целлюлозосодержащем растительном сырье. Рассмотрена аэробная биоконверсия наиболее перспективных трудно разлагаемых субстратов. Подобраны условия, необходимые для эффективного ведения процесса биоконверсии.

Ключевые слова: дрожжи, *Pichia anomala*, селекция дрожжей, целлюлозосодержащее сырье, твердофазная ферментация, биомасса.

Введение

Во всем мире в настоящее время обозначилась тенденция к использованию возобновляемых источников сырья и энергии. В первую очередь, это связано со стремлением каждой страны обособить свою экономику и сделать ее менее зависимой от ископаемого сырья. Во-вторых, из-за постепенного истощения ископаемых природных ресурсов и накопления парниковых газов в атмосфере Земли [4, 6]. В качестве сырья для биоконверсии с помощью дрожжей могут быть использованы различные вторичные продукты, такие как солома зерновых, вторичные продукты переработки зерна, жомы, шроты и т.д. Например, в России не находят применения около 50 млн. тонн соломы. Эффективность этой биоконверсии может быть резко увеличена введением в питательные субстраты для микроорганизмов таких первичных продуктов, как зерно и зерновая мука, солод, клубни, корнеплоды, овощи, фрукты. Совершенно уникальным сырьем для этого процесса является травяная и сенная мука, количество которой в стране может составлять сотни миллионов тонн в год. В России всегда были огромные площади заросших травами нераспахиваемых земель. В

настоящее время к ним добавилась чуть ли не половина пахотных земель. Основным препятствием на пути использования целлюлозосодержащего сырья является его сложная и затратная деструкция. С помощью новых технологий эти минусы российской экономики можно превратить в плюсы. 100 млн. тонн травяной и сенной муки могут абсолютно удовлетворить потребности страны в высокоценной биомассе (до 10 млн. тонн микробной биомассы), остальное — предмет экспорта, сравнимый с нефтью и газом.

Материалы и методы

Субстраты. В качестве целлюлозосодержащих субстратов использовали пшеничную солому, сенную муку, травяную муку, пшеничные отруби. Усредненные данные по химическому составу сырья, примененного в работе, приведены в таблице 1.

Штамм. Для биоконверсии целлюлозосодержащих субстратов использовали высокопродуктивную культуру дрожжей *Pichia anomala* 9a, выделенную из женского грудного молока и способную накапливать биомассу на негидролизованном твердом растительном сырье.

Культивирование. Проведение процесса ферментации складывается из следующих этапов: твердые субстраты измельчают, взвешивают по 5 г, стерилизуют в бумажных пакетиках и вносят в стерильные одноразовые чашки Петри или стерилизуют в стеклянных чашках Петри и подсушивают. В пробирках стерилизуют по 5 см³ водо-

проводной воды. Остуженной стерильной водой делают смыв с косяка дрожжевой культуры, засевают и увлажняют материал в чашках Петри. Хорошо гомогенизируют исходный субстрат с суспензией посевной культуры. С соблюдением стерильности отбирают пробы из чашек и контролируют исходное число клеток в засеянных материалах, после чего их инкубируют от 24 до 72 часов в термостате при 30–37 °С и снова подсчитывают количество клеток в проинкубированной культуре. В качестве контрольной среды использовались пшеничные отруби.

Таблица 1

Химический состав сырья

| Сырье | Содержание, % | | | | | |
|--------------------------|---------------|---------------|-----|-----------|-------------------------------------|------|
| | Влажность | Сырой протеин | Жир | Клетчатка | Безазотистые экстрактивные вещества | Зола |
| Сено луговое | 16,3 | 9,3 | 2,6 | 25,6 | 39,7 | 6,5 |
| Солома пшеничная | 15,1 | 4,6 | 1,5 | 35,1 | 36,8 | 6,9 |
| Трава естественного луга | 68,5 | 3,7 | 1 | 9 | 15,2 | 2,6 |
| Отруби пшеничные | 13,2 | 13,6 | 3,4 | 8,2 | 50,8 | 5,0 |

Идентификация. Идентификацию дрожжей проводили методом ПЦР-анализа. Разрушение клеток в щелочном диацилсульфате натрия с использованием замораживания-оттаивания, экстракцию ДНК тиоцианатом гуанидина и очистку на «стеклянном молочке» проводили согласно общепринятым методам. Препарат геномной ДНК разбавляли водой до концентрации 10 мкг/мл и использовали для ПЦР в следующих условиях: предварительное плавление при 96 °С 10 мин., далее 35 циклов — отжиг 40 сек. при 52 °С, элонгация ДНК при 72 °С в течение 1,5 мин., плавление при 96 °С в течение 30 сек.; финальная элонгация — 10 минут при 72 с температурой 96 °С. Результаты контролировали электрофорезом в 2% агарозном геле, ампликон очищали осаждением этанолом [3]. Для ПЦР использовали праймеры ITS1 Fungal (прямой, 5'-СТТGGTCAТТТАGAGGAAGTAA [7]) и NL4 (обратный, 5'-GGTCCGTGТТТCAAGACGG [5]).

Секвенирование проводили на базе межинститутского центра коллективного пользования «Геном» при Институте молекулярной биологии РАН на капиллярном автоматическом секвенаторе ABI

PRISM 3100-Avant с праймерами NL4 и NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) [5].

Континг ДНК, соответствующий части гена 28S-субъединицы с варибельными участками D1 и D2, сравнивали с международным банком генетической информации <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Филогенетический анализ проводили при помощи программы MEGA 6.05 методом «neighbor-joining» с поправкой на возможность множественных замен по Кимура-2, доверительные значения для узлов вычисляли методом «bootstrap»-анализа с количеством повторов 1000 [3].

Результаты и обсуждение

Практически все растительные продукты на Земле обсеменены различной микрофлорой: бактериями, дрожжами, дрожжеподобными и мицелиальными грибами. Точно так же внешние покровы животных, слизистые оболочки, эпителий различных железистых органов имеют более или менее постоянную микрофлору, которая часто весьма благотворна для организма. Естественно, в секретах различных желез может быть изучен их микробный пейзаж и получены чистые культуры входящих в него микроорганизмов. В литературе очень много сведений о лактобактериях и бифидобактериях молока, в частности, женского грудного молока, и в то же время очень мало сведений о дрожжевой компоненте этих продуктов.

В настоящей работе мы сделали попытку осветить этот малоизученный вопрос. Поскольку доминирующей в молоке является бактериальная составляющая, а дрожжи, если даже они в нем встречаются, все-таки вряд ли могут конкурировать с бактериями, женское грудное молоко исследовали на разных стадиях его формирования (молозиво и стационарное молоко), а само культивирование вели как без подавления бактериальной флоры, так и при подавлении ее антибиотиком гентамицином. В таблице 2 представлены результаты этой серии экспериментов.

Из данных этой таблицы четко видно, что в изученном в качестве контроля коровьем молоке выделяемость дрожжей почти 100%-ная как на средах без антибиотика, так и в его присутствии. Что же касается женского грудного молока, то здесь ситуация значительно более сложная. На основании наших экспериментов мы достаточно обоснованно можем говорить о положительном влиянии вводимого в питательные среды гентамицина на стимулирование роста дрожжей и частоту их выделения. И совсем уже демонстративной является разница в частоте выделения дрожжей из молозива и стационарного молока.

Таблица 2

Рост дрожжей из натурального молока на пшеничных отрубях

| Источник дрожжей | Количество исследуемых образцов | Количество выросших дрожжевых культур | | | |
|-------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|------|--------------------------|-------|
| | | На отрубях с антибиотиком | | На чистых отрубях | |
| | | Положительные результаты | % | Положительные результаты | % |
| Натуральное коровье молоко | 31 | 30 | 96,7 | 29 | 93,5 |
| Женское молозиво | 43 | 3 | 6,97 | 2 | 4,65 |
| Женское грудное молоко стационарное | 32 | 25 | 78,1 | 15 | 46,87 |

Таблица 3

Продуктивность дрожжей, выделенных из женского грудного молока, на пшеничных отрубях

| № п/п | Штамм | Размеры клеток на Сабуро-агаре, мкм | Продуктивность дрожжей, $n \times 10^9$ кл/г | | |
|-------|-------|-------------------------------------|--|------|------|
| | | | 24 ч | 48 ч | 72 ч |
| 1 | P1 | (1,0–3,0) × (3,0–6,0) | 2,1 | 4,9 | 5,1 |
| 2 | A1 | (1,0–3,5) × (3,5–8,0) | 2,2 | 4,7 | 4,9 |
| 3 | I1 | (1,0–3,5) × (3,5–8,0) | 1,9 | 4,3 | 4,5 |
| 4 | A2 | (2,0–4,0) × (3,0–12,0) | 1,1 | 1,5 | 1,5 |
| 5 | T1 | (2,0–4,0) × (3,5–12,0) | 1,4 | 2,5 | 2,7 |
| 6 | L1 | (2,0–4,0) × (3,5–12,0) | 0,6 | 1,2 | 1,3 |
| 7 | N1 | (1,0–3,5) × (3,5–8,0) | 1,5 | 3,9 | 4,6 |
| 8 | 8 | (1,0–3,5) × (3,5–8,0) | 1,2 | 2,8 | 3,1 |
| 9 | 9a | (1,0–3,0) × (3,0–6,0) | 2,5 | 5,1 | 5,3 |
| 10 | 9b | (1,0–3,0) × (3,0–6,0) | 2,3 | 5,0 | 5,1 |
| 11 | 11 | (1,0–3,5) × (3,5–8,0) | 0,7 | 0,8 | 1,3 |
| 12 | 12 | (1,0–3,5) × (3,5–8,0) | 1,3 | 1,5 | 1,5 |
| 13 | 13 | (1,0–3,0) × (3,0–8,0) | 1,8 | 2,6 | 2,9 |
| 14 | 14 | (1,0–3,5) × (3,5–8,0) | 1,6 | 2,3 | 2,6 |
| 15 | 17 | (2,0–4,0) × (3,0–12,0) | 0,6 | 0,9 | 1,2 |
| 16 | 19 | (1,0–3,0) × (3,0–6,0) | 1,0 | 2,7 | 3,0 |
| 17 | 25 | (1,0–3,0) × (3,0–6,0) | 1,1 | 2,0 | 2,5 |

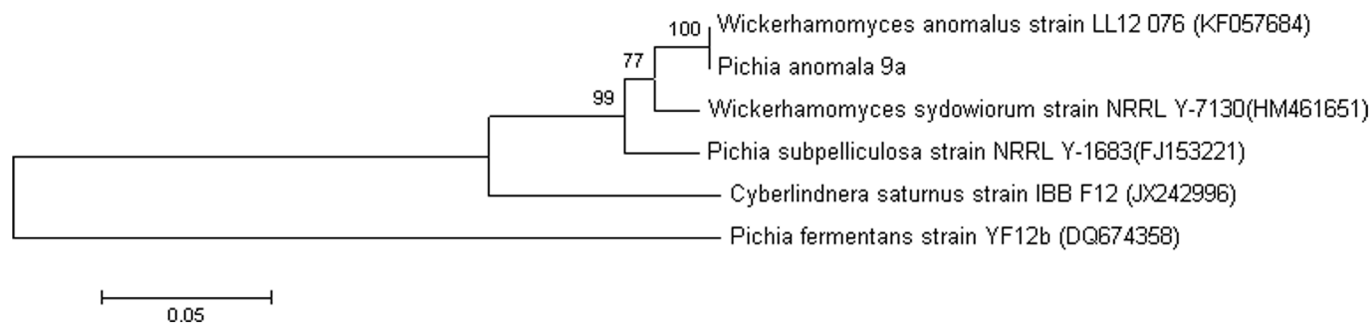


Рис. 1. Филогенетическое дерево, полученное анализом 28S-субъединицы с переменными участками D1 и D2, показывает положение нового предложенного штамма *Pichia anomala* 9a. Длина ветвей пропорциональна различиям в нуклеотидных последовательностях. Доверительные значения для узлов вычисляли методом «bootstrap»-анализа с количеством повторов 1000. Частоты менее 50% не учитывались. *Pichia fermentans* strain YF 12b служил для анализа как представитель внешней группы

Для определения наиболее перспективных штаммов выделенные из грудного женского молока штаммы дрожжей культивировали на пшеничных отрубях (табл. 3).

Наиболее продуктивным оказался штамм 9a, который и был выбран для дальнейших исследований. Его идентификацию проводили ПЦР-методом, как описано выше.

По результатам секвенирования и сравнения полученной последовательности нуклеотидов с базами данных было построено филогенетическое дерево (рис. 1).

Если говорить о крупнотоннажном получении энергонасыщенной биомассы методом твердофазной ферментации, то для таких целей одного крахмалосодержащего сырья (зерно, продукты его переработки) недостаточно в силу того, что оно само является высокоценным продуктом и хорошим сырьем. Для этих целей нужно иметь множество различных возобновляемых субстратов как первичных, так и вторичных, и в агропромышленном комплексе России они присутствуют. Наиболее привлекательным субстратом является сенная мука из дикорастущих и сеяных трав, количество которой может достигать сотен миллионов тонн в год, с учетом тех огромных нераспахиваемых площадей, на которых не проводился покос, а также практически половину пахотных земель, которые заросли травами и иногда мелколесьем за последние 25 лет.

В качестве первичного агропромышленного сырья использовали сенную и травяную муку, вторичного — пшеничную соломенную муку (табл. 4).

Немного неожиданной оказалась более высокая продуктивность (в среднем на 50%) дрожжей на сенной муке по сравнению с травяной, хотя это можно объяснить несколько большей пористостью сенной муки, изготовленной из созревших, более богатых целлюлозой расте-

ний. Более нежные частицы травяной муки, возможно, не обеспечивают оптимальную степень пористости. Следует отметить, что продуктивность на сенной муке была незначительно ниже, чем на отрубях. Наиболее труднодоступным субстратом является соломенная мука.

Эффективная конверсия целлюлозосодержащих субстратов во многом зависит от размеров твердых частиц и от влажности, экспериментальные данные представлены в таблице 5 и 6, соответственно.

Таблица 4

Продуктивность дрожжей *Pichia anomala* 9a на различных субстратах при твердофазной ферментации (посевная доза 2×10^8 кл/г)

| Питательная среда | Продуктивность дрожжей, $n \times 10^9$ кл/г | | |
|---------------------------|--|----------------|----------------|
| | После 24 часов | После 48 часов | После 72 часов |
| Сенная мука | 2,4 | 4,1 | 5,2 |
| Травяная мука | 1,5 | 2,6 | 3,4 |
| Соломенная пшеничная мука | 1,2 | 1,3 | — |
| Отруби пшеничные | 2,5 | 4,3 | 5,5 |

Из приведенных данных можно сделать вывод о том, что максимальная продуктивность достигается при размере частиц 1–3 мм. В то же время довольно четко видно, что сдвиг как в сторону увеличения, так и уменьшения размера частиц не сопровождается значительным снижением продуктивности, то есть в производственных условиях у технолога будет достаточно большая степень свободы в этом параметре.

Таблица 5

Продуктивность дрожжей *Pichia anomala* 9a на различных фракциях сенной муки при твердофазной ферментации (посевная доза 2×10^8 кл/г)

| № п/п | Фракции | Продуктивность дрожжей, $n \times 10^9$ кл/г на различных фракциях сенной муки | | |
|-------|-------------|--|----------------|----------------|
| | | После 24 часов | После 48 часов | После 72 часов |
| 1 | Более 3 мм | 1,5 | 2,4 | 3,6 |
| 2 | 2–3 мм | 2,0 | 3,2 | 4,1 |
| 3 | 1–2 мм | 2,2 | 3,1 | 4,4 |
| 4 | Менее 1 мм | 1,9 | 2,8 | 3,9 |
| 5 | Все фракции | 1,8 | 2,9 | 4,2 |

Таблица 6

Продуктивность дрожжей *Pichia anomala* 9a на сенной муке различной влажности при твердофазной ферментации (посевная доза 2×10^8 кл/г)

| № п/п | Влажность субстрата, % | Продуктивность дрожжей, $n \times 10^9$ кл/г на различных фракциях сенной муки | | |
|-------|------------------------|--|----------------|----------------|
| | | После 24 часов | После 48 часов | После 72 часов |
| 1 | 30 | 0,6 | 0,6 | 0,3 |
| 2 | 40 | 2,1 | 3,2 | 4,2 |
| 3 | 50 | 2,8 | 3,4 | 4,2 |
| 4 | 60 | 2,4 | 3,1 | 4,0 |
| 5 | 70 | 3,2 | 3,9 | 4,4 |
| 6 | 80 | 2,2 | 2,3 | 2,2 |

Классическое твердофазное культивирование микроорганизмов сформулировало представление о некоторых стандартных условиях влажности твердофазных культур. Обычно она колеблется в интервале 45–55% [1, 2]. Что же касается целлюлозосодержащих субстратов, то на основании полученных экспериментальных данных можно сказать, что наиболее оптимальной будет влажность 60–70%.

Заключение

Таким образом, сформулированы основные представления относительно выделения дрожжей из молока млекопитающих. На основании полученных результатов мы считаем, что нерационально пытаться выделять дрожжи из молозива и в качестве материала для поиска дрожжей использовать стационарное молоко. В исследовании был получен штамм *Pichia anomala* 9a, обладающий способностью расти на трудно ферментируемых растительных субстратах с получением энергонасыщенной биомассы. Показано, что наиболее рациональным способом при такой переработке субстратов является твердофазная ферментация.

Литература

1. Воробьева Г.И., Выслоух В.А., Тихонов И.Д., Катруш Р.В. Обогащение крахмал- и целлюлозосодержащего сырья белком микроорганизмов / В кн.: Биоконверсия растительного сырья: Тез. докл. – Рига: Зинатне, 1982. – С. 186.
2. Нгуен Ким Зунг. Разработка технологии получения дрожжевых лечебно-профилактических препаратов на твердых растительных субстратах: дисс. канд. тех. наук. МГАПП. – М., 1996. – 151 с.
3. Фомичева Г.М., Василенко О.В., Марфенина О.Е. Сравнительные морфологические, экологические и молекулярные исследования штаммов *Aspergillus versicolor* (Vuill.) Tiraboschi, выделенных из разных местообитаний // Микробиология. – 2006. – Т. 7. – № 2. – С. 228–234.
4. Gardes M., Bruns T.D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts // Mol. Ecol. – 1993. – Vol. 2(2). – P. 113–118.
5. Madhavi K., Adnan Amin, Vidya Sagar Reddy G., Devi Varaprasad Reddy A. Algal biofuels: a solution to pollution problems and sustainable development – a review // Continental J. Sustainable Development. – 2013. – Vol. 4(1). – P. 39–44.
6. O'Donnell K. Fusarium and its near relatives / In: The fungal holomorph: Mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics. Reynolds D.R., Taylor J.W. (Eds.). – Wallingford, UK: CAB International, 1993. – P. 225–233.
7. Sivakumar G., Vail D.R., Xu J., Burner D.M., Lay J.O., Jr., Ge X., Weathers P.J. Bioethanol and biodiesel: Alternative liquid fuels for future generations // Eng. Life Sci. – 2010. – Vol. 10. – No. 1. – P. 8–18.

PREPARATION OF ENERGY RAW MATERIALS USING AEROBIC TREATMENT OF THE PLANT BIOMASS BY MEANS OF SELECTIONED YEAST

K.V. GORIN¹, E.G. BORISENKO²

¹ *National Research Centre «Kurchatov Institute»,*

² *Moscow State University of Food Production, Moscow*

The paper considers the selection of yeast from mammalian milk. PCR analysis was conducted to identify the selectioned yeast strains. The phylogenetic tree was constructed. The strain *Pichia anomala* 9a was obtained, capable of actively accumulating biomass for non-hydrolyzed cellulose-containing plant material. Aerobic bioconversion of the most promising hard degradable substrates was examined. The conditions necessary for the effective conduct of the bioconversion process were selected.

Keywords: yeast, *Pichia anomala*, selection of yeast, cellulose-containing raw materials, solid state fermentation, biomass.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА МАСС-СПЕКТРОСКОПИИ С ИНДУКТИВНО СВЯЗАННОЙ АРГОНОВОЙ ПЛАЗМОЙ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА БИОМАССЫ ШТАММОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Л.И. СЛЕПЯН^{1*}, И.Е. КАУХОВА¹, Н.С. ПИВОВАРОВА¹, О.Н. ГРОМОВА¹,
М.В. ЯКОВЛЕВА², И.И. ШАНТЫРЬ², М.А. ВЛАСЕНКО³

¹ ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия» Минздрава России,

² Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России,

³ ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург

Впервые методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной аргоновой плазмой (ИСП-МС) проведено изучение макро- и микроэлементного состава биомассы различных штаммов культур тканей: *Raiwolfia serpentine* Benth. (*Arocynaceae*), *Yucca gloriosa* (*Agavaceae*), селективного штамма *Panax ginseng* С.А. Меу. с экстрактом из листьев березы повислой — *Betula pendula* Roth. и селективного штамма *Panax ginseng* С.А. Меу. с экстрактом из корней солодки — *Glycyrrhiza glabra* L. (*Fabaceae*). Установлено наличие всех жизненно важных элементов в исследованных объектах. Анализ полученных данных показал, что в культивируемых *in vitro* штаммах наблюдали большие различия в содержании макро- и микроэлементов.

Ключевые слова: культура тканей, лекарственные растения, макро- и микроэлементы, метод масс-спектрометрии с индуктивно связанной аргоновой плазмой.

Введение

Современная фитобиотехнология, связанная с культивированием *in vitro* клеток лекарственных растений, тесно переплетается с традиционными биотехнологическими подходами. К числу последних относится поддержание существующих банков ценных и редких штаммов лекарственных растений, позволяющих получать новые лекарственные препараты.

На сегодняшний день наиболее развиты и популярны как в мире, так и в России направления, связанные с медициной и фармацевтикой — так называемая «красная биотехнология», на долю которой приходится более 60% биотехнологического рынка и большая часть инвестиций. Все большее значение приобретает также агrobiотехнология, включая производство продуктов питания («зеленая биотехнология»), и морская биотехнология

(«голубая биотехнология») [3]. По прогнозу Организации экономического сотрудничества и развития в Европе (ОЕСД), к 2030 году в мире более 70% лекарств, 50% пищи, 30% химической продукции будут производиться с помощью биотехнологий [6].

В России с целью усиления развития биотехнологии уже созданы научные центры и промышленные предприятия в Московском регионе (Пушино и Сколково), Новосибирске и Томске, Свердловской и Нижегородской областях и создаются новые биокластеры и биотехнопарки с учетом местного ресурсного потенциала и конкретных социально-экономических задач (Республика Татарстан, Чувашская Республика). Санкт-Петербург является одним из таких центров [4].

В настоящее время в рамках государственной программы «Здоровье нации», направленной на развитие новых высоких технологий, поставлены задачи по разработке и получению высокоэффективных и безопасных отечественных лекарственных препаратов. Несмотря на значительный прогресс в мире в производстве лекарств и в медицинских технологиях, в третье тысячелетие человечество вступает с огромным багажом проблем, связанных со здоровьем. Так, в России до 30% потерь трудоспособности населения приходится на заболеваемость гриппом, что составляет около 50 млн. человек в год. Растет число лиц ВИЧ-инфицированных, а также инфицированных вирусами гепатита В и С,

© 2013 г. Слепян Л.И., Каухова И.Е., Пивоварова Н.С., Громова О.Н., Яковлева М.В., Шантырь И.И., Власенко М.А.

* **Автор для переписки:**

Слепян Лариса Ивановна

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры промышленной технологии лекарственных препаратов Санкт-Петербургской химико-фармацевтической академии.

197376 Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 14

Тел.: +7 (812) 234-90-34.

E-mail: larisa.slepyan@pharminnotech.com

больных диабетом, число которых в России превышает 4 млн. человек. Только в Санкт-Петербурге ежегодно регистрируется до 20000 новых случаев раковых заболеваний, в том числе среди детей [1]. Кроме того, в России огромные площади неблагоприятны в экологическом плане. Значительная часть трудоспособного населения находится под влиянием постоянных стрессов. Таким образом, до трети населения в мире находится в «третьем», промежуточном состоянии между болезнью и здоровьем. Поэтому впервые в России в «Концепции государственной политики в области здорового питания» были приняты биологически активные добавки (БАД), содержащие различные микроэлементы в концентрированном виде, в качестве средств быстрого устранения дефицита минорных компонентов в пище в рационе питания населения [15].

Изучение элементного «портрета» населения РФ в отдельных биогеохимических регионах и профессиональных группах с целью научной разработки и внедрения мероприятий по устранению выявленных микроэлементозов является одной из основных задач медицины [14].

Наличие многочисленных микроэлементов в организме и их концентрация в определенных органах и тканях не случайны, а связаны с их биологической ролью в процессах жизнедеятельности организма [12]. Каждый химический элемент выполняет определенную физиологическую роль, и отдельные элементы друг друга не заменяют. Общеизвестно, что биологические эффекты большинства микроэлементов дозозависимы, поэтому как их недостаток, так и избыток приводят к развитию патологических процессов — микроэлементозов, которые приводят к снижению резервов здоровья и ухудшению адаптации к неблагоприятным факторам среды. Так, по данным литературы, у лиц, подверженных влиянию токсических факторов производства и/или неблагоприятных факторов окружающей среды, описаны случаи увеличения заболеваемости нервной системы на 14,3%, респираторных заболеваний — на 13,9% и иммунных заболеваний — на 8,99% [9, 16]. В связи с этим элементная диагностика в медицине представляет собой важный инструмент поиска рациональных стратегий лечения заболеваний.

Целью настоящего исследования явилось применение метода масс-спектрометрии с индуктивно связанной аргоновой плазмой (ИСП-МС) для сравнительного качественного и количественного анализа биоэлементов в биомассе клеток некоторых штаммов лекарственных растений, которые используются в качестве сырья для

выделения биологически активных веществ (БАВ) или как биологически активные добавки.

Материалы и методы

В качестве объектов были выбраны биомассы штаммов лекарственных растений, которые находятся в постоянной коллекции банка клеточных культур Санкт-Петербургской химико-фармацевтической академии более 40 лет:

- Биомасса штамма раувольфии змеиной — *Rauwolfia serpentina* Benth. (Aporocynaceae) (шифр-Rw-47, № 12 и Rw-27, № 13).
- Селективные штаммы женьшеня, полученные на питательной среде, содержащей экстракт из корней солодки — *Glycyrrhiza glabra* L. (Fabaceae) (шифр Ж + С, № 19) и листьев березы повислой — *Betula pendula* Roth (Betulaceae) (шифр Ж + Б, № 17).
- Биомасса штаммов юкки великолепной — *Yucca gloriosa* L. (Agavaceae) (шифр — Ю, № 20).

Все штаммы росли на агаризованной питательной среде в соответствии с паспортным составом для каждой культуры при температуре 27 °С в темноте. Мы не указываем состав питательных сред, так как в данном случае нас интересовал именно конечный состав макро- и микроэлементов в исследуемых объектах. Все биомассы были высушены в ИК сушилке в конце сроков их культивирования. Для проведения исследований использовали по 5 проб биомассы из каждого варианта от 4—5 последовательных пассажей. Представленные результаты обработаны статистически и выражены в среднеарифметических значениях. Анализ элементного состава проводили методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной аргоновой плазмой.

Для определения малых концентраций химических элементов в различных объектах живой и неживой природы необходимо применение не только высокочувствительных инструментальных методов анализа, но и стандартизированных образцов сравнения для адекватной оценки полученных результатов. Основные требования, предъявляемые к методу, — сочетание низких пределов обнаружения, высокой чувствительности и селективности. В настоящее время именно таким методом можно считать метод масс-спектрометрии с индуктивно связанной аргоновой плазмой [13]. Он позволяет одновременно определять в одной пробе содержание макро-, микро- и ультрамикроэлементов.

Основной принцип работы масс-спектрометра состоит в том что, метод ИСП-МС комбинирует ис-

пользование индуктивно связанной плазмы в качестве источника ионов с квадрупольным масс-спектрометром, выступающим в роли масс-анализатора, и дискретно-диодным детектором, который используется для регистрации отдельных ионов и их потоков. Индуктивно связанная плазма поддерживается в специальной горелке, способна возбуждать однозарядные ионы из атомов вводимого образца. Далее ионы фокусируются ионно-оптической системой и попадают в анализатор масс-спектрометра, где разделяются по отношению масс к заряду. Соответствующий ионный поток регистрируется детектором. Через масс-спектрометр в каждый момент времени пропускаются ионы со строго определенным соотношением массы и заряда, которые затем попадают в детектор для количественной регистрации. В современных ИСП-МС приборах применяется двойная регистрация сигналов: импульсный режим одного сегмента детектора для подсчета отдельных ионов и аналоговый режим другого — для регистрации ионных токов. Таким образом, современные ИСП-МС приборы дают возможность определять концентрации отдельных элементов на уровне от сотых долей нанограммов до сотен миллиграммов на литр. Все образцы проходят специальную пробоподготовку. Несомненными достоинствами метода ИСП-МС являются также его высокая чувствительность и избирательность, надежность современного оборудования, простота и точность калибровки по общедоступным стандартизированным образцам.

Как было сказано выше, в условиях ухудшающейся экологической обстановки на территории России и производственной деятельности человека изменяется качественный состав воды, почвы и воздуха. Соответственно изменяется и микроэлементный состав растений. Поэтому применение данного метода обеспечивает четкое отслеживание элементного состава как растений, используемых в качестве БАД, так и штаммов лекарственных растений-продуцентов БАВ. Использование экологически чистого сырья, полученного в условиях культуры *in vitro*, с известным качественным и количественным содержанием макро- и микроэлементов позволит рекомендовать его для коррекции микроэлементного дисбаланса.

Результаты и обсуждение

Учитывая большое количество данных, полученных в результате анализа биоэлементов с помощью метода ИСП-МС для всех образцов, мы постарались клас-

сифицировать их по группам элементов, выполняющих близкие функции в растительной и животной клетке.

В таблице 1 представлены данные для исследуемых образцов биомассы штаммов по содержанию следующих элементов: Na, Mg, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, V, Cr, Co, Ni, Mo, Ba.

Таблица 1

Содержание элементов в штаммах лекарственных растений (мкг/г)

| № пробы, образец / элемент | № 12, Rw-47 | № 13, Rw-27 | № 17, Ж+Б | № 19, Ж+С | № 20, Юкка |
|----------------------------|-------------|-------------|-----------|-----------|------------|
| Na | 2732,0 | 2387,0 | 13830,0 | 14700,0 | 4736,0 |
| Mg | 5336,0 | 3740,0 | 3194,0 | 3963,0 | 3875,0 |
| K | 7568,0 | 4657 | 72760,0 | 72890,0 | 77110,0 |
| Ca | 5005,0 | 3312,0 | 5368,0 | 7228,0 | 8348,0 |
| Mn | 241,8,0 | 196,1 | 1300,0 | 1692,0 | 480,4 |
| Fe | 33,16 | 25,49 | 58,39 | 72,67 | 80,0 |
| Cu | 1,858 | 0,888 | 3,541 | 3,418 | 2,725 |
| Zn | 118,7 | 82,71 | 635,8 | 815,1 | 212,0 |
| V | 1,265 | 0,888 | 7,039 | 9,391 | 7,80 |
| Cr | 1,211 | 1,174 | 1,28 | 1,123 | 1,177 |
| Co | 0,211 | 0,136 | 1,097 | 1,50 | 0,608 |
| Ni | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Mo | 0,0 | 0,0 | 0,268 | 0,48 | 1,943 |
| Ba | 7,923 | 8,290 | 1,212 | 1,203 | 2,014 |

Анализируя данные, представленные в таблице 1, отметим следующее. Штаммы Rw-47 и Rw-27 росли на питательной среде с одинаковым набором макро- и микроэлементов, однако большинство элементов в штамме Rw-47 было в два раза выше, чем в биомассе штамма Rw-27 (кроме Ba и Na, которые практически одинаковы в обоих штаммах). В то же время содержание Mg в штамме Rw-47 самое высокое из всех штаммов (5336,0 мкг/г) и содержание K почти в 1,5 раза выше — 7568,0 мкг/г, чем Ca — 5005,0 мкг/г. Так что даже в биомассе двух близких видов, растущих *in vitro* на одинаковой питательной среде, содержание отдельных элементов остается различным. Учитывая, что данный штамм был отселектирован именно как кардиотропный с высоким содержанием не только специфических алкалоидов (аймалина и других), но и ионов K и Mg, можно сказать, что данный эффект был вполне достигнут благодаря правильному подбору среды [5, 8].

Для биомассы селективных штаммов Ж+Б и Ж+С, которые росли на одинаковой по макро- и микроэлементам питательной среде, можно отметить следующее [10]. По содержанию Na, Mg, Cu, Cr и Co они были близки. Содержание Ca было в 1,5 раза выше в штамме Ж+С — 7228,0 мкг/г, чем в биомассе штамма Ж+Б. Эту же закономерность можно отметить также и для таких элементов, как Mn, Fe, Zn и Mo, содержание которых в штамме Ж+С было практически в 1,5 раза выше, чем в биомассе штамма Ж+Б. Что сказалось на этом отличии — содержание элементов в самом сырье, которое использовали для получения экстрактов из березы и солодки, вносимых в питательную среду при селекции штаммов, или их сочетание с элементами в питательной среде, пока остается вопросом.

Для штаммов юкки очень близкие значения элементов были определены для Mn, Cu, Zn и Cr. В то же время в биомассе этого штамма отмечено очень высокое содержание K — 77110,0 мкг/г, Ca — 8348,0 мкг/г, Mg — 3845,0 мкг/г, Fe — 80,0 мкг/г и V — 7,80 мкг/г. Можно предположить, что данные элементы выполняют определенную роль в метаболизме стероидных гликозидов не только в данном штамме *in vitro*, но и в растениях *in vivo*.

Количество тяжелых металлов (Cd, Sb, Hg, Pb) для всех штаммов либо лежало в пределах допустимой нормы, либо было значительно ниже (в таблице не указано).

Таким образом, можно отметить четкую индивидуальность в наборе элементов для каждого штамма, даже когда они культивируются на одинаковых питательных средах. Значит, только полный элементный анализ биосырья в каждом конкретном случае может дать его характеристику.

Учитывая полученные данные, ниже приведена роль отдельных жизненно важных макро- и микроэлементов с учетом их роли в метаболизме. Главная роль микроэлементов — участие в ферментативных реакциях живого организма, как биосистемы.

Кальций — универсальный регулятор в растительной и животной клетке. Выполняет неспецифические функции, влияя на осмотическую деятельность, поляризацию реактивных групп, а также на проницаемость мембран и мембранный потенциал клеток.

Кальций — один из немногих макроэлементов, концентрация которого в состоянии покоя в цитозоле поддерживается на уровне, сопоставимом с содержанием фитогормонов 10^{-2} М и 10^{-7} М. Кальций является вторичным мессенджером, что позволяет ему быстро

перемещаться в цитоплазме и быстро расщепляться и удаляться. Внутри- и внеклеточные сигналы вызывают увеличение концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме. Сигналы индуцируют открытие Ca-каналов, и концентрация Ca^{2+} в цитозоле резко возрастает. Любое увеличение Ca^{2+} воспринимается клеткой как сигнал тревоги. В клетке существует много систем быстрого удаления Ca^{2+} . Эти системы встроены в мембраны. В наружной плазматической мембране эндоплазматической сети расположена специальная Ca-АТФаза, которая выкачивает Ca^{2+} против градиента концентрации из цитоплазмы во внешнюю среду за счет гидролиза АТФ и накапливает его в замкнутых цистернах ретикулума или в матриксе митохондрий. Специальный Na^+ - Ca^{2+} насос может обменивать внутриклеточный Ca^{2+} на внеклеточный Na^+ . Ca^{2+} взаимодействует со специальными Ca-связывающими белками. Часто Ca^{2+} действует как посредник только при взаимодействии с кальмодулином, растворимым цитозольным белком, образуя комплекс. Кальмодулин — особый белок с массой 16,7–18 кДа, который практически одинаков у микроорганизмов, животных и растений. Связывание Ca^{2+} вызывает изменение структуры этих белков и регулирует их активность, влияя на разнообразные жизненно важные процессы [13].

Надо отметить, что внутри клетки всегда присутствуют ионы Mg^{2+} , концентрация которых составляет 10^{-3} – 10^{-2} М. Поэтому внутри клетки имеются специальные белки-рецепторы, которые отличают эти похожие между собой ионы и в зависимости от концентрации Ca^{2+} по-разному взаимодействуют с мишенями и обеспечивают Ca-зависимое управление многочисленными процессами в клетке [2].

Накопление калия в вакуолях клеток растений улучшает общий гомеостаз растения. Является одним из приемов улучшения толерантности растений к стрессам, в частности, солевому и водному дефициту [7]. Этим же приемом, за счет увеличения концентрации калия в питательной среде, были получены наши суперпродуценты — штаммы раувольфии [5, 8].

Железо входит в состав клеток в количестве 0,02–0,08%. В дальнейшем восстановленная форма железа может реокисляться, поэтому в тканях растений железо представлено соединениями Fe^{2+} и Fe^{3+} , преимущественно в виде комплексов с различными органическими соединениями. Железо в растениях представлено главным образом в органических формах как составная часть геминсодержащих дыхательных ферментов (цитохромы, цитохромоксидаза), а также каталазы и пероксидазы. Его физиологическая активность обусловлена способно-

стью путем смены валентности ($\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$) переносить электроны в метаболических циклах и входить в хелатные соединения растительного организма.

Цинк в растениях находится только в двухвалентной форме, поэтому он не может участвовать в окислительно-восстановительных реакциях. В киселеме может встречаться в виде свободного двухвалентного катиона Zn^{2+} или в составе комплексов с органическими соединениями. Во флоэме, характеризующейся более высокими концентрациями органических соединений и значениями рН, большая часть цинка связана в комплексы. Метаболические функции цинка основаны на его способности формировать комплексные соединения с N^{2-} , O^{2-} и S -лигандами. Цинк входит в состав многих ферментов в качестве интегрального компонента, выполняя при этом каталитическую или структурную функции. В ферментах, где цинк осуществляет каталитическую функцию (карбоангидраза, карбоксипептидаза), этот металл координируется четырьмя лигандами. Три лиганда представлены аминокислотными остатками (гистидин, глутамин, аспарагин), а четвертый — молекулой воды. В ферментах, где цинк выполняет структурную функцию (алкогольдегидрогеназа, Zn -белки, включенные в репликацию ДНК и экспрессию генов), атомы цинка координированы S -группами четырех остатков цистеина. Кроме того, он участвует в синтезе гетероауксина, регулирующего рост растений, и имеет большое значение в биосинтезе индолилуксусной кислоты.

Бор в растениях находится в форме мономеров: $\text{B}(\text{OH})_3$, $\text{B}(\text{OH})_4$ или комплексов с органическими структурами. Растения содержат как водорастворимые, так и не растворимые в воде формы бора. Бор принимает участие в углеводном и белковом обмене, синтезе пектинов, входящих в состав клеточных стенок, поглощении воды. Он необходим для развития активно делящихся тканей, или меристем.

Медь. По биохимическим свойствам и функциям медь сходна с железом, способна образовывать стабильные комплексы и изменять валентность ($\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$). Одновалентная медь, в отличие от двухвалентной, нестабильна. Вопрос о том, в какой форме медь поступает в растение, в настоящее время дискутируется. В растениях до 98–99% меди содержится в виде комплексных форм, концентрация свободных Cu^{2+} и Cu^+ предельно низка. Медь характеризуется большим сродством к аминокислотам, чем к органическим кислотам. Большинство функций меди как микроэлемента связано с ее участием в ферментативных окислительно-восстановительных реакциях. Медь входит в состав полифенолоксидазы,

оксидазы аскорбиновой кислоты и некоторых других ферментов. Высшие растения характеризуются относительно невысоким содержанием меди, в среднем от 1 до 20 мг/кг сухого вещества. Содержание меди повышено в листьях, где свыше 60% этого металла сосредоточено в хлоропластах. В корнях медь в основном связана с клеточными стенками и чрезвычайно малоподвижна. Меди довольно много в репродуктивных органах растений.

Содержание магния в растениях не превышает 0,2–0,5% сухого вещества. В растениях более 50% ионов поступившего магния находится в свободном состоянии. Остальное количество выступает как обязательный компонент в различных соединениях, среди которых важное место занимает хлорофилл. Кроме того, он является составной частью фитина и пектиновых веществ. Магний активизирует многие ферменты и особенно фосфорилазы.

Марганец в биологических системах проявляет главным образом валентности II–IV. Относительно стабильны Mn^{2+} и Mn^{4+} , причем доминируют двухвалентные формы марганца, нестабилен Mn^{3+} . Марганец также участвует в синтезе хлорофилла, катализирует некоторые окислительно-восстановительные реакции процессов дыхания и фотосинтеза. Содержание марганца в травах колеблется от 17 до 334 мг/кг. Марганец обычно концентрируют растения, богатых танидами. Довольно много марганца содержат также алкалоидоносы. Манганофилы могут накапливать марганец до 2000 мг/кг сухой массы. В корнях концентрация марганца существенно выше, чем в побегах. В растворимой фракции клеток содержится около 30%; во фракции, обогащенной органидами, — около 20%; в мембранной фракции содержание Mn — около 6% от общего количества. Самый большой пул свободного марганца в растительной клетке связан с вакуолью. В процессе поглощения растением марганца уровень содержания его свободных форм в цитозоле относительно низок. Вероятно, в растительной клетке существуют системы активного контроля над концентрацией свободного марганца в цитозоле.

Молибден. Основные биохимические функции молибдена связаны с его способностью изменять валентность и участвовать в реакциях комплексообразования. В растениях молибден существует как $\text{Mo}(\text{VI})$ — $\text{Mo}(\text{IV})$. Транспортные формы молибдена практически не изучены. У растений насчитывается несколько ферментов, содержащих молибден в качестве кофактора: нитратредуктазы, ксантинооксидазы, дегидрогеназы, альдегидоксидазы и, возможно, сульфитоксидазы. В этих энзимах молибден выполняет каталитическую или структурную функцию. Молибден также играет

важную роль в азотном обмене растений и в процессе фиксации азота у азотфиксирующих бактерий. Он входит в состав фермента нитратредуктазы, поэтому при его недостатке в листьях накапливаются нитраты и снижается интенсивность процесса синтеза белка. В растениях содержание молибдена сильно варьирует в зависимости от их видовых особенностей и почвенно-климатических факторов. Как правило, в бобовых растениях, способных к N_2 -фиксации, накапливается больше молибдена, чем в растениях других семейств. До 90% представителей семейства бобовых концентрируют этот микроэлемент, и его уровень в растениях существенно превышает содержание в почве.

Кобальт в тканях растений находится в ионной Co^{2+} или Co^{3+} и комплексной форме. Долгое время рассматривался как элемент, необходимый только для животных и микроорганизмов. В настоящее время кобальт относят к металлам, полезным или необходимым также для высших растений. Кобальт обнаружен во всех высших и низших растениях, его концентрация колеблется от следовых значений до 12 мг/кг сухой массы. Основная функция кобальта связана с его участием в фиксации атмосферного азота в клубеньках бобовых и небобовых растений. Из корневых клубеньков изолирован коэнзим кобаламин (витамин B_{12} и его дериваты). Коэнзим кобаламин содержит в качестве металлокомпонента $Co(III)$, который хелатирован четырьмя атомами азота в центре порфириновой структуры, напоминающей по своему строению гем железа. При изучении распределения кобальта в клетке его наибольшее содержание отмечено в надосадочной жидкости, меньше в митохондриях, хлоропластах и ядрах.

Таким образом, имея четкую картину количественного содержания макро- и микроэлементов в любом биосырье и зная их роль в биосистеме, можно более правильно корректировать дефицит того или другого элемента в БАДах при различных заболеваниях. Однако мы пока ничего не можем сказать об особенностях взаимного влияния отдельных элементов в клетках того или иного штамма даже близких видов, которые росли на одинаковой по составу питательной среде и в одинаковых условиях культивирования. Данный метод ИСП-МС открывает в этом плане перспективу для исследований.

Заключение

Подводя итоги проведенным исследованиям, можно отметить уникальность метода ИСП-МС, который может служить руководством к действию как для

биотехнологов, так и врачей при выборе штаммов-продуцентов (БАВ) или БАД для коррекции или профилактики здоровья населения с учетом всех микроэлементов, выполняющих важную роль в организме человека.

Литература

1. Беспалов В.Г. БАД к пище и их использование для снижения риска онкологических заболеваний // Клиническое питание. — 2003. — № 1. — С. 35–38.
2. Биклулова А.Т. Биоэлементы в жизни растений / В кн.: Матер. II Международной научно-практической конф. «Биоэлементы». — Оренбург, 2007. — С. 12–14.
3. Васильев Р.Г. Развитие биофарминдустрии на евразийском пространстве // IphEB, 26Б.О. 28.04. 2011 (<http://www.biorosinfo.ru/glavnye-sobytiya/1547>).
4. Васильев Р.Г. Роль биотехнологии в социально-экономическом развитии России // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2008. — Т. 4. — № 2. — С. 19–22.
5. Воллосович А.Г. Культура изолированных тканей как продуцент фармакологически важных веществ / В кн.: Культура изолированных органов, тканей и клеток растений. — М.: Наука, 1970. — С. 234–244.
6. Дейнека Е.В. Генетически модифицированные растения- продуценты рекомбинантных белков медицинского назначения / Тез. докл. IV Всероссийского симпозиума «Трансгенные растения: технологии создания, биологические свойства, применение, биобезопасность». Москва, 19–23 ноября 2012. — С. 36.
7. Исаенков С.В., Блюм Я.Б., Матхаус Ф. Сверхэкспрессия генов К-каналов семейства ТРК улучшает соле- и засухоустойчивость растений риса и гомеостаз калия / Сб. тр. IV Всероссийского симпозиума «Трансгенные растения: технологии создания, биологические свойства, применение, биобезопасность». Москва, 19–23 ноября 2012 г. — С. 49.
8. Кунах В.А., Алхимова Е.Г., Соловьян В.Т. Культивируемые *in vitro* клетки *Rauwolfia serpentine* Benth. Изменчивость и биосинтез алкалоидов / В кн.: Биология культивируемых клеток и биотехнология. — Новосибирск, 1988. — С. 67–68.
9. Некрасов В.И., Скальный А.В. Элементный анализ лиц вредных и опасных профессий. — М.: РОСМЭМ, 2006. — С. 229.
10. Патент РФ. № 2131924 от 16.12.1997. Способ получения биомассы женьшеня. Г.П. Яковлев, В.А. Галынкин, Л.И. Слепян, Д.А. Журавлева, Н.А. Лосева.
11. Подунова Л.Г., Скачков В.Б., Скальный А.В. и др. Методика определения микроэлементов в диагностируемых биосубстратах атомной спектроскопией с индуктивно связанной аргоновой плазмой / Методические рекомендации, утвержденные ФЦГСЭН МЗ РФ 29.01.2003. — 50 с.

12. Скальная М.Г., Дубовой А.В., Скальный А.В. Химические элементы-микронутриенты как резерв восстановления здоровья жителей России. — Оренбург: РИК ГОУ ОГУ, 2004. — С. 239.
13. Слепян Л.И., Кириллова Н.В., Каухова И.Е. и др. Биоэлементный состав некоторых штаммов лекарственных растений семейства Аралиевых (Araliaceae) // Бутлеровские сообщения. — 2013. — Т. 36. — № 11. — С. 128–133.
14. Сусликов В.Л. Геохимическая экология болезней. — М. Гелиос АРВ, 1999. — С. 672.
15. Тутьельян В.А., Суханов Б.П. Биологически активные добавки к пище: законодательно-нормативная база оборота в Российской Федерации // Вестник Санкт-Петербургской медицинской академии им. И.И. Мечникова. — 2007. — № 2. — С. 77–85.
16. Фролова Е.Г. Гигиеническая оценка процессов транслокации металлов и их соединений из объектов окружающей среды в биологические среды человека. // Автореф. дис. на соискание уч. ст. к.м.н. — Оренбург, 2008. — С. 22 с.

Список сокращений:

БАВ — биологически активные вещества,
БАД — биологически активные добавки,
ИСП-МС — масс-спектрометрия с индуктивно связанной аргоновой плазмой.

APPLICATION OF MASS SPECTROMETRY WITH INDUCTIVELY COUPLED ARGON PLASMA TO DETERMINE THE ELEMENTAL COMPOSITION OF BIOMASS STRAINS OF MEDICINAL PLANTS

L.I. SLEPYAN¹, I.E. KAUKHOVA¹, N.S. PIVOVAROVA¹, O.N. GROMOVA¹,
M.V. YAKOVLEVA², I.I. SHANTIR², M.A. VLASENKO³

¹ Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy,

² All-Russian Center of Emergency and Radiation Medicine named after A.M. Nikiforov,

³ Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg

For the first time the investigation of the macro- and microelements composition of the different biomass the some strains cell culture was performed by the inductively coupled argon plasma mass spectrometry (ICP-MS), i.e. *Rauwolfia serpentina* Benth. (Apocynaceae), *Yucca gloriosa* (Agavaceae), selective strain of *Panax ginseng* C.A. Mey. with the birch leaf extract — *Betula pendula* Roth. and selective strain of *Panax ginseng* C.A. Mey. with the licorice extract — *Glycyrrhiza glabra* L. (Fabaceae). It was found that in these plants all the vital elements are present. The analysis of the obtained data showed quite a difference in the macro- and microelements content.

Keywords: tissue culture, medicinal plants, macro- and microelements, method of mass spectrometry with inductively coupled argon plasma.

ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД С ПРИМЕНЕНИЕМ БИОПРЕПАРАТА «УНИВЕРСАЛ»

М.Ю. МАРКАРОВА, Т.Н. ЩЕМЕЛИНИНА*, Д.В. ТАРАБУКИН, Е.М. АНЧУГОВА

ФГУН «Институт биологии» Коми научного центра Уральского отделения РАН, Сыктывкар

Проведено испытание образцов волокнистых материалов и модифицирующих агентов, предназначенных для иммобилизации нефтеокисляющих микроорганизмов биопрепарата «Универсал». Базальтовое волокно оказалось более подходящим фильтрующим материалом, сточная вода очистных сооружений — лучшим модификатором. Установлено, что при применении в очистной системе разработанного биофильтрующего материала очистка сточных вод от нефтепродуктов более эффективна.

Ключевые слова: нефтесодержащие сточные воды, иммобилизация микроорганизмов, биофильтры.

Введение

В настоящее время наиболее распространенной технологией очистки вод от нефти и нефтепродуктов является внесение биопрепаратов на основе микроорганизмов-нефтедеструкторов, способных ассимилировать углерод путем биохимической трансформации токсичных углеводородов, а также фильтрование с помощью природных и искусственных материалов (угля, торфа, целлюлозы, древесной стружки, базальтового волокна и нетканых материалов). При этом мы считаем перспективным применение комплексных методов, где в качестве биотехнологического агента использован биопрепарат, иммобилизованный на носителе. Основным преимуществом использования иммобилизованного биопрепарата является биодеструкция как при контакте материала с эмульсией нефтепродуктов, так и в самом материале, сорбиравшем нефтепродукты после разделения фаз [1, 4].

Анализ научной литературы показал различие в свойствах суспендированных и иммобилизованных клеток биопрепаратов [2]. Преимущества иммобилизованных клеток связаны со снижением потерь биомассы в связи с вымыванием в потоке жидкости, что позволяет достигать более высоких концентраций активных клеток

в рабочей зоне, а это, в свою очередь, ведет к повышению эффективности обработки [3, 8]. Также обнаружено, что иммобилизация клеток снижает ингибирование субстратом роста клеток [9], увеличивает диапазоны рН и температуры. В данном случае остается актуальным поиск носителей, способных адсорбировать значительное количество клеток микроорганизмов-деструкторов и обладающих низким водопоглощением.

Цель исследования — оптимизировать технологию очистки сточных вод, взятых из очистных сооружений автотранспортного предприятия.

Материалы и методы

В работе использовали сточные воды автотранспортного предприятия ООО «АльфаТранс» (г. Сыктывкар). В технологической схеме предприятия очистка сточных вод проводится путем их отстаивания с последующим четырехступенчатым фильтрованием на безнапорных фильтрах, сточные воды проходят через слой загрузки (фильтрующего материала). В качестве загрузочного фильтрующего материала используется базальтовое волокно. Основной проблемой предприятия является превышение содержания нефтепродуктов в сточных водах очистных сооружений на выходе в ручей. В задачи исследования входило:

- Подобрать подходящий носитель и способ его модификации для создания фильтрующего материала с иммобилизованными микроорганизмами-нефтедеструкторами.
- Проверить эффективность очистки сточных вод от нефтепродуктов с применением разработанного биофильтра.

© 2013 г. Маркарова М.Ю., Щемелинина Т.Н., Тарабукин Д.В., Анчугова Е.М.

* Автор для переписки:

Щемелинина Татьяна Николаевна,

кандидат биологических наук, научный сотрудник,

167982 Республика Коми, Сыктывкар, ул. Коммунистическая, 28

Институт биологии Коми научного центра УрО РАН

Тел.: +7 (906) 879-27-09

E-mail: shemelinina@ib.komisc.ru

Для активизации биологического разрушения нефтепродуктов был использован биопрепарат «Универсал» (ООО «Бастет», г. Сыктывкар, автор Маркарова М.Ю.), состоящий из нефтеокисляющих микроорганизмов *Rhodotorula glutinis*, штамм 55-1-Р В-1115, *Rhodococcus equi*, штамм 34-1(28-99/2) В-1116, *Rhodococcus equi*, штамм У7-28 В-1117, *Rhodococcus equi*, штамм Р-72-00, выделенных из нефтезагрязненных почв Усинского района Республики Коми и способных к деструкции широкого спектра нефтяных углеводородов [5].

Продукт выпускается в лабораторных и производственных условиях путем культивирования методом глубоководной ферментации с последующим высушиванием биомассы природных углеводородокисляющих бактерий. На препарат оформлен экологический сертификат соответствия № СЕР (1477)-Г-35/ОС-46 от 22.04.2011 [7].

Для иммобилизации микроорганизмов использовали базальтовое волокно (ТУ 5761-002-12881589-03) и нетканые материалы с поверхностной плотностью: 140 г/м² — полиэфирное волокно, полимерные дисперсии; 160 г/м² — полиэфирное волокно; 360 г/м² — полиэфирное волокно, полипропилен.

В качестве модифицирующего агента для волокнистых материалов применяли модельную воду (МВ), загрязненную нефтью в концентрации 3% от объема воды, сточную воду (СВ) очистных сооружений предприятия ООО «Альфа-Транс» (состав параметров приведен в табл. 1) и катионный крахмал (КК) оксиамил (ОПВ-1 (Е 1404) ТУ 9187-042-00334735-98). Концентрации растворов КК, использованного для обработки образцов — 0,1 и 0,5 мг/см³. Обработку вели следующим образом: образец волокнистого материала массой 0,5 г помещали в раствор модифицирующего агента на 1 час и выдерживали при комнатной температуре. Далее образец вынимали и высушивали до воздушно-сухого состояния.

Каждый образец волокнистого материала помещали на 24 часа в суспензию биопрепарата «Универсал», 1:100. Закрепление клеток биопрепарата на образцах оценивали по изменению оптической плотности культуральной жидкости относительно воды при 550 нм спустя 40 минут и 24 часа после погружения [12]. Далее образцы высушивали в токе теплого воздуха.

Удержание жизнеспособных клеток на волокне оценивали посредством подсчета закрепленных клеток в микроскопе MICROS (100-кратное увеличение) после 7 и 30 дней инкубирования образцов в водопроводной, с посуточной сменой, воде. Перед микроскопированием образец волокна окрашивали водным раствором метиленового синего.

Таблица 1

Содержание загрязняющих веществ в воде

| Показатели | ρ | Δ |
|---------------------------------------|--------|----------|
| NH_4^+ , мг/дм ³ | 2,14 | 0,13 |
| рН, ед. рН | 7,03 | 0,10 |
| БПК ₅ , мг/дм ³ | 6,1 | 0,7 |
| ХПК, мг/дм ³ | 60,0 | 12,0 |
| Fe, мг/дм ³ | 0,034 | — |
| НП, мг/дм ³ | 12,0 | 3,0 |
| ВВ, мг/дм ³ | 132,0 | 9,0 |

В качестве модельной жидкости использовали искусственно загрязненную нефтью водопроводную воду. Содержание нефти в воде анализировали методом флуориметрии на анализаторе жидкости «Флюорат-02» в соответствии с ПНД Ф 16.1.21-98 [6].

Результаты и обсуждение

Благодаря своей объемно-пористой структуре и нетканые материалы, и базальтовое волокно образуют своеобразную матрицу — пространство для жизнедеятельности биологической составляющей биосорбента. При этом и природные, и искусственные носители эффективны из-за способности к высокой и продолжительной адсорбции клеток, возобновляемости, инертной, нетоксичной природы; кроме того, базальтовое волокно широко применяется при очистке сточных вод.

Известно, что полиионные соединения могут выступать в качестве коагулянтов микроорганизмов [11, 13]. Применение катионного крахмала как модификатора волокнистых материалов также обусловлено его способностью к коагуляции клеток микроорганизмов [10]. Применение модельной воды и сточной воды в качестве модификатора обосновано содержанием в них нефти и нефтепродуктов, обладающих адгезивными свойствами.

Снижение оптической плотности в течение 24 часов свидетельствовало о том, что происходила адсорбция клеток микроорганизмов биопрепарата на поверхности материалов, с последующим осветлением раствора культуральной жидкости. Как видно из таблицы 2, адсорбционная способность нетканых материалов различной плотности практически одинакова и недостаточно высока. Более высокими адсорбционными свойствами обладало базальтовое волокно (табл. 3), вероятно ввиду того, что его поверхность менее инертна как для модификаторов, так и для клеток микроорганизмов.

Таблица 2

Оптическая плотность раствора биопрепарата и после погружения в него нетканых материалов

| Вариант | Биопрепарат «Универсал» | КК 0,5 мг/см ³ | | | СВ | МВ |
|-------------------------|----------------------------|---|---|---|---|---|
| | | Нетканый материал плотностью 140 г/м ² | Нетканый материал плотностью 160 г/м ² | Нетканый материал плотностью 360 г/м ² | Нетканый материал плотностью 140 г/м ² | Нетканый материал плотностью 140 г/м ² |
| Биопрепарат «Универсал» | | | | | | |
| Оптическая плотность | 0,523 | 0,460 | 0,517 | 0,523 | 0,515 | 0,520 |

Таблица 3

Оптическая плотность раствора биопрепарата и после погружения в него базальтового волокна

| Вариант | Биопрепарат «Универсал» | Базальтовое волокно + биопрепарат «Универсал» | | |
|----------------------|----------------------------|---|---------------------------|-------|
| | | КК 0,1 мг/см ³ | КК 0,5 мг/см ³ | СВ |
| Оптическая плотность | 0,523 | 0,343 | 0,399 | 0,317 |

В последующих опытах на смыв удержание жизнеспособных клеток биокультуры в структуре нетканых материалов оказалось недостаточным. На базальтовом волокне, модифицированном КК 0,1 мг/см³ и КК 0,5 мг/см³, клеток было много, наблюдалось их деление, были колонии, особенно в местах скопления КК. Постепенно в точках закрепления катионного крахмала базальтовое волокно изменяло свои физико-химические свойства, становилось рыхлым и рассыпалось. Вероятнее всего, катионный крахмал, закрепленный на волокне, послужил источником питания для некоторых микроорганизмов, которые входят в состав биопрепарата «Универсал». Спустя 30 суток от начала опыта микроскопирование показало, что изначально закрепленный биопрепарат на базальтовом волокне не был обнаружен, как и сам модификатор — крахмал. На базальтовом волокне, модифицированном сточной водой, клетки биопрепарата скапливались как раз на участках, где обнаруживали закрепленные нефтепродукты (рис. 1). Таким образом, наиболее подходящим материалом для закрепления биопрепарата «Универсал» явилось базальтовое волокно, модифицированное сточной водой.

Следующим этапом работы было исследование полученного биоматериала на использование его в качестве фильтрующего материала для снижения содержания нефтепродуктов. Через колонку диаметром 10 мм, длиной 100 мм, заполненную испытуемым материалом массой

1 г, пропускали 1 дм³ воды, содержащей нефтепродукты в концентрации 6,2 мг/дм³ со скоростью 1 см³/с. Пробы после колонки подвергали воздействию ультрафиолетового излучения для приостановки биологических процессов. В качестве контроля использовали образец необработанного базальтового волокна.

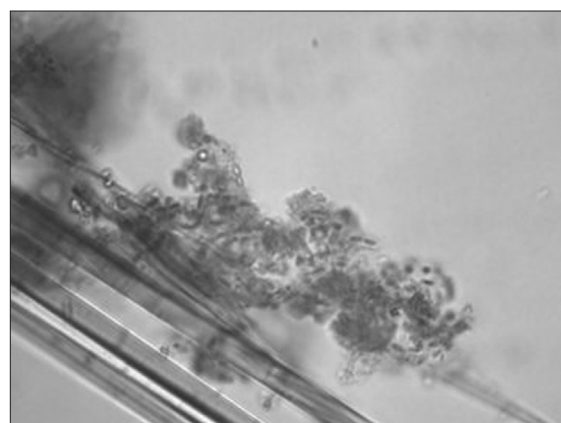


Рис. 1. Клетки биопрепарата «Универсал» на базальтовом волокне, модифицированном СВ

Вода, загрязненная нефтью, отличалась специфическим запахом и на ее поверхности плавала нефтяная пленка. Вода, пропущенная через колонку, заполненную базальтовым волокном, была с небольшим запахом нефтепродуктов, прозрачная. Вода, пропущенная через колонку, заполненную базальтовым волокном, моди-

фицированным сточной водой с иммобилизованными клетками биопрепарата «Универсал», не имела запаха, нефтяная пленка на поверхности воды отсутствовала. Микроскопирование биоматериала после пропускания через него загрязненной воды обнаружило большое количество закрепленных на волокне делящихся клеток и колоний, а также нефтяных капель, обрастающих клетками культуры.

Содержание нефтепродуктов в сточной воде при использовании необработанного базальтового волокна снизилось на 77% (табл. 4). Применение же биофильтрующего на основе иммобилизованных клеток биопрепарата «Универсал» на модифицированном сточной водой базальтовом волокне материала привело к снижению нефтепродуктов на 84%.

Таблица 4

Содержание загрязняющих веществ

| Расшифровка | Нефтепродукты мг/дм ³ | |
|--|----------------------------------|-------------|
| | ρ | $\pm\Delta$ |
| Нефтезагрязненная вода | 6,2 | 1,6 |
| Базальт | 1,4 | 0,4 |
| Базальт + СТ + биопрепарат «Универсал» | 1,0 | 0,25 |

Заключение

Таким образом, выявлено, что применение системы, состоящей из волокнистого материала на основе базальта и иммобилизованных на нем целевых микроорганизмов биопрепарата «Универсал», улучшает эффективность очистки нефтезагрязненных вод по сравнению с традиционными методами. Наилучшим модификатором для базальтового материала оказались сами нефтепродукты, способные к сорбции на поверхности волокна и локальному концентрированию клеток с последующим удержанием жизнеспособных клеток микроорганизмов-нефтедеструкторов.

Работа выполнена при поддержке молодежного инновационного проекта Президиума УрО РАН, № 01201250429 «Биофильтры на основе иммобилизованных микроорганизмов для очистки нефтесодержащих сточных вод малых и средних промышленных предприятий».

Литература

1. Баряхнина В.Б., Ягафарова Г.Г., Акбаров Р.Н. Использование отхода масложировой промышленности для иммобилизации микроорганизмов-деструкторов нефти // Успехи современного естествознания. – 2007. – № 2 – С. 80–81.
2. Демаков В.А., Максимова Ю.Г., Максимов А.Ю. Иммобилизация клеток микроорганизмов: биотехнологические аспекты // Биотехнология. – 2008. – № 2. – С. 30–45.
3. Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Терентьева Т.Г., Сапунова Л.И., Лобанок А.Г., Чуенко Т.В., Рудина Н.А., Черняк Е.И. Активность глюкозоизомеразы в суспензии клеток *Arthrobacter nicotianae* и адсорбционная иммобилизация микроорганизмов на неорганических носителях // Прикладная биохимия и микробиология. – 2008. – Т. 44. – № 2. – С. 193–201.
4. Лейкин Ю.А., Черкасова Т.А., Смагина Н.А. Саморегенерирующиеся сорбенты для очистки воды от нефтяных углеводородов // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2008. – Т. 8. – Вып. 4. – С. 585–599.
5. Маркарова М.Ю. Опыт применения биопрепарата «Универсал» для рекультивации нефтезагрязненных земель / В кн.: Материалы 3-й научно-практической конференции «Экологические работы на месторождениях Тимано-Печорской нефтегазоносной провинции. Состояние и перспективы», Ухта, 2004. – С. 229–233.
6. Методика выполнения измерений массовой доли нефтепродуктов в пробах почв на анализаторе жидкости «Флюорат-02». ПНД Ф 16.1.21-98. – М, 1998. – 15 с.
7. Экологический сертификат соответствия № 00001477. Дата выдачи 22 апреля 2011.
8. Dygel I. Controlling microbial adhesion: a surface engineering approach / In: Bioengineering in cell and tissue research. S.C.G.M. Artmann (Ed.). – Springer: Berlin, 2008. – P. 601–625.
9. Loh K.C., Chung T.S., Ang W.F. Immobilized-cell membrane bioreactor for high-strength phenol wastewater // J. Environ. Eng. – 2000. – Vol. 126. – P. 75–79.
10. Safonova E. et al. Biotreatment of industrial wastewater by selected algal-bacterial consortia // Eng. Life Sciences. – 2004. – Vol.4. – No. 4. – P. 347–353.
11. Strand S.P. et al. Efficiency of chitosans applied for flocculation of different bacteria // Water Research. – 2002. – Vol. 36(19). – P. 4745–4752.
12. Vandamme D. et al. Flocculation of microalgae using cationic starch // Journal Applied Phycol. – 2010. – Vol. 2. – P. 525–530.
13. Zheng H. et al. Harvesting of microalgae by flocculation with poly (c-glutamic acid) // Bioresource Technology. – 2012. – Vol. 112. – P. 212–220.

OPTIMIZATION OF WASTEWATER TREATMENT TECHNOLOGIES USING BIOLOGICAL PRODUCT «UNIVERSAL»

M.Y. MARKAROVA, T.N. SCHEMELININA, D.V. TARABUKIN, E.M. ANCHUGOVA

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

The samples of fibrous materials and modifying agents for immobilization oxidizing microorganisms biological product «Universal» were tested. Basalt fiber was more suitable filter material, waste water treatment plants — the best modifier. It was found that biofilter material designed to treat wastewater from oil is more effective in the purification system.

Keywords: oily waste water, immobilization of microorganisms, biofilters.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОПРЕПАРАТА «БАЙКАЛ ЭМ-1» ДЛЯ БИОКОНВЕРСИИ СОЛОМЫ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

В.Н. ДЕДКОВ*, И.А. ГНЕУШЕВА, Н.Е. ПАВЛОВСКАЯ

ФГБОУ ВПО «Орловский государственный аграрный университет», Орел

Изучали возможность применения закваски микробиологического удобрения «Байкал ЭМ-1» в качестве препарата для ферментативного гидролиза целлюлозосодержащего сырья (соломы яровой мягкой пшеницы). Установлено, что переработка соломы яровой мягкой пшеницы с использованием этого биопрепарата позволяет получить кормовые продукты для животноводства с более высоким содержанием сырого протеина и меньшим количеством сырой клетчатки в сравнении с необработанной соломой. Проведены испытания полученной кормовой добавки в бройлерном птицеводстве.

Ключевые слова: сельскохозяйственная биотехнология, биоконверсия, целлюлозосодержащее сырье, солома пшеницы, ферментативный гидролиз, биопрепарат «Байкал ЭМ-1», кормовой продукт, птицеводство.

Введение

Интенсивно развивающееся животноводство все больше нуждается в расширении кормовой базы в связи с недостатком переваримого протеина в комбикормовой промышленности [3]. Наряду с этим во многих странах имеются и постоянно накапливаются большие запасы малоиспользуемых или вообще неиспользуемых отходов сельского хозяйства, растениеводства, животноводства, зерноперерабатывающих и других производств, характеризующиеся низкой кормовой ценностью из-за наличия трудногидролизуемых полисахаридов и невысокого содержания усваиваемого белка, которые после соответствующей обработки могут приобретать кормовые свойства, в 1,5–3,0 раза превосходящие фуражное зерно хорошего качества [2, 8].

В этой связи все более актуальным становится повышение питательности малоценных кормов [5]. Вместе с использованием традиционных способов и приемов эту проблему можно решать путем внедрения в сельскохозяйственное производство достижений и методов биотехнологического характера, в частности, более широкого использования микробиологических препаратов [4].

Цель исследований состояла в оценке химического состава соломы яровой пшеницы после ее обработки биопрепаратом «Байкал ЭМ-1».

Материалы и методы

Исследования проводились на базе ЦКП «Орловский региональный центр сельскохозяйственной биотехнологии» Орловского государственного аграрного университета (ОрелГАУ), в лаборатории биотехнологии и молекулярной экспертизы ОрелГАУ.

В качестве объекта исследования была выбрана солома яровой мягкой пшеницы как целлюлозосодержащий отход сельскохозяйственного производства.

Сырье было высушено в сухожаровом шкафу при температуре 80 °С до остаточной влажности 6–8% и измельчено до размера частиц 1–2 мм в лабораторной зерновой мельнице ЛЗМ. Влажность сырья измеряли при помощи анализатора влажности Sartorius MA 150.

Используемая ассоциация микроорганизмов микробиологического препарата «Байкал ЭМ-1» представлена следующими видами: фотосинтезирующими и молочнокислыми бактериями, дрожжами, актиномицетами, ферментирующими грибами родов *Aspergillus* и *Penicillium* [1]. Штаммы способны синтезировать целлюлолитические ферменты и одноклеточный белок. Микроорганизмы биопрепарата не являются спорообразующими, согласно СанПин 23.2.1078-01, они входят в перечень веществ, не оказывающих вредного воздействия на кормовые продукты.

Состав сырья и полученных продуктов исследовали с применением следующих методов:

© 2013 г. Дедков В.Н., Гнеушева И.А., Павловская Н.Е.

* **Автор для переписки:**

Дедков Виталий Николаевич

ассистент кафедры биотехнологии,

Орловский государственный аграрный университет

302019 Орел ул. Генерала Родина, 69

E-mail: vitalyded@yandex.ru

- содержание сырого протеина определяли титриметрическим методом по Кьельдалю (ГОСТ 13496.4-93);
- определение сырой клетчатки проводили с помощью системы Fibertec 1020;
- содержание лигнина по ГОСТ 11960-79;
- редуцирующие вещества (РВ) фотометрическим методом по методике Вешнякова и др. (2008);
- ферментативную активность целлюлазы по ГОСТ Р 53046-2008.

Для эффективной деструкции углеводного комплекса целлюлозосодержащего сырья необходимы условия, в которых будет превалирующим действие целлюлолитических микроорганизмов биологического препарата. Исходя из этого, приготовление посевного материала проводили при рН 5,4–5,5 с внесением 0,5% раствора лактозы.

К субстрату, состоящему из 1 части размола (0,3 части проросших зерен ячменя и 0,7 части пшеничных отрубей) и 1 части воды, нагретой до температуры 80 – 100 °С, добавляли микробиологический препарат «Байкал ЭМ-1» из расчета 0,08 г на 1 кг субстрата и 0,5% раствор лактозы из расчета 100 г на 1 кг субстрата. Полученную таким образом закваску оставляли для созревания на 5–6 часов, а без лактозы — на 10–12 часов при комнатной температуре.

Полученный подобным образом посевной материал использовали при засеве целлюлозосодержащего сырья.

Статистическая обработка данных выполнена с использованием программы Microsoft Office Excel 2007.

Результаты и обсуждение

Результаты исследований представлены на материале двух примеров.

Пример 1. В камеру объемом 3000 мл помещали измельченную, пропаренную при температуре 100 °С солому пшеницы, увлажняли ее до содержания влаги 65% и добавляли посевной материал. Ферментацию проводили в течение 3 суток (72 часа) в анаэробных условиях при температуре 24–26 °С с начальным рН 5,4–5,5. Спустя 36 часов в конце экспоненциальной фазы роста микроорганизмов для активации биосинтеза целлюлолитических ферментов в субстрат вносили 0,5% раствор лактозы дискретно (из расчета 100 г на 1 кг сырья). Эффективность деструкции целлюлозного комплекса соломы пшеницы оценивали по накоплению редуцирующих веществ в ферментализате (рис. 1).

Спустя 72 часа ферментации разрушалось 47,86% полисахаридов и 72,67% лигнина. Содержание сырого протеина составило 5,93%, что на 1,41% больше, чем в нативной соломе пшеницы. Содержание редуцирующих веществ с внесением индуктора на 1,35% больше, чем без внесения этого компонента. Результаты микробиологической обработки нативной соломы пшеницы представлены в таблице 1.

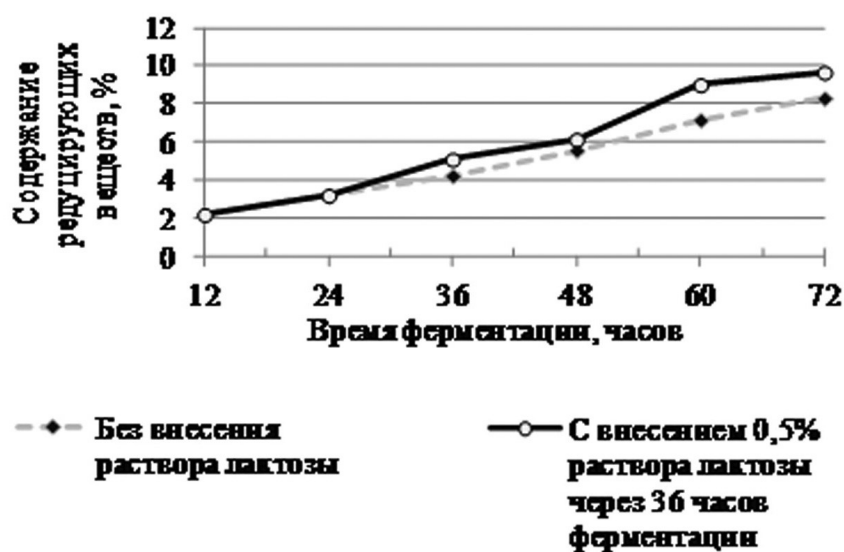


Рис. 1. Эффективность процесса биодеструкции целлюлозосодержащего материала (соломы яровой пшеницы) по накоплению редуцирующих веществ

Таблица 1
Состав полученных продуктов после микробиологической обработки нативной соломы пшеницы

| Показатели | Содержание, % а.с.в. | | |
|---------------------------|----------------------|-------------------------------|------------------------------|
| | Нативная солома | без внесения раствора лактозы | с внесением раствора лактозы |
| Целлюлоза и гемицеллюлоза | 64,75±0,4 | 35,72±0,005 | 33,76±0,22 |
| Лигнин | 21,37±0,81 | 5,63±0,02 | 5,84±0,02 |
| Сырой протеин | 4,52±0,09 | 5,11±0,02 | 5,93±0,02 |
| Редуцирующие вещества | — | 8,3±0,13 | 9,65±0,06 |
| pH | — | 6,4±0,03 | 6,47±0,06 |

Пример 2. Микробиологическую обработку нативной соломы пшеницы проводили аналогично примеру 1, только вместо пропаривания при температуре 100 °С солому подвергали термогидролизу при pH 3,0, температура 112 °С, давление 0,5 атм, время экспозиции 25 минут. Затем pH ферментационного субстрата довели до 5,4–5,5. Через 70–72 ч ферментации разрушилось 56,14% полисахаридов и 78,38% лигнина. Содержание сырого протеина составило 8,55%, что на 4,02% больше, чем в нативной соломе пшеницы. Содержание редуцирующих веществ с внесением лактозы на 2,74% больше, чем без внесения этого компонента (табл. 2).

Таблица 2
Состав полученных продуктов после микробиологической обработки прогидролизованной соломы яровой пшеницы

| Показатели | Содержание, % а.с.в. | | |
|---------------------------|----------------------|-------------------------------|------------------------------|
| | Нативная солома | без внесения раствора лактозы | с внесением раствора лактозы |
| Целлюлоза и гемицеллюлоза | 64,75±0,4 | 28,98±0,02 | 28,4±0,02 |
| Лигнин | 21,37±0,81 | 4,54±0,04 | 4,58±0,15 |
| Сырой протеин | 4,52±0,09 | 7,34±0,03 | 8,55±0,05 |
| Редуцирующие вещества | — | 11,64±0,03 | 14,38±0,02 |
| pH | — | 6,45±0,03 | 6,53±0,004 |

Следовательно, микробиологическая обработка соломы пшеницы биопрепаратом «Байкал ЭМ-1» снижает содержание полисахаридов в среднем на 47,86%, лигнина — на 72,67%, увеличивает сырой протеин на 1,41%. Биодеструкция целлюлозосодержащих материалов эффективна при внесении индуктора биосинтеза целлюлолитических ферментов (0,5% раствор лактозы). Содержание редуцирующих веществ в таких продуктах выше на 1,35%.

Экспериментальные данные определяют основные направления переработки соломы зерновых культур микробиологическим препаратом «Байкал ЭМ-1» для получения кормовых гидролизатов, а также осахаренного объемистого корма для дальнейшего применения в качестве кормового продукта в животноводстве. При этом длительность ферментации предварительно обработанного целлюлозосодержащего сырья (соломы яровой мягкой пшеницы) по вышеприведенным способам уменьшается до 72 часов (3 суток).

Результаты исследования послужили основой для разработки технологической схемы производства кормового продукта путем микробиологической переработки целлюлозосодержащего сырья (соломы пшеницы) с использованием микробиологического препарата «Байкал ЭМ-1» (рис. 2).

Данный кормовой продукт прошел испытания в качестве кормовой добавки в бройлерном птицеводстве.

При проведении экспериментальных исследований по определению влияния кормовой добавки, полученной с использованием микробиологического препарата «Байкал ЭМ-1», на продуктивность и сохранность цыплят-бройлеров были сформированы опытная и контрольная группы. В каждой группе было по 30 голов цыплят-бройлеров, всего задействовано 60 голов. Контрольную группу цыплят кормили основными рецептами комбикормов, применяемых в хозяйстве. Рецепт комбикорма опытной группы цыплят-бройлеров включал те же компоненты кормов, однако после двухнедельного возраста и до конца выращивания, 10% зернового корма (зерно пшеницы) было заменено на вновь полученную кормовую добавку.

В результате проведенных исследований на цыплятах-бройлерах было установлено, что замена в комбикорме 10% зерна пшеницы на кормовую добавку не оказало отрицательного влияния на рост и сохранность цыплят. Живая масса одной головы в начале выращивания была в пределах 41,3 г. В конце выращивания живая масса цыплят-бройлеров обеих групп имела незначительные различия. Среднесуточный прирост в

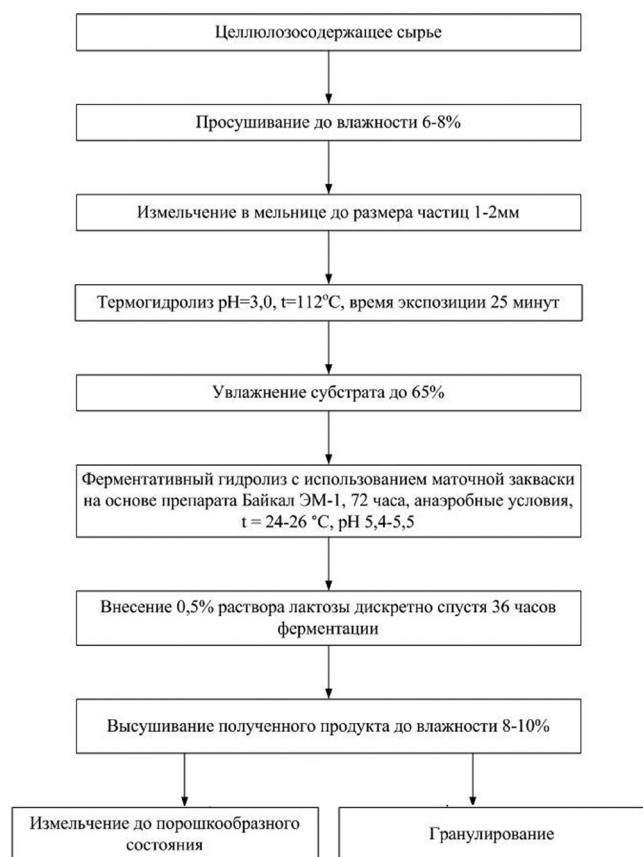


Рис. 2. Технологическая схема получения кормового продукта путем микробиологической переработки целлюлозосодержащего сырья (соломы яровой мягкой пшеницы) с использованием микробиологического препарата «Байкал ЭМ-1»

опытной группе за весь период выращивания находился в пределах 47,2 г, в контрольной группе — 47,3 г.

Скармливание кормовых добавок цыплятам-бройлерам в течение 28 дней положительно сказалось на их сохранности, в опытной группе она составила 100%, а в контрольной — 93%.

Замена в комбикорме 10% зерна пшеницы на полученную кормовую добавку при кормлении цыплят-бройлеров, начиная с 2-недельного возраста, позволила снизить расход комбикорма на одну голову за весь период выращивания на 238 г. В связи с этим расход комбикорма на 1 кг прироста цыплят-бройлеров в опытных группах был ниже по сравнению с контрольной группой на 5,3%.

Заключение

Таким образом, выполненная работа дает возможность сделать следующие выводы:

1. Микробиологическая обработка соломы пшеницы биопрепаратом «Байкал ЭМ-1» снижает содер-

жание полисахаридов в среднем на 47,86%, лигнина — на 72,67%, увеличивает сырой протеин на 1,41%. Биодеструкция целлюлозосодержащих материалов эффективна при внесении индуктора биосинтеза целлюлолитических ферментов (0,5% раствор лактозы). Содержание редуцирующих веществ в таких продуктах выше на 1,35%.

2. Результаты исследования послужили основой для разработки технологической схемы производства кормового продукта путем микробиологической переработки целлюлозосодержащего сырья (соломы пшеницы) с использованием микробиологического препарата «Байкал ЭМ-1».

3. Замена в комбикорме для цыплят-бройлеров 10% пшеницы на полученную нами кормовую добавку позволила:

- сохранить интенсивность роста цыплят-бройлеров в опытной группе на уровне контроля;
- повысить сохранность цыплят-бройлеров опытной группы на 7% по сравнению с контрольной;
- снизить расход комбикорма на 1 кг прироста цыплят-бройлеров в опытных группах по сравнению с контрольной группой на 5,3%.

Литература

1. Байкал-ЭМ. Биодобрение для Вашего сада и огорода: сайт фирмы-распространителя [Электронный ресурс] / АРГО. — Электрон. текстовые и граф. дан. — Новосибирск, 2012. — Режим доступа: <http://baykal-em.ru>. — Заглавие с экрана.
2. Гнеушева И.А., Горькова И.В., Дедков В.Н. Биотехнологические подходы для получения белково-углеводных кормовых добавок для животноводства / Развитие инновационного потенциала агропромышленного производства: Материалы Всероссийской научно-практической конференции 24 ноября 2010 года. — Орел: Изд-во ОрелГАУ, 2010. — С. 45–48.
3. Красильников О.Ю. Возможности альтернативного кормопроизводства в России // Птицеводческое хозяйство. Птицефабрика. — 2011. — № 7.
4. Крымова Е.А. Оценка влияния биологического препарата «Байкал-ЭМ1» на ростовые показатели озимых зерновых культур // Проблемы агрохимии и экологии. — 2010. — № 2. — С. 50–54.
5. Леснов А.П. Применение инновационных технологий производства высокобелковых кормов для свиней // Свиноферма. — 2008. — № 9. — С. 25–27.
6. Леснов А.П. Солома как энергетический и белковый источник для животноводства // Машинно-технологическая станция. — 2008. — № 6. — С. 51–54.

7. Павловская Н.Е., Горькова И.В., Гнеушева И.А., Дедков В.Н. Получение БАВ из соломы биотехнологическим методом / Инновации аграрной науки и производства: Материалы Международной научно-практической конференции 14–15 декабря 2011 года. Сборник статей. – Орел: Изд-во Орел ГАУ, 2011. – С. 124–127.
8. Перегудов С.С. Отходы в доходы // Торгпред. – 2005. – № 1. – С. 28.
9. Bourdichona F., Casaregolab S., Farrokh C. et al. Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use // International Journal of Food Microbiology. – 2012. – Vol. 154. – No. 3 – P. 87–97.
10. Speedy A.W. Overview of world feed protein needs and supply (English) / In: Protein Sources for the Animal Feed Industry. Expert consultation and workshop. Bangkok, 29 April – 3 May 2002; (Proceedings); FAO Animal Production and Health Proceedings (FAO), no. 1; FAO Expert Consultation and Workshop on Protein Sources for the Animal Feed Industry, Bangkok (Thailand), 29 Apr – 3 May 2002 / FAO, Rome (Italy). Animal Production and Health Div., 2004. – P. 9–29.

USING BIOLOGICAL PRODUCT «BAIKAL EM-1» FOR THE BIOCONVERSION OF SPRING WHEAT STRAW

V.N. DEDKOV, I.A. GNEUSHEVA, N.E. PAVLOVSKAYA

Orel State Agrarian University, Orel

The possibility of microbiological fertilizer leaven «Baikal EM-1» as a preparation for enzymatic hydrolysis of cellulose materials (straw of spring wheat) was examined. It was found that processing of spring wheat straw using this biological product provides a feed for livestock products with a higher content of crude protein and crude fiber less in comparison with the untreated straw. The developed feed additive has been tested in broiler poultry.

Keywords: agricultural biotechnology, bioconversion of cellulose raw materials, wheat straw, enzymatic hydrolysis, biological product «Baikal EM-1», feedstuff, poultry.

МИКРОВОДОРОСЛИ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ИСТОЧНИК СЫРЬЯ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОЭТАНОЛА

Э.Б. НАМСАРАЕВ*, К.В. ГОРИН, П.М. ГОТОВЦЕВ, А.В. КОМОВА, М.А. ЛОМОНОСОВА,
В.В. БУТЫЛИН, А.А. ШАПОВАЛОВА, Р.Г. ВАСИЛОВ

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

В обзорной статье проведен анализ микроводорослей, которые представляют потенциальный интерес в качестве сырья для производства биоэтанола. В настоящее время микроводоросли используются в основном для получения липидов и биодизеля, что создает проблему утилизации остаточной биомассы, содержащей значительное количество крахмала и целлюлозы. Одним из наиболее перспективных путей утилизации остаточной биомассы является сбраживание углеводов до этанола.

Ключевые слова: микроводоросли, фотосинтез, сбраживание, углеводы, целлюлоза, крахмал, биоэтанол.

Введение

Увеличение концентрации углекислого газа в атмосфере и сокращение мировых рентабельных запасов нефти привлекает внимание к использованию фототрофных микроорганизмов для производства биотоплива. Данные микроорганизмы обладают рядом преимуществ по сравнению с наземными растениями. Это — высокая производительность, отсутствие конкуренции за земельные ресурсы с сельским хозяйством, возможность использования воды, непригодной для орошения. В настоящее время для производства биотоплива используются фототрофные микроорганизмы двух групп: цианобактерии и микроводоросли. Микроводоросли, в отличие от цианобактерий, являются эукариотическими организмами и способны к накоплению значительного количества липидов, имеющих значительный биотехнологический потенциал как сырье для производства биодизельного топлива, пищевых добавок и косметики. После экстракции липидов необходимо утилизировать остаточную биомассу, содержащую значительное количество крахмала и целлюлозы. Одним из наиболее перспективных путей утилизации остаточной биомассы является сбраживание углеводов до этанола. В данной статье приводится обзор основных технологий получения этанола из биомассы микроводорослей.

Физиология микроводорослей

Микроводоросли — это микроскопические эукариотические организмы, обладающие способностью к различным типам метаболизма. Основным типом метаболизма является автотрофия на свету, при этом микроводоросли фотосинтезируют, превращая углекислый газ и воду в органическое вещество. Также микроводоросли способны к хемогетеротрофному росту в темноте и к фотогетеротрофному росту на свету с использованием различных органических соединений. В качестве субстратов для гетеротрофного роста могут использоваться сахара, органические кислоты, аминокислоты и др. Многие виды микроводорослей способны к анаэробному сбраживанию внутриклеточного крахмала, при этом конечными продуктами брожения могут быть ацетат, этанол, глицерин, лактат, водород и углекислый газ (Atteia A. et al., 2013 [4]; Hirano A. et al., 1997 [15]).

Микроводоросли, как правило, не способны к самостоятельной фиксации молекулярного азота. В качестве источников азота они используют нитрат и аммоний. При этом лимитация по азоту — это один из эффективных способов индукции синтеза липидов в микроводорослях.

Местообитаниями микроводорослей являются самые разнообразные биотопы. Микроводоросли *Chaetoceros gracilis* и *Tetraselmis tetraethele* растут при повышенной солености (Araujo G.S. et al. 2011) [3]. *Dunaliella acidophila*, *Chlamydomonas acidophila*, *Chlorella saccharophila*, *Chlorella protococcoides*, *Pseudococcomyxa simplex*, *Stichococcus bacillaris* и *Viridiella fridericiana* могут расти в условиях кислой среды. Водоросли могут также расти в соленой воде с

© 2013 г. Намсараев Э.Б., Горин К.В., Готовцев П.М., Комова А.В., Ломоносова М.А., Бутылин В.В., Шаповалова А.А., Василов Р.Г.

* Автор для переписки:

Намсараев Э.Б.

НИЦ «Курчатовский институт», НТК биоэнергетики
123182 Москва, пл. Академика Курчатова, 1

высокой щелочностью (Gimmler H. and Degenhard B., 2001) [11]. Некоторые виды *Scenedesmus* и *Chlorella*, обнаруженные в известняковых горячих минеральных источниках, могут выдерживать высокие содержания CO_2 , сохраняя высокие скорости роста и активность поглощения углерода; поэтому их можно использовать для улавливания CO_2 , выделяемого промышленными установками, в том числе и при температуре до 60 °C (Eriksen N.T. et al., 1996 [10]; Chiu S.Y. et al., 2008 [8]).

Микроводоросли обладают высокой скоростью роста, некоторые виды способны удваивать биомассу в течение нескольких часов. В оптимальных условиях цикл сбора биомассы микроводорослей очень короткий (менее 10 дней), что позволяет добиваться высоких объемов производства в течение года. Продуктивность производства биодизеля в расчете на площадь у микроводорослей в десятки раз превышает продуктивность растений (Намсараев З.Б., Василов Р.Г., 2012 [1]; Chisti Y., 2008 [7]).

Получение биоэтанола из биомассы микроводорослей

Основным видом биотоплива, получаемого из микроводорослей, является биодизель (Chisti Y., 2008 [7]). Однако ввиду высокого содержания углеводов остаточная биомасса микроводорослей после экстракции липидов является потенциальным сырьем для производства биоэтанола. Основная часть углеводов накапливается микроводорослями в виде крахмала в хлоропластах и целлюлозы (полисахаридов) в клеточных стенках, которые намного легче переработать в моносахариды по сравнению с лигноцеллюлозным сырьем (Harun R. et al., 2009 [14]; Harun R. et al., 2011 [13]; Ho S.H. et al., 2012 [16]; Domozych D.S. et al., 2012 [9]; Richmond A., 2004 [25]). Высокие концентрации крахмала были обнаружены у представителей родов *Chlorella*, *Dunaliella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus*, при этом максимальное содержание крахмала может превышать 50% от сухой массы (John R.P. et al., 2011) [20]. В таблице 1 приведен обобщенный список содержания крахмала и ферментируемой биомассы в некоторых водорослях.

Основные этапы получения этанола из биомассы микроводорослей включают в себя разрушение клеток, гидролиз крахмала и целлюлозы с получением сахаров, ферментацию сахаров с получением этанола (Matsumoto M. et al., 2003) [23].

Крахмал может быть выделен из клеток механическими способами (ультразвук, разрушение с помощью взрыва, механического среза и др.) или ферментативным путем. Затем крахмал отделяется путем экстракции с

водой или органическим растворителем. Так как крахмал, отделенный путем экстракции, сырой, он должен быть подвергнут тепловой обработке для желатинизации перед гидролизом его до глюкозы. Для этой цели требуется большое количество тепловой энергии. Обычно тепловая энергия для желатинизации составляет 20–30% от общей энергии, потребляемой в процессе производства этанола.

Выделенный из микроводорослей внутриклеточный крахмал подвергается химическому (кислотному и щелочному) или ферментативному гидролизу. Кислотный гидролиз протекает быстрее и является более дешевым, чем другие типы гидролиза, но кислотные условия могут привести к распаду сахаров, и образовавшиеся соединения могут ингибировать процесс ферментации (Girio F.M. et al., 2010 [12]; Harun R. et al., 2009 [14]; Moxley G., Zhang J.S., 2007 [24]). Кислотный гидролиз проводится с различной концентрацией кислоты от 0,1 до 5% в автоклаве при 121 °C в течение 20 минут. При использовании концентрации 2% и выше выход глюкозы близок к 100%, при концентрации 1% выход составил 96%. С точки зрения воздействия на окружающую среду и эксплуатационных расходов предпочтительнее использовать 1% серную кислоту. Наиболее подходящая концентрация биомассы микроводорослей составляет 50 г/л, при этом обеспечивается выход глюкозы выше 95% (Wirawan F. et al., 2012) [30].

Ферментативный гидролиз, наоборот, медленнее и намного дороже, чем кислотный (Lynd L.R. et al., 2002) [22], но этот процесс безопасен для окружающей среды, и с его помощью можно достигать более высокого выхода глюкозы без образования ингибирующих веществ. Ферментативный гидролиз *C. vulgaris* FSP-E проводился с помощью ферментов (эндоглюканаза, β -глюкозидаза, амилаза), полученных из изолированного штамма бактерии *Pseudomonas sp.* CL3. Оптимальная исходная концентрация биомассы микроводорослей – 20 г/л. В этих условиях выход глюкозы составил 90,4% (7,86 г/л) (Cheng C.L., Chang J.S., 2011) [5]. Также для повышения эффективности ферментативного гидролиза необходима дорогостоящая или энергоемкая физическая или химическая предварительная обработка биомассы.

На последнем этапе полученные сахара сбраживаются с получением этанола. На настоящий момент существуют два метода получения биоэтанола из микроводорослей: 1) сбраживание внутриклеточного крахмала самими микроводорослями (автоферментация), 2) сбраживание полученных сахаров с использованием других микроорганизмов (гетероферментация).

Водоросли — потенциальные продуценты биоэтанола

| Водоросли | % крахмала или биомасса после экстракции масла (г/сухая масса) | Источник |
|--|--|------------------------------------|
| <i>Saccharina latissima</i> | ~50 (потенциально пищевые вещества) | Adams J.M. et al., 2009 [2]. |
| <i>Green alga</i> NKG 121701 | >50 (крахмал) | Matsumoto M. et al., 2003 [23] |
| <i>Laminaria hyperborean</i> | 55 (потенциально пищевые вещества) | Horn S.H. et al., 2000 [17, 18] |
| <i>Spirogyra</i> sp. | 43,3 (биомасса после экстракции масла) | Hossain A.B.M.S. et al., 2008 [19] |
| <i>Oedogonium</i> sp. | 33,6 (биомасса после экстракции масла) | Hossain A.B.M.S. et al., 2008 [19] |
| <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> UTEX 90 | 53 (крахмал) | Kim M.S. et al., 2006 [21] |
| <i>C. reinhardtii</i> (UTEX2247) | 45 (крахмал) | Hirano A. et al., 1997 [15] |
| <i>C. reinhardtii</i> | 17 (крахмал) | Spolaore P. et al., 2006 [27] |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | 12–17 (крахмал) | Spolaore P. et al., 2006 [27] |
| <i>C. vulgaris</i> | 37 (крахмал) | Hirano A. et al., 1997 [15] |
| <i>Chlorella</i> sp. TISTR 8262 | 21,5 (крахмал) | Rodjaroen S. et al., 2007 [26] |
| <i>Chlorella</i> sp. TISTR 8485 | 27 (крахмал) | Rodjaroen S. et al., 2007 [26] |
| <i>Chlorella</i> sp. TISTR8593 | 22 (крахмал) | Rodjaroen S. et al., 2007 [26] |
| <i>Chlorococcum</i> sp. TISTR8583 | 26 (крахмал) | Rodjaroen S. et al., 2007 [26] |
| <i>Chlorococcum</i> sp. TISTR 8973 | 16,8 (крахмал) | Rodjaroen S. et al., 2007 [26] |
| <i>Scenedesmus</i> sp. TISTR 8579 | 20,4 (крахмал) | Rodjaroen S. et al., 2007 [26] |
| <i>Scenedesmus</i> sp. TISTR 8982 | 13,3 (крахмал) | Rodjaroen S. et al., 2007 [26] |
| <i>S. acuminatus</i> TISTR 8457 | 7,3 (крахмал) | Rodjaroen S. et al., 2007 [26] |
| <i>S. acutiformis</i> TISTR 8495 | 16,4 (крахмал) | Rodjaroen S. et al., 2007 [26] |
| <i>S. acutus</i> TISTR 8447 | 18,6 (крахмал) | Rodjaroen S. et al., 2007 [26] |
| <i>S. arcuatus</i> TISTR 8587 | 12,9 (крахмал) | Rodjaroen S. et al., 2007 [26] |
| <i>S. armatus</i> TISTR 8591 | 15,4 (крахмал) | Rodjaroen S. et al., 2007 [26] |
| <i>S. obliquus</i> TISTR 8522 | 23,7 (крахмал) | Rodjaroen S. et al., 2007 [26] |
| <i>S. obliquus</i> TISTR 8546 | 23,4 (крахмал) | Rodjaroen S. et al., 2007 [26] |

Автоферментация микроводорослей представляет собой анаэробный процесс получения биоэтанола самими микроводорослями через потребление ими внутриклеточного крахмала. Биомасса микроводорослей помещается в светозащищенный цилиндр с темновыми анаэробными условиями. Способность к преобразованию внутриклеточного крахмала в этанол в анаэробных условиях наблюдалась у большинства тестируемых штаммов. Уровни конверсии в этанол при этом значительно отличались. Сравнительно высокий уровень конверсии 30–40% (относительно теоретически возможного выхода 0,56 г этанола / 1 г крахмала) был получен у двух штаммов, *Chlamydomonas reinhardtii* (UTEX2247) и Sak-1. Интересно то, что благодаря полной утилизации кислорода клетками не было никакой необходимости в продувке азотом и для получения этанола не было

необходимости в перемешивании. Значения рН около 7–8, температура 25–30 °С были оптимальными для клеток *Chlamydomonas* (Ueda R. et al., 1996) [28]. Также этанол получался путем автоферментации клеточного крахмала *Chlorococcum littorale*. В данной работе увеличение температуры инкубации повлияло на вид разложения клеточного крахмала и привело к увеличению продукции этанола при 30 °С. Добавление метилвиологена в реакционную смесь резко уменьшило образование водорода, в то время как выработка этанола повысилась в 2,5 раза (Ueno Y. et al. 1998) [29]. Тем не менее процесс автоферментации микроводорослей с целью получения биоэтанола на данный момент не является привлекательным для промышленности в связи с низкой скоростью процесса и относительно невысоким выходом конечного продукта (1–2%).

Гетероферментация с использованием дрожжей и других микроорганизмов, напротив, активно применяется в промышленности. Например, Cheng Y.S. et al., 2013 [6] предлагают после наращивания биомассы *Chlorella variabilis* NC64A обрабатывать ее смесью амилолитических ферментов и подвергать вирусному заражению с целью выделения сахаров. Биоэтанол получают сбраживанием этих сахаров бактериями *Escherichia coli* КО11. Было показано, что наибольшее образование этанола наблюдалось при обработке биомассы водорослей ферментами совместно с вирусным заражением, тогда как минимальный выход этанола — при обработке биомассы только вирусом. Выход этанола составил 63% от теоретически возможного (Cheng Y.S. et al., 2013) [6].

Выделенные из пресноводных источников на юге о. Тайвань микроводоросли, определенные как *Chlorella vulgaris* FSP-E, с содержанием углеводов более 50% от сухой массы, использовались как сырье для получения этанола путем сбраживания их штаммом *Zyotomonas mobilis* ATCC 29191. Ферментацию биомассы микроводорослей штаммом *Zyotomonas mobilis* ATCC 29191 в этанол проводили методами совместного осахаривания и ферментации (SSF) и раздельного осахаривания и ферментации (SHF). Наиболее эффективным был признан процесс раздельного осахаривания и ферментации с применением кислотного гидролиза (1% H₂SO₄). После 12 часов проведения процесса выход этанола составил 87,59% от теоретически возможного (11,66 г/л).

Заключение

Биомасса микроводорослей как исходное сырье для производства биотоплива является хорошей альтернативой высокоэнергетическим культурам растений по причине короткого цикла выращивания, отсутствия конкуренции с сельским хозяйством за пресную воду и посевные площади. Кроме того, необходимые питательные вещества для выращивания микроводорослей могут быть получены из отходов различного происхождения: азот и фосфор из сточных вод, диоксид углерода из дымовых газов.

При расширении использования биомассы микроводорослей для производства липидов и биодизеля возникает проблема использования остаточной биомассы. Одним из наиболее эффективных путей использования биомассы является производство биоэтанола путем сбраживания, что может повысить рентабельность производства биодизеля и липидов. Из двух основных путей получения этанола (авто и гетероферментация) наиболее простым для реализации является автоферментация,

при которой сбраживание крахмала происходит самими микроводорослями в темновых анаэробных условиях. Тем не менее скорость и выход конечного продукта в данном процессе являются довольно низкими по сравнению с традиционным методом гетероферментации (с использованием дрожжей и других микроорганизмов).

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

Литература

1. Намсараев Э.Б., Васильев Р.Г. Технологии прямой конверсии углекислого газа в биотопливо и биопластики с использованием генетически модифицированных цианобактерий // Вестник биотехнологии и физикохимической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2012. — Т. 8. — № 4. — С. 42–51.
2. Adams J.M., Gallagher J.A., Donnison I.S. Fermentation study on *Saccharina latissima* for bioethanol production considering variable pretreatments // J. Appl. Phycol. — 2009. — Vol. 21. — P. 569–574.
3. Araujo G.S., Matos L.J., Goncalves L.R., Fernandes F.A., & Farias W.R. Bioprospecting for oil producing microalgal strains: evaluation of oil and biomass production for ten microalgal strains // Bioresource Technology. — 2011. — Vol. 102(8). — P. 5248–5250.
4. Atteia A., van Lis R., Tielens A.G., & Martin W.F. Anaerobic energy metabolism in unicellular photosynthetic eukaryotes // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. — 2013. — Vol. 1827. — No. 2. — P. 210–223.
5. Cheng C.L., Chang J.S. Hydrolysis of lignocellulosic feedstock by novel cellulases originating from *Pseudomonas* sp. CL3 for fermentative hydrogen production. // Bioresource Technol. — 2011. — Vol. 102(18). — P. 8628–8634.
6. Cheng Y.S., Zheng Y., Labavitch J.M., & Van der Cheynst J.S. Virus infection of *Chlorella variabilis* and enzymatic saccharification of algal biomass for bioethanol production // Bioresource Technology. — 2013. — Vol. 137. — P. 326–331.
7. Chisti Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol // Trends Biotechnol. — 2008. — Vol. 26(3). — P. 126–131.
8. Chiu S.Y., Kao C.Y., Tsai M.T., Ong S.C., Chen C.H., & Lin C.S. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration // Bioresource Technology. — 2009. — Vol. 100(2). — P. 833–838.
9. Domozych D.S., Ciancia M., Fangel J.U., Mikkelsen M.D., Ulvskov P., Willats W.G.T. The cell walls of green algae: a journey through evolution and diversity // Frontiers Plant Sci. — 2012. — Vol. 3. — P. 82.
10. Eriksen N.T., Torben G., Iversen L.J.J. Phototrophic growth in the lumostat: a photobioreactor with online optimization of light intensity // Journal of Applied Phycology. — 1996. — Vol. 8(4/5). — P. 345–352.

11. Gimmler H., Degenhardt B. Alkaliphilic and alkali tolerant algae / In: Rai L.C. & Gaur J.P. (Eds.). *Algal Adaptation to Environmental Stresses: Physiological, Biochemical and Molecular Mechanisms*. — Springer-Verlag, 2001. — P. 259–290.
12. Girio F.M., Fonseca C., Carvalheiro F., Duarte L.C., Marques S., Bogel-Lukasik R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review // *Bioresour. Technol.* — 2010. — Vol. 101(13). — P. 4775–4800.
13. Harun R., Danquah M.K. Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for ethanol production // *Process Biochem.* — 2011. — Vol. 46. — P. 304–309.
14. Harun R., Danquah M.K., Forde G.M. Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* — 2009. — Vol. 85(2). — P. 199–203.
15. Hirano A., Ryohei U., Shin H., Yasuyuki O. CO₂ fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation // *Energy*. — 1997. — Vol. 22. — P. 137–142.
16. Ho S.H., Chen C.-Y., Chang J.-S. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N // *Bioresour. Technol.* — 2012. — Vol. 113. — P. 244–252.
17. Horn S.J., Aasen I.M., Ostgaard K. Ethanol production from seaweed extract // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* — 2000. — Vol. 25 — P. 249–254.
18. Horn S.J., Aasen I.M., Ostgaard K. Production of ethanol from mannitol by *Zymobacter palmae* // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* — 2000. — Vol. 24. — P. 51–57.
19. Hossain A.B.M.S., Saleh A.A., Aishah S., Boyce A.N., Chowdhury P.P., Naquiuddin M. Bioethanol production from agricultural waste biomass as a renewable bioenergy resource in biomaterials / In: Osman N.A.A., Ibrahim F., Abas W.A.B.W., Rahman H.S.A., Ting H.N. (Eds.), *Biomed 2008, Proceedings*, vol. 21. — P. 300–305.
20. John R.P., Anisha G.S., Nampootheri K.M., Pandey A. Micro- and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol // *Bioresour. Technol.* — 2011. — Vol. 102(1). — P. 186–193.
21. Kim M.S., Baek J.S., Yun Y.S., Sim S.J., Park S., Kim S.C. Hydrogen production from *Chlamydomonas reinhardtii* biomass using a two-step conversion process: anaerobic conversion and photosynthetic fermentation // *Int. J. Hydrogen Energy*. — 2006. — Vol. 31. — P. 812–816.
22. Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* — 2002. — Vol. 66(3). — P. 506–577.
23. Matsumoto M., Yokouchi H., Suzuki N., Ohata H., Matsunaga T. Saccharification of marine microalgae using marine bacteria for ethanol production // *Appl. Biochem. Biotechnol.* — 2003. — Vol. 105. — P. 247–254.
24. Moxley G., Zhang Y.H.P. More accurate determination of acidlabile carbohydrates in lignocellulose by modified quantitative saccharification // *Energy Fuels*. — 2007. — Vol. 21(6). — P. 3684–3688.
25. Richmond A. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. — Blackwell Science, Oxford, OX, UK; Ames, Iowa, USA, 2004.
26. Rodjaroen S., Juntawong N., Mahakhant A., Miyamoto K. High biomass production and starch accumulation in native green algal strains and cyanobacterial strains of Thailand Kasetsart // *J. Nat. Sci.* — 2007. — Vol. 41. — P. 570–575.
27. Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A. Review: commercial application of microalgae // *J. Biosci. Bioeng.* — 2006. — Vol. 101. — P. 87–96.
28. Ueda R., Hirayama S., Sugata K., Nakayama H. (1996). Process for the production of ethanol from microalgae. US Patent 5,578,472.
29. Ueno Y., Kurano N., Miyachi S. Ethanol production by dark fermentation in the marine green alga *Chlorococcum littorale* // *J. Ferment. Bioeng.* — 1998. — Vol. 86. — P. 38–43.
30. Wirawan F., Cheng C.L., Kao W.C., Lee D.J., & Chang J.S. Cellulosic ethanol production performance with SSF and SHF processes using immobilized *Zymomonas mobilis* // *Applied Energy*. — 2012. — Vol. 100. — P. 19–26.

THE POTENTIAL OF MICROALGAE AS A SOURCE OF RAW MATERIALS FOR BIOETHANOL PRODUCTION

Z.B. NAMSARAEV, K.V. GORIN, P.M. GOTOVTSEV, A.V. KOMOVA, M.A. LOMONOSOVA,
V.V. BUTYLIN, A.A. SHAPOVALOVA, R.G. VASILOV

National Research Centre «Kurchatov Institute», Moscow

Analysis of microalgae that can be used as a raw material for bioethanol production is presented. At the present time microalgae are used mainly for lipids and biodiesel production, while the utilization of the residual biomass containing a considerable amount of starch and cellulose becomes a problem. One of the most prospective ways of residual biomass utilization is a fermentation of carbohydrates to ethanol. The basic technologies of ethanol production from microalgal biomass are reviewed.

Keywords: microalgae, photosynthesis, fermentation, carbohydrates, cellulose, starch, bioethanol.

ЖИВЫЕ ОРГАНИЗМЫ КАК ОСНОВА БИОТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ

А.Н. РЕШЕТИЛОВ^{1,3*}, В.К. УТЕШЕВ², Т.А. РЕШЕТИЛОВА¹, Р.Г. ВАСИЛОВ³

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

² ФГБУН «Институт биофизики клетки» РАН, Пущино-на-Оке;

³ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

В кратком анализе литературных данных приводится оценка современного направления исследований, в котором биотопливные элементы формируются на основе живых организмов (холодно- и теплокровных) и вырабатывают электрическую энергию за счет окисления органических веществ организма. Эти исследования находятся в начальной фазе своего развития. Рассмотрены различные варианты и перспективы этого подхода.

Ключевые слова: биотопливные элементы, получение электрической энергии, живой организм, биоинженерия, биоэлектрохимия.

Общие положения

Биотопливные элементы (БТЭ) являются системами, в основе функционирования которых лежит реакция биоэлектрокатализа [2], основанная на межфазном переносе заряда и позволяющая производить электроэнергию при окислении органических соединений, служащих топливом, — сахаров [3], спиртов [9, 12], веществ в сточных водах [4], красителей [16] и др. Отличительным моментом БТЭ от общего класса топливных элементов является использование для окисления органических соединений биологического материала — ферментов, клеток, в том числе клеток микроорганизмов. В последнем случае биотопливный элемент носит название микробный БТЭ (МБТЭ). По сути БТЭ относится к классу электрических батарей, общая классификация которых приведена в обзоре [7] и которые отличаются от традиционных химических, прежде всего, тем, что являются перезаряжаемыми, то есть после того как окислена основная порция топлива, можно произвести его новую добавку и система продолжает функционировать определенное время до его полного окисления; можно также производить непрерывный подвод топлива. Важно

отметить, что функционирование БТЭ основано на том же принципе, что и функционирование биологических сенсоров электрохимического типа — на окислении органического соединения и переносе электронов [1].

Можно отметить, что в последние 5 лет стало формироваться новое направление в разработке БТЭ. Его отличием является использование топлива, присутствующего в живом организме — например, глюкозы для получения электроэнергии. При этом величина поглощения энергии из организма за счет отбора окисляемого органического соединения незначительна; вместе с тем полученную электроэнергию можно использовать для полезных целей организма — для питания биосенсорных устройств, работающих в режиме «сенсор — исполнитель», для питания микродозаторов, осуществляющих дозированный ввод лекарственных средств, кардиостимуляторов и т.д. [15]. Однако, поскольку БТЭ относятся к маломощным источникам, одной из основных проблем является накопление электроэнергии для получения необходимого ее количества при выполнении запланированной процедуры.

В данном обзоре рассмотрены некоторые примеры функционирования БТЭ, называемые имплантируемыми, поскольку они сопряжены с живыми организмами, а также рассмотрены перспективы этого направления.

Функционирование БТЭ в живых организмах

БТЭ на основе редокс-ферментов и микроорганизмов образуют два близких класса топливных элементов. МБТЭ используют редокс-ферменты, находящиеся в составе живых клеток. Простота приготовления (бактериальные клетки легко иммобилизуются на поверхности электродов), их устойчивость и продолжительность

© 2013 г. Решетилов А.Н., Утешев В.К., Решетилова Т.А., Васильев Р.Г.

* Автор для переписки:

Решетилов 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

активного состояния, которое обеспечивается тем, что бактерии могут размножаться и регенерировать, доступность к практически неограниченному перечню субстратов и возможность их полного окисления являются главными особенностями микробных элементов. Они определяют их использование в широком спектре устройств. Ферментные же топливные элементы, с одной стороны, используют выделенные или изолированные редокс-ферменты, которые принимают непосредственное участие в работе биоэлектрохимической системы. Находясь без защищающей их клеточной мембраны, ферменты более уязвимы для различных повреждающих воздействий. Вместе с тем они обеспечивают высокую специфичность реакции. Специфичность может эффективно использоваться, позволяя, например, создавать элементы, в которых анод и катод не разделены физически, что дает возможность производить значительное упрощение конструкции и миниатюризацию устройств [15]. Получаемая миниатюризация позволяет подойти к концепции имплантируемого топливного элемента, с помощью которого можно получать электрическую энергию из крови или соответствующей ей жидкости организма для снабжения энергией таких устройств, как водители (пейсмейкеры) ритма, микропомпы и др.

Создание БТЭ сопряжено с решением ряда проблем общего характера, к которым относятся размер, стандартизация реальных параметров, этически-техническая проблема. Так, при фундаментальных исследованиях используются размеры элементов БТЭ среднего диапазона — площадь электродов и самих устройств составляет величину порядка квадратных/кубических сантиметров. Переход к реальным системам требует их увеличения до квадратных метров в случае микробных систем (получение электроэнергии при очистке сточных вод) и снижения до микрометровых размеров в случае использования ферментов. Как правило, такое масштабирование связано не только с заданием размеров электродов — требуется изменять конструкцию ячейки, систему подачи растворов и т.д. Стандартизация реальных параметров означает, что в лабораторных условиях с высокой строгостью должны быть соблюдены условия постоянства параметров — состава искусственных растворов, рН, температуры и т.д. Эти параметры должны быть наиболее близки к их реальным значениям, однако важно понимать, что это не всегда возможно, и достичь абсолютную схожесть трудно в силу сложности состава реальных образцов. Этически-техническая проблема связана с той фазой развития БТЭ, когда происходит его трансформация из состояния *in vitro* в состояние *in vivo*. В зависимости от типа животного — беспозвоночные, позво-

ночные, млекопитающие, *Antropomorphidae* — этический барьер функционирования может быть значительным. Из существенных требований к БТЭ в этом случае можно упомянуть следующие. Анодный и катодный ферменты должны быть идеально иммобилизованы на электроде, при этом исключается утечка компонентов. Должна быть обеспечена высокая специфичность ферментов, для того чтобы избежать неконтролируемых неспецифических реакций. Недопустимо использование растворимых редокс-медиаторов и кофакторов. Имплантированные электроды должны быть биосовместимы (нейтральны по отношению к биоматериалу) для избежания тромбообразования [15].

По данным Schroder U. [15], первый имплантированный животному БТЭ был описан в 2010 году. В упоминающейся Schroder работе на аноде была иммобилизована глюкозооксидаза, а фенолоксидаза на катоде; сам элемент был имплантирован в брюшную полость крысы. Для упрощения структуры системы ферменты и медиаторы погружали в диализные мешочки. Недавно значительные успехи были продемонстрированы независимыми исследованиями двух групп. В этих исследованиях миниатюризация была достигнута за счет надежной иммобилизации редокс-ферментов. Несмотря на общую схожесть подходов обеих групп, каждая следовала своей собственной методологии разработок по иммобилизации и типу имплантации. Одна группа выполняла исследования на таракане (исследования под руководством Daniel Scherson из Case Western Reserve University, США), другая — на улитке (исследования под руководством Evgeny Katz, совместные исследования сотрудников из Clarkson University, США и Ben-Gurion University of the Negev, Израиль). Эти беспозвоночные обладают открытой системой циркуляции жидкости, играющей роль крови, которая встречается у моллюсков, пауков, ракообразных и насекомых. В таких организмах эквивалент крови, так называемая гемолимфа, не заключен в сосуды, а свободно перетекает по организму, снабжая его питательными веществами и кислородом. Такая открытая система позволяет сравнительно просто имплантировать компоненты биотопливной ячейки в организм, не нанося серьезных повреждений животному.

В группе, включающей коллектив из США и Израиля, исследования были выполнены на улитке [8] и моллюске [17]. Исследователи на этих примерах впервые показали функционирование имплантированных безмембранных биотопливных ячеек, состоящих из двух биоэлектродов, содержащих ферменты и вырабатывающих электроэнергию. Животные при этом находились в состоянии свободно живущего и перемещающегося

организма; при съеме тока для электродов был обеспечен режим безмедиаторного переноса. Для этой цели была использована пирролохинолинхинон (PQQ)-зависимая глюкозодегидрогеназа (анодный катализатор) и кислородвосстанавливающая лакказа (катодный катализатор), которые были ковалентно привязаны к углеродным нанотрубкам с помощью гетеробифункционального кросс-линкера (1-сукцинимидиловый эфир 1-пиренебутановой кислоты) (1-pyrenebutanoic acid succinimidyl ester). Такая конструкция обеспечивала формирование электродов, поддерживающих прямой перенос электрона. Имплантированные топливные элементы находились в функционирующем состоянии более двух недель без признаков видимой инактивации ферментов.

В конкурирующей группе из Case Western Reserve University (США) был выбран ряд отличающихся решений. Прежде всего, исследователи имплантировали топливный элемент в брюшную область таракана (*Blaberus discoidalis*). У этого животного, как и у тараканов других видов, основным сахаром крови является трегалоза — дисахарид, в котором два остатка D-глюкозы связаны α, α -гликозидной связью. Поскольку не существует фермента, окисляющего этот дисахарид, авторы использовали биферментный электрод, включающий трегалазу (гидролазу, расщепляющую трегалозу на две глюкозные молекулы) и глюкозооксидазу. Такая комбинация гидролазы и оксидоредуктазы является крайне удачно подобранной, поскольку становится возможным адаптировать анодный катализатор к доминирующей композиции углеводов. В противоположность рассмотренному ранее варианту передача электрона с фермента на электрод происходила за счет медиаторного переноса, в котором использовали иммобилизованный бипиридиновый осмиевый комплекс. В этом исследовании катод, выполненный на основе билирубиноксидазы, вообще не имплантировали в животное. Очевидно, в этом случае авторы ставили цель создать полуимплантируемую биотопливную систему, которая использует неимплантируемый воздушный катод. Такая возможность уже была ранее продемонстрирована Miyake T. et al. [11]; цель исследования состояла в преодолении проблемы низкого содержания кислорода в жидкости тела, для чего катод выносили наружу на внешнюю поверхность кожи. Анод имел игольчатую форму и погружался в ткань; катод был проницаем для газа и использовал кислород воздуха. Поверхность катода была высокой за счет оптимизированной гидрофобности. При погружении четырех анодов в ткань апельсина происходило окисление фруктозы и получали максимальную мощность 26,5 мкВт

(115 мкВт/см²) при 0,34 В. Сведодиод, питаемый от БТЭ, являлся индикатором уровня сахара в апельсине. Исследовали также генерацию электричества при погружении игольчатого анода и окислении глюкозы в ушных сосудах кролика. Конечно, такое решение представляется оригинальным, однако при этом требуется обеспечение беспрепятственного потока протонов от анода к катоду.

Методические особенности исследования живых организмов

К настоящему времени опубликовано относительно небольшое количество работ по использованию энергии или использованию отдельно топливных компонентов живого организма для питания БТЭ. В работе [5] рассматривали функционирование БТЭ, в который подавали буферный раствор либо сыворотку крови человека. Биоданод содержал PQQ-зависимую, иммобилизованную на МУНТ (многостенные углеродные нанотрубки) и стабилизированную полипирролом. Катод, имеющий площадь 0,78 мм², был выполнен из стеклогуглеродного материала и содержал лакказу. БТЭ функционировал при 37 °С при подаче 5 мМ глюкозы. Топливный элемент развивал максимальную мощность 1,1 мкВт/мм² при 0,167 В в буферном растворе и 0,167 мкВт при 0,151 В при использовании сыворотки человека. Rasmussen M. et al. [13] описали функционирование биотопливного элемента в организме насекомого (таракан *B. discoidalis*), для которого основной окисляемый реагент — трегалоза; БТЭ развивал мощность 55 мкВт/см² при 0,2 В. Wang X. et al. [18] показали, что на сыворотке крови человека можно получить мощность 2,8 мкВт/см² при 0,47 В; авторы использовали золотые электроды с ферментами билирубиноксидазой (анод) и целлобиозодегидрогеназой (катод), которые обеспечивали безмедиаторный транспорт. Создание БТЭ на основе улитки и двусторчатого моллюска, как упоминалось выше, было представлено в работах [8, 17]. БТЭ, встроенный в организм омара описан в работе [10]; БТЭ при 0,54 В развивал мощность 0,64 мВт/см², внутреннее сопротивление составляло 500 Ом. Лакказа (анод) и глюкозодегидрогеназа (катод) были использованы для иммобилизации на МУНТ для обеспечения прямого переноса заряда.

Представляется важным осветить некоторые методические моменты выполненных исследований, которые позволяют более глубоко познакомиться с сутью проблемы.

Проблемы накопления электроэнергии

Для практического использования БТЭ важно иметь высокое рабочее напряжение (составляющее величину порядка 1,5–2,0 В), более высокое значение

тока и мощности. При современном уровне развития электронных и биоинженерных технологий параметры, которые позволили бы реализовать практическое применение БТЭ, можно получить различными способами. Так, чтобы повысить напряжение, можно осуществлять комбинированный подход последовательного включения топливных элементов, предложенный в 1999 году Сасаки и Карубе [14]; изготовленная авторами ячейка БТЭ имела структуру интегрированной ферментной микробатареи, содержащей иммобилизованную глюкозооксидазу, ионообменную мембрану и платиновые электроды. Для эффективного накопления электроэнергии можно воспользоваться сбором энергии на суперконденсаторах (ионисторах), описанных в работе [6]. Этот же способ накопления электрической энергии применили в работе [17]. БТЭ соединяли между собой как параллельно, так и последовательно. Для накопления электроэнергии использовали конденсатор емкостью 1 Ф, к которому подключали параллельно соединенные БТЭ. В течение 1 ч зарядки напряжение на конденсаторе поднималось до 240 мВ, а величина заряда соответствовала 28,8 мДж. Такое количество энергии было достаточным, чтобы привести в движение электрический двигатель, имеющий сопротивление 6,5 Ом.

Интересный способ накопления энергии разработан фирмой Texas Instruments, которая представила новое поколение микросхем управления питанием для сбора энергии. В частности, фирма предложила исключительно эффективный повышающий конвертер напряжения для работы с микро- и милливаттными источниками энергии, генерируемой фотогальваническими, термоэлектрическими, электромагнитными и вибрационными преобразователями, который может накапливать извлеченную энергию в элементах различных типов, включая аккумуляторы и ионисторы.

Каждый из названных путей накопления электроэнергии представляется интересным и важным. Мы считаем, что для отработки любого пути, в том числе связи «топливный элемент — блок управления питанием для сбора энергии», можно использовать так называемые «Микробные топливные элементы для исследовательских целей». Эти элементы должны быть легко изменяемы, чтобы получать зависимость их работы от того или иного параметра. К ним можно предъявить единственное требование — они должны быть относительно стабильными какое-то время (скажем, 24–48 ч), например, по напряжению. За это время можно провести несколько проб по отработке связи «топливный элемент — блок управления питанием для сбора энергии».

Заключение

В настоящее время развиваются технологии создания биотопливных элементов, в которых используется энергия или отдельные топливные компоненты живого организма в качестве топлива. Развиваемые мощности невелики и находятся в пределах микро- — милливаттного диапазона. Таким образом, существует задача, как наиболее эффективно производить сбор нарабатываемой электроэнергии, для чего имеется несколько подходов. Безусловно, положительным является стремление исследователей расширить спектр организмов, позволяющих получать энергию таким образом.

Литература

1. Беннето Х.П., Бокс Дж., Деланей Дж.М., Мейсон Дж.Р., Роллер С.Д., Стирлинг Дж. Л., Тэрстон К.Ф. Редокс-медиаторные электрохимические процессы с участием цельных микроорганизмов: от топливных элементов к биосенсорам // Биосенсоры: основы и приложения. Ред. Тернер Э., Карубе И., Уилсон Дж. — М.: Мир, 1992. — С. 238–256.
2. Варфоломеев С.Д., Тарасевич М.Р., Ярополов А.И., Березин И.В., Богдановская В.А. // Государственный реестр открытий СССР, открытие № 311, 19 декабря 1985 г.
3. Решетилов А.Н., Понаморева О.Н., Решетилова Т.А., Богдановская В.А. Генерация электрической энергии в биотопливном элементе на основе клеток микроорганизмов. // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2005. — Т. 1(2). — С. 54–62.
4. Aldrovandi A., Marsili E., Paganin P., Tabacchioni S., Giordano A. Sustainable power production in a membraneless and mediator-less synthetic wastewater microbial fuel cell // Biores. Technol. — 2009. — Vol. 100. — P. 3252–3260.
5. Ammam M., Fransaeer J. Glucose/O₂ biofuel cell based on enzymes, redox mediators, and multiple-walled carbon nanotubes deposited by AC-electrophoresis then stabilized by electropolymerized polypyrrole // Biotechnol Bioeng. — 2012. — Vol. 109(7). — P. 1601–1609.
6. Barsukov V.Z. and Doninger J.E. On the theoretical prerequisites for application of novel materials in promising energy systems / In: New carbon based materials for electrochemical energy storage systems: Batteries, Supercapacitors and Fuel Cells. Barsukov V., Johnson C., Doninger E. (Eds.) (NATO Science Series II: Mathematics, Physics and Chemistry, Vol. 229). — Springer. NY, 2006. — P. 297–308.
7. Bullen R.A., Arnot T.C., Lakeman J.B., Walsh F.C. Biofuel cells and their development // Biosensors and Bioelectronics. — 2006. — Vol. 21(15). — P. 2015–2045.
8. Halamkova L., Halamek J., Bocharova V., Szczupak A., Alfonta L., Katz E. Implanted biofuel cell operating in a living

- snail // *J. Am. Chem. Soc.* – 2012. – Vol. 134(11). – P. 5040–5043.
9. *Halme A. and Zhang X-Ch.* Biological fuel cells: Processing substrates to electricity by the aid of biocatalysts / In: *Bioseparation and Bioprocessing*, Ganapathy Subramanian (Ed.). – Weinheim: Wiley-VCH. – 2007. – P. 355–382.
10. *MacVittie K., Halamek J., Halamkova L., Southcott M., Jemison W.D., Lobel R., Katz E.* From «cyborg» lobsters to a pacemaker powered by implantable biofuel cells // *Energy & Environmental Science.* – 2013. – Vol. 6(1). – P. 81–86.
11. *Miyake T., Haneda K., Nagai N., Yatagawa Y., Onami H., Yoshino S., Abe T., Nishizawa M.* Enzymatic biofuel cells designed for direct power generation from biofluids in living organisms // *Energy Environ. Sci.* – 2011. – Vol. 4. – P. 5008–5012.
12. *Ramanavicius A., Kausaite A., Ramanaviciene A.* Enzymatic biofuel cell based on anode and cathode powered by ethanol // *Biosensors and Bioelectronics.* – 2008. – Vol. 24. – P. 761–766.
13. *Rasmussen M., Ritzmann R.E., Lee I., Pollack A.J., Scherson D.* An implantable biofuel cell for a live insect // *Journal of the American Chemical Society.* – 2012. – Vol. 134(3). – P. 1458–1460.
14. *Sasaki S. and Karube I.* The development of microfabricated biocatalytic fuel cells // *Trends Biotechnol.* – 1999. – Vol. 17(2). – P. 50–52.
15. *Schroder U.* From in vitro to in vivo – biofuel cells are maturing // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2012. – Vol. 51. – P. 7370–7372.
16. *Sun J., Hu Y.Y., Bi Z., Cao Y.Q.* Simultaneous decolorization of azo dye and bioelectricity generation using a microfiltration membrane air-cathode single-chamber microbial fuel cell // *Biores. Technol.* – 2009. – Vol. 100. – P. 3185–3192.
17. *Szczupak A., Halamek J., Halamkova L., Bocharova V., Alfonta L. and Katz E.* Living battery – biofuel cells operating in vivo in clams // *The Royal Society of Chemistry.* – 2012. – 5 p. DOI: 10.1039/c2ee21626d
18. *Wang X., Falk M., Ortiz R., Matsumura H., Bobacka J., Ludwig R., Bergelin M., Gorton L., Shleev S.* Mediatorless sugar/oxygen enzymatic fuel cells based on gold nanoparticle-modified electrodes // *Biosens. Bioelectron.* – 2012. – Vol. 31(1). – P. 219–225.

LIVING ORGANISMS AS THE BASIS ELEMENTS OF BIOFUEL

A.N. RESHETILOV^{1,3}, V.K. UTESHEV², T.A. RESHETILOVA¹, R.G. VASILOV³

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

² Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino, Moscow region;

³ National Research Centre «Kurchatov Institute», Moscow

In a brief analysis of published data provides an assessment of contemporary research areas in which biofuel elements formed on the basis of living organisms (cold- and warm-blooded) and generate electricity by oxidation of organic substances the body. These studies are in the early phase of its development. Different versions of this approach and perspectives are considered.

Keywords: biofuel elements, getting electricity, living organism, bioengineering, bioelectrochemistry.

МАКСИМАЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОНВЕРСИИ СОЛНЕЧНОЙ ЭНЕРГИИ В БИОТОПЛИВО И ПУТИ ЕЕ ПОВЫШЕНИЯ

А.В. КОМОВА, Э.Б. НАМСАРАЕВ*, П.М. ГОТОВЦЕВ,
К.В. ГОРИН, Г.У. БАДРАНОВА, Р.Г. ВАСИЛОВ

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

В статье приводится обзор опубликованных данных по эффективности конверсии солнечного света в биомассу и путях ее повышения. Теоретические расчеты показывают, что максимальная эффективность конверсии солнечного света в биомассу составляет 11,9%. С учетом потерь на различных этапах фотосинтеза теоретический максимум эффективности составляет 4,6% для растений с С3-типом метаболизма и 6% для растений с С4-типом метаболизма. Максимальные величины первичной продукции органического вещества, зарегистрированные в природных и крупномасштабных искусственных системах, составляют 13–14 г С/м²·сутки. Это соответствует приблизительно 1% конверсии энергии солнечного света в биомассу. В экспериментальных условиях при небольших объемах культивирования одноклеточных микроорганизмов может быть достигнута эффективность до 7%.

Ключевые слова: эффективность фотосинтеза, первичная продукция, солнечная энергия, биотопливо.

Введение

На всем протяжении XX века основным источником энергии являлось ископаемое топливо (нефть, газ, уголь). В настоящее время на долю ископаемого топлива приходится 85–90% всей потребляемой человечеством энергии [4]. При этом в ближайшее время ожидается сокращение рентабельных запасов ископаемого топлива при одновременном повышении затрат на его добычу. Альтернативой использованию ископаемого топлива является производство топлива из возобновляемых источников. Крупнейшим источником возобновляемой энергии на Земле является солнце. На поверхность Земли с солнечным излучением попадает объем энергии приблизительно в 120000 тераватт, в то время как ежедневно человечеством потребляется около 15 тераватт (Blankenship R.E. et al., 2011) [2]. Однако использование солнечной энергии имеет существенные ограничения, связанные с: 1) вариацией интенсивности в зависимости от широты местности, 2) сильными колебаниями объема энергии в течение суток и года, 3) ограниченной эффективностью фотосинтеза. Данный обзор посвящен анализу

опубликованных данных по эффективности конверсии солнечного света в биомассу и путях ее повышения.

Эффективность конверсии солнечного света в природных экосистемах

Максимальные величины первичной продукции органического вещества были обнаружены в содовых озерах Восточно-Африканской рифтовой зоны и составляют 13 г С/м²·сутки, при средних величинах для тех же озер 1–7 г С/м²·сутки (Melack J.M. and Kilham P., 1974 [7]; Oduor S.O. and Schagerl M., 2007 [9]). Сравнимые значения были получены при изучении открытых фотобиореакторов для выращивания цианобактерии *Spirulina* в Израиле — до 14 г С/м²·сутки (Walker D.A., 2009) [11]. Расчеты показывают, что данный уровень продуктивности эквивалентен примерно 1% конверсии энергии солнечного света, исходя из объема световой энергии в 5141 ккал/м² за 12-часовой световой день и среднего содержания энергии в 4,25 ккал на грамм растительной биомассы [11].

В большинстве других экосистем максимальные значения первичной продукции гораздо ниже, например, в соленых озерах юга Сибири максимальная скорость общего фотосинтеза достигает 3,86 г С/м²·сутки. (Намсараев Б.Б., Намсараев Э.Б., 2007) [1]. Среднегодовая продуктивность мирового океана составляет приблизительно 0,38 г С/м²·сутки, а наземных систем — 1,16 г С/м²·сутки (Field C.B., 1998) [5].

© 2013 г. Комова А.В., Намсараев Э.Б., Готовцев П.М., Горин К.В., Бадранова Г.У., Василов Р.Г.

* Автор для переписки:

Намсараев Э.Б.

НИЦ «Курчатовский институт», НТК биоэнергетики
123182 Москва, пл. Академика Курчатова, 1

Теоретическая эффективность конверсии солнечного света в фотосинтезе

Для расчета теоретической максимальной эффективности фотосинтеза можно принять максимум абсорбции солнечной энергии хлорофиллом при 680 нм и конечным продуктом — углевод. Z-схема фотосинтеза предполагает, что на каждую молекулу кислорода, высвобождаемую из воды, и на каждую молекулу углекислого газа, фиксируемую в органическое вещество, используется четыре фотона. Фотон красного света с длиной волны 680 нм имеет энергию приблизительно 42 ккал (176 кДж). При сжигании одного грамма глюкозы ($C_6H_{12}O_6$) высвобождается 672 ккал. Таким образом, формирование одного звена (CH_2O) требует энергии как минимум $672/6=112$ ккал (468 кДж). Если учесть объем энергии в 8 фотонах красного света, то эффективность конверсии солнечного света будет составлять 33% ($112/(8 \cdot 42) \cdot 100$). Однако из всего солнечного спектра лишь около 50% является фотосинтетически активным излучением (ФАИ). При этом в среднем энергия фотона видимого света составляет 50 ккал (209 кДж). Средняя потребность растений с C3-типом метаболизма в квантах света составляет 9,4. Таким образом, поставляя полученные величины, можно вычислить, что теоретическая эффективность фотосинтеза составляет 11,9% ($112/(9,4 \cdot 50) \cdot 0,5 \cdot 100$) [11].

Реальная эффективность фотосинтеза зависит от ряда внешних факторов и потерь энергии в ходе внутриклеточных процессов. К основным факторам относятся интенсивность света, температура, содержание CO_2 и т.д. Так, например, теоретические расчеты фотосинтеза обычно предполагают, что процесс происходит при температуре 30 °C и современном уровне углекислого газа в атмосфере (380 ppm). Тем не менее температурные зависимости фотосинтеза и дыхания достаточно сложны. Дыхание увеличивается экспоненциально в пределах температур от 0 до 50 °C, пока не будет достигнут максимум. Фотосинтез у водорослей также ускоряется при росте температур от 0 до 20 °C. В случаях, когда открытые пруды культивирования микроводорослей, обладающие большой теплоемкостью, располагаются в местах, где пониженные ночные температуры сочетаются с резким переходом от темноты к полному свету, утром процесс фотосинтеза начинается очень медленно, а вечером также медленно угасает дыхание.

Помимо факторов окружающей среды, на эффективность фотосинтеза влияет и ряд внутренних факторов. Потери энергии на различных этапах (например, фотодыхание и др.) значительно снижают реальные показате-

ли эффективности. Таким образом, с теоретического максимума 11,9% расчетная величина эффективности опускается до 4,6% для растений с C3-типом метаболизма и 6% для растений с C4-типом метаболизма (Zhu X-G., 2010) [12]. Эффективность преобразования солнечной энергии в энергию химических связей также различна у разных групп организмов. Для одноклеточных микроводорослей эта величина составляет 1–4,5% [12]. При этом некоторые цианобактерии после генетической модификации способны преобразовать в биомассу и биотопливо до 7% солнечной энергии (Robertson D.E., 2011) [10].

Важно также учитывать эффективность пути фиксации углекислоты, который функционирует в том или ином организме (Boyle N.R. and Morgan J.A., 2011) [3]. Так, у фототрофных организмов присутствуют три пути фиксации CO_2 : восстановительный пентозофосфатный цикл (цикл Кальвина: растения, микроводоросли, цианобактерии, α -, β -, γ -протеобактерии), восстановительный цикл трикарбоновых кислот (цикл Арнона: представители групп Chlorobi, Aquificae, Nitrospira, α -, δ -, ϵ -Proteobacteria), 3-гидроксипропионатный цикл (представители группы Chloroflexi). Наиболее эффективным по количеству поглощенных фотонов является цикл Арнона (11 фотонов), потом следует цикл Кальвина (13,9 фотонов). Наименее эффективен 3-гидроксипропионатный цикл (15,3 фотонов). Для фиксации одного моля CO_2 в цикле Арнона затрачивается 2401 КДж, в цикле Кальвина 2439 КДж, а в 3-гидроксипропионатном цикле 3152 КДж. Таким образом, подавляющее большинство биомассы в биосфере производится через цикл Кальвина, который не является самым эффективным.

Пути повышения эффективности фотосинтеза

Повышение эффективности фотосинтеза теоретически может проходить по нескольким направлениям [2]. Прежде всего, это расширение возможностей светособирающих пигментов по использованию солнечного спектра. Полосы поглощения двух фотосистем окислительных фотосинтетиков достаточно близки, и они не включают большую часть спектра. Возможность более полно использовать спектр солнечного света, в том числе и богатую энергией голубую часть (она может поглощаться, но энергия частично рассеивается в виде тепла), может существенно повысить эффективность процесса фотосинтеза. Некоторые виды цианобактерий обладают хлорофиллами, способными абсорбировать дальний инфракрасный свет (740–750 нм), и могут запасать большее количество энергии. Недавно был

синтезирован искусственный бактериохлорофилл *f*, пик поглощения которого находится в районе 700 нм, как и максимум спектра солнечного излучения (Harada J., 2012) [6]. Этот бактериохлорофилл способен передавать энергию на другой бактериохлорофилл и функционирует *in vivo*, что делает его перспективным объектом для биотехнологии.

Фотосинтетические системы содержат светособирающие комплексы, где пигменты собирают энергию и передают ее на реакционные центры. Фотосинтетический аппарат не способен захватить и использовать сразу всю получаемую энергию. В листьях на ярком свете около 80% поглощенной энергии должно рассеяться, иначе фотосистема будет повреждена. В фотосинтезирующих организмах существуют способы предотвращения фотоповреждений и механизмы восстановления. Однако получается, что клетки, лежащие ближе к освещенной поверхности, вынуждены рассеивать энергию, в то время как глубоко лежащие клетки страдают от недостатка света. Общая эффективность при этом снижается. Методом предотвращения такой проблемы может быть уменьшение размера антенны (Mitra M. and Melis A., 2008) [8]. Сильно разветвленные светособирающие антенны одновременно уменьшают насыщение светом на поверхности и затенение в глубоких слоях. Это способствует более однородному освещению. У высших растений для той же цели можно изменять архитектуру растения, чтобы свет проникал к более низким частям кроны.

Общая фотохимическая эффективность снижается из-за того, что фотосистемы окислительных фотосинтетиков конкурируют между собой за одну часть спектра. Решением проблемы может быть модификация фотосистем с использованием в одной из них бактериохлорофилла из аноксигенного фотосинтетического микроорганизма с максимумом поглощения около 1100 нм. Особенно важно правильно направить энергетический поток с антенн, поглощающих в пределах 400–730 нм и 730–1100 нм, на реакционные центры.

Акклиматизация фотосинтезирующих организмов к более высокому уровню углекислого газа может снизить оксигеназную активность рибулозобисфосфаткарбоксилазы (РуБисКо), ключевого фермента цикла Кальвина и таким образом снизит потери на фотодыхание. Потери на фотодыхание составляют около 25% от запасенной организмом энергии. Около 30% всей запасаемой клетками энергии идет на рост и поддержание жизнедеятельности клетки, в свою очередь, часть этой энергии идет на синтез РуБисКо, самого

распространенного фермента на планете. У С4-растений углекислый газ находится в больших концентрациях вблизи РуБисКо, что позволяет ферменту работать более эффективно. Следовательно, внедрение С4-пути в другие организмы может быть достаточно эффективным как с точки зрения энергонакопления, так и с точки зрения экономии энергии и вещества для синтеза избыточного количества РуБисКо. Помимо того, эффективность РуБисКо может быть повышена путем создания улучшенных форм фермента с более высоким сродством к СО₂, чем к О₂. Некоторые встречающиеся в природе модификации РуБисКо более приспособлены к высокому содержанию углекислого газа. Таким образом, перспективным путем блокирования фотодыхания могло бы стать инкубирование фотосинтезирующих организмов с продуктами сгорания ископаемого топлива или биомассы. Такие газы обычно содержат до 10% СО₂, и этого количества достаточно для практически полного подавления фотодыхания.

Помимо улучшений фермента и работы цикла Кальвина, возможно замещение цикла Кальвина другим циклом фиксации углерода. Большинство известных альтернативных циклов крайне чувствительно к кислороду, однако гидроксипропионатный цикл может использоваться в том числе и в богатой кислородом среде.

Литература

1. Намсараев Б.Б., Намсараев Э.Б. Микробные процессы круговорота углерода и условия среды обитания в щелочных озерах Забайкалья и Монголии / Труды института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН. — М.: Наука, 2007. — 398 с.
2. Blankenship R.E., Tiede D.M., Barber J., Brudvig G.W., Fleming G., Ghirardi, M., ... & Sayre R.T. Comparing photosynthetic and photovoltaic efficiencies and recognizing the potential for improvement // *Science*. — 2011. — Vol. 332(6031). — P. 805–809.
3. Boyle N.R., & Morgan J.A. Computation of metabolic fluxes and efficiencies for biological carbon dioxide fixation // *Metabolic Engineering*. — 2011. — Vol. 13(2). — P. 150–158.
4. Concepcion J.J., House R.L., Papanikolas J.M., Meyer T.J. Chemical approaches to artificial photosynthesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2012 Sep 25. — Vol. 109(39). — P. 15560–15564.
5. Field C.B., Behrenfeld M.J., Randerson J.T., & Falkowski P. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components // *Science*. — 1998. — Vol. 281(5374). — P. 237–240.

6. Harada J., Mizoguchi T., Tsukatani Y., Noguchi M., & Tamiaki H. A seventh bacterial chlorophyll driving a large light-harvesting antenna // *Scientific Reports*. – 2012. – 2.
7. Melack J.M., & Kilham P. Photosynthetic rates of phytoplankton in East African alkaline, saline lakes // *Limnol. Oceanogr.* – 1974. – Vol. 19. – P. 743–755.
8. Mitra M., & Melis A. Optical properties of microalgae for enhanced biofuels production // *Optics Express*. – 2008. – Vol. 16(26). – P. 21807–21820.
9. Oduor S.O., & Schagerl M. Phytoplankton primary productivity characteristics in response to photosynthetically active radiation in three Kenyan Rift Valley saline–alkaline lakes // *Journal of Plankton Research*. – 2007. – Vol. 29(12). – P. 1041–1050.
10. Robertson D.E., Jacobson S.A., Morgan F., Berry D., Church G.M., Afeyan N.B. A new dawn for industrial photosynthesis // *Photosynth. Res.* – 2011. – Vol. 107. – P. 269–277.
11. Walker D.A. Biofuels, facts, fantasy, and feasibility // *Journal of Applied Phycology*. – 2009. – Vol. 21(5). – P. 509–517.
12. Zhu X.-G., Long S.P., Ort D.R. Improving photosynthetic efficiency for greater yield // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2010. – Vol. 61. – P. 235–261.

MAXIMAL EFFICIENCY AND THE WAYS TO INCREASE SOLAR ENERGY CONVERSION IN BIOFUEL

A.V. KOMOVA, Z.B. NAMSARAEV, P.M. GOTOVTSEV, K.V. GORIN,
G.U. BADRANOVA, R.G. VASILOV

National Research Centre «Kurchatov Institute», Moscow

The reported data on the efficiency and the ways to increase solar energy conversion into biomass are reviewed. According to the theoretical calculations maximal efficiency of conversion of solar energy in biomass is 11.9%. With account taken of the losses on stages of photosynthesis theoretical efficiency maximum is 4.6% for the C3-plants and 6% for the C4-plants. Maximal values of primary production in natural and large-scaled artificial systems are 13–14 g C/m²·day. It corresponds to 1% solar energy conversion into biomass. In experimental conditions unicellular microorganisms cultivated in small volumes can show efficiency of up to 7%.

Keywords: photosynthesis efficiency, primary production, solar energy, biofuel.

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКАЯ ИМПЕДАНСНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ В ПРИМЕНЕНИИ К ИССЛЕДОВАНИЯМ МИКРОБНЫХ БИОТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ

А.Н. РЕШЕТИЛОВ^{1,3*}, В.В. ЕМЕЦ², А.Н. КЛЮЕВ², Т.А. РЕШЕТИЛОВА¹, Р.Г. ВАСИЛОВ³

¹ ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина» РАН, Пушкино-на-Оке;

² ФГБУН «Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина» РАН,

³ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

Обзор с использованием собственных исследований. Рассматривается применение электрохимической импедансной спектроскопии в изучении микробных биотопливных элементов (МБТЭ). Электрохимическая импедансная спектроскопия (ЭИС) до настоящего времени являлась, в основном, инструментом для электрохимических исследований, не связанных с применением биологического материала. Вместе с тем ЭИС обеспечивает изучение электрохимических параметров, которые по сути метода могут быть применимы к любому типу материалов — как неорганических, так и органических, в том числе и к биоматериалу. Этот подход является адекватным в изучении электрохимических свойств компонентов биотопливных элементов. Основная мысль, которую хотели подчеркнуть авторы обзора, состоит в том, что развитие тематики БТЭ позволит с помощью ЭИС сделать новые шаги в биоэнергетике. В частности, ЭИС дает возможность оптимизировать работу БТЭ путем разделения и мониторинга отдельных параметров, отвечающих за омические, транспортные и кинетические эффекты в БТЭ.

Ключевые слова: электрохимическая импедансная спектроскопия, биотопливные элементы, биоинженерия, биоэлектрохимия.

Многие электрохимические методы характеризуются тем, что на измерительную ячейку подают фиксированное напряжение и регистрируют возникающий при этом ток в цепи между рабочим и вспомогательным электродом. На таком принципе основана работа биосенсоров амперометрического типа. В последнее десятилетие возрос интерес к использованию переменных (синусоидальных) напряжений для исследования электродных процессов в системах, содержащих биологический материал [1, 2]. Безотносительно к типу исследуемого материала/образца данный подход обладает двумя преимуществами. Так, наряду с высоким значением отношения сигнал/шум он позволяет использовать обычную технику и разработанный математический аппарат гармонического анализа; кроме того, в процессе измерения можно менять не только

напряжение, но и частоту возбуждающего сигнала, что дает возможность рассматривать этот метод как одну из форм спектроскопии [3]. Сказанное можно пояснить такими словами. Всем знакома идея использования зависящего от частоты поглощения ультрафиолетового, видимого и инфракрасного света для анализа биологических и других материалов. Допустимо предположить, что аналогичное поглощение электрической энергии более низких частот можно использовать в биоаналитических системах для их описания. При этом электрод выступает как посредник между возбуждающим электрическим полем и исследуемым образцом. В этом случае можно изучать частотно-зависимые, пассивные электрические свойства системы, состоящей из электродов и биологического материала; иными словами, можно изучать импеданс системы [3].

В данной работе кратко рассмотрены основополагающие теоретические основы ЭИС и применение этого подхода к анализу работы МБТЭ.

Теоретическая основа

Термин «импеданс» был введен в конце XIX века английским физиком Оливером Хевисайдом, применившим вычисления с комплексными величинами к обработ-

© 2013 г. Решетилов А.Н., Емец В.В., Ключев А.Н., Решетилова Т.А., Васильев Р.Г.

* Автор для переписки:

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

ке сигналов электрических цепей. С тех пор метод импедансных измерений использовали во многих областях электрохимии — для исследования кинетики электродных процессов, изучения свойств двойного электрического слоя (ДЭС), аккумуляторов, процессов коррозии, твердотельной электрохимии, а также биоэлектрохимии. ЭИС относится к методам характеризационной техники, то есть представляет данные как зависимость параметров объекта от приложенной частоты.

В основе метода электрохимического импеданса лежит анализ отклика электрохимической системы, находящейся в стационарном или равновесном состоянии, на действие внешних возмущений (тока или напряжения), то есть на приложенное электрическое поле, которое вызывает перенос носителей заряда. Важным является то, что приложенное электрическое поле носит характер периодической функции во времени. Для электрохимических систем связь между реакцией и возмущением в общем случае не является линейной, поскольку ток и напряжение на электрохимической ячейке связаны экспоненциальными уравнениями типа уравнения замедленного разряда или концентрационной поляризации. Однако если возмущение достаточно слабое (обычно с амплитудой не более $25 \text{ мВ} < RT/F$, где R — газовая постоянная, T — температура, F — число Фарадея), электрохимические системы проявляют линейные свойства. Количественной характеристикой электрохимических цепей в этом случае служит комплексное сопротивление переменному току (импеданс) Z , величина которого зависит от частоты переменного тока и определяется отношением переменного тока к переменному напряжению. Процессы переноса зарядов в электрохимических системах включают в себя транспорт электронов или ионов через объем проводников, перенос зарядов через границы раздела, процессы заряжения границ раздела и т.д. Спектроскопия импеданса позволяет выделить элементарные процессы токопереноса и определять параметры отдельных стадий многостадийных процессов в отличие, например, от измерений на постоянном токе, когда, как правило, измеряется суммарный ток и рассчитывается усредненная по всему образцу проводимость. Поэтому в первую очередь спектроскопия импеданса применяется для исследования процессов переноса заряда в сложных системах, к которым относятся и биоэлектрохимические системы. В последние годы значение этого метода усилилось в связи с увеличением доступности коммерческих высококачественных приборов, дающих возможность проводить автоматизированные измерения в диапазоне частот от миллиГерц до мегаГерц.

С помощью импедансного подхода процессы, происходящие в электрохимической ячейке, могут быть смоделированы путем использования комбинаций резисторов (R), емкостей (C), индуктивностей (L) и других элементов цепи (в том числе элемента Варбурга W , элемента постоянной фазы — Constant Phase Element, CPE). Упомянутые элементы можно включить в цепь таким образом, чтобы они обеспечили те же параметры выходного тока, которые вырабатываются изучаемой электрохимической системой. Это называется построением эквивалентной электрической цепи (ЭЭЦ). При использовании ЭЭЦ электрические процессы в реальной системе могут быть описаны теоретической кривой, соответствующей выбранной электрической модели. Таким образом обеспечивается сопоставление электрических параметров модели и реальной системы [3].

Электрический импеданс обычно измеряют путем приложения переменного напряжения к электрохимической ячейке и измерения переменного тока, протекающего через ячейку. Приложенное синусоидальное напряжение выражается формулой:

$$E_t = E_0 \times \sin(\omega t), \quad (1)$$

в которой E_t является напряжением в цепи, изменяющимся со временем, E_0 представляет амплитуду сигнала (максимальное напряжение), ω — круговая частота, t — время; $\omega = 2\pi f$, где f — частота, выраженная в герцах (Гц). В ответ на это напряжение в цепи возникает ток с текущим значением, который также зависит от времени, имеет амплитуду I_0 и изменяется с частотой ω :

$$I_t = I_0 \times \sin(\omega t + \varphi) \quad (2)$$

Его особенностью является фазовый сдвиг φ , который обусловлен наличием емкостной компоненты. На основании закона Ома импеданс системы Z можно записать как отношение напряжения к току:

$$Z = E_t / I_t = E_0 \sin(\omega t) / I_0 \sin(\omega t + \varphi) = Z_0 \sin(\omega t) / \sin(\omega t + \varphi) \quad (3)$$

Из уравнения (3) видно, что импеданс определяется параметрами Z_0 и фазовым сдвигом φ . На рисунке 1 представлена диаграмма импеданса (диаграмма Найквиста), или годограф импеданса [4, 5]. Импеданс в этом случае представляется вектором с амплитудой Z_0 и направлением, задаваемым фазовым сдвигом/углом φ . В математической обработке данных вертикальная ось диаграммы Найквиста обозначается как мнимая (Z_i), горизонтальная ось — как действительная (Z_r). Таким образом, импеданс может быть представлен выражением:

$$Z = Z_r + jZ_i \quad (4)$$

где j – мнимая единица, $j = (-1)^{1/2}$.

Представленная диаграмма Найквиста отражает величину импеданса для различных частот. В левой части графика представлены высокочастотные данные, в то время как правая часть содержит данные, полученные на низких частотах.

На вставке рисунка 1 приведена ЭЭЦ, известная как представление электрической цепи по Эршлеру – Рэндлсу [6, 7]. С помощью ЭЭЦ Эршлера – Рэндлса можно описывать процессы заряжения электрода, транспорта ионов и переноса заряда через межфазную границу; при этом используются такие параметры, как емкость двойного электрического слоя $C_{дэс}$, сопротивление электролита R_p (сопротивление раствора) и сопротивление реакции переноса заряда на границе раздела фаз $R_{пз}$. Профиль импедансного спектра – диаграмма Найквиста, рисунок 1 – представляет полуокружность с началом в точке 1, соответствующей величине R_1 , и заканчивается в точке 2, которая соответствует сумме сопротивлений $R_1 + R_2$. Величина емкости C может быть получена из максимального значения мнимой составляющей на полуокружности. Большинство импедансных спектров реальных электрохимических систем может иметь трактовку в терминах диаграммы представленного типа – так, параметр R_1 представляет величину R_p , R_2 в большинстве случаев соответствует $R_{пз}$, C представляет $C_{дэс}$. Параллельные элементы (C и R_2) ЭЭЦ показывают, что полный ток, текущий через границу раздела, является суммой фарадеевского тока $I_{Ф}$ и тока заряжения двойного электрического слоя I_C .

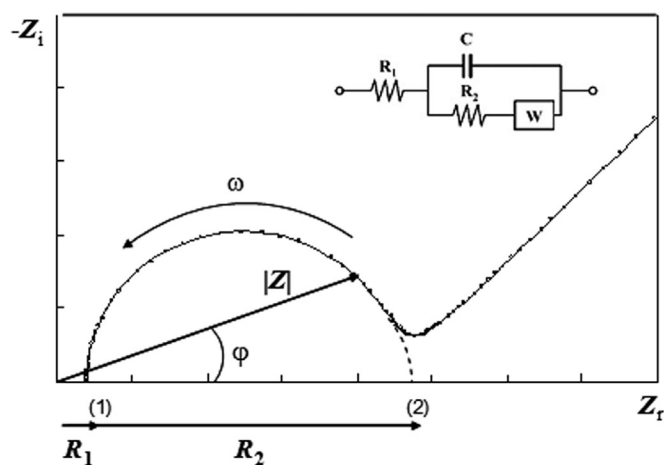


Рис. 1. Схематическое представление диаграммы Найквиста и соответствующей ей цепи Рэндлса (представлено на вставке)

Вклад в импедансный спектр на низких частотах вносит импеданс Варбурга (на рисунке 1 обозначен W , в тексте – Z_w). Процесс обусловлен наличием диффузии/массопереноса между раствором и поверхностью электрода и может быть определен как зависимое от частоты сопротивление, которое в случае полубесконечной диффузии содержит одинаковые вклады реальной и мнимой составляющих.

$$Z_w = \sigma(\omega)^{-1/2}(1 - j) \quad (5)$$

Здесь σ представляет коэффициент Варбурга, являющийся константой для каждой реальной системы. На диаграмме Найквиста Z_w представляет обычно диагональную линию, расположенную под углом 45° к оси.

Кроме рассмотренного варианта представления импеданса диаграммой Найквиста, существуют другие типы представления данных. Так, альтернативным является так называемая «диаграмма Боде», в которой параметр $\log|Z|$ или фазовый угол ω отражаются как функции $\log \omega$ [4]. Тип представления данных может выбираться в зависимости от вида эксперимента и необходимости специфической визуализации параметра.

Следует упомянуть о двух процессах, один из которых связан с отсутствием переноса заряда – так называемый нефарадеевский процесс, и с переносом заряда через границу «раствор-электрод» – фарадеевский процесс. Для биоэлектрохимических систем из литературы известны измерения как сопровождающиеся заряджением емкости – без переноса заряда через границу, так и основанные на использовании редокс-индикаторов для оценки изменения сопротивления на проводящих или полупроводящих поверхностях – с переносом заряда. В первом случае предметом исследования является емкость ДЭС, сформированного между раствором и поверхностью электрода, и ее изменение. Для регистрации нефарадеевских процессов не требуется использование дополнительных реагентов; так, изменение емкости может происходить из-за вытеснения воды или ионов с поверхности биомолекулярного слоя. Во втором случае, относящемся к фарадеевской импедансной спектроскопии, редокс-соединения окисляются или восстанавливаются на рабочем электроде. Этот процесс используют для наблюдения за переносом заряда между раствором и электродом, который обусловлен протеканием биологической реакции (при использовании биологического материала). В этом случае редокс-соединения рассматриваются только лишь как маркеры (в этом определении важно, что они не рассматриваются как метки), поскольку они опосредованно связаны с режимом анализа, но не связаны с конкретным

реагентом. Так, как указывают авторы [2], отрицательно заряженные редокс-соединения довольно часто применяются для диагностики в случае геносенсоров.

Использование импедансных измерений для изучения микробных биотопливных элементов

Анаэробные микроорганизмы

Имеется значительное число примеров использования ЭИС для оценки электрохимических свойств систем, не относящихся к биологическим. Число исследований по применению ЭИС для оценки МБТЭ и параметров, которые определяли бы электрическую мощность элементов, незначительно. Возможно, это было обусловлено отсутствием уверенности в том, что импедансные спектры для таких объектов можно получать без особых осложнений и давать им оценки. Одна из первых работ, посвященная использованию ЭИС для изучения микробного биотопливного элемента, была направлена на исследование электрохимических свойств МБТЭ, а именно: исследование характеристик анода и катода [8]. Авторы исследовали МБТЭ, основанный на применении анаэробных микроорганизмов (использованы бактерии *Shewanella oneidensis* MR-1) в качестве биокатализаторов и функционирующий при отсутствии медиатора. Изучение проводили при напряжении разомкнутой цепи (НРЦ). В исследовании применяли электроды сравнения Ag/AgCl, расположенные в анодном и катодном отделениях. Кроме режима НРЦ, использовали ЭИС для получения данных, соответствующих различным напряжениям на МБТЭ. Все характеристики регистрировали при различных внешних условиях. В более ранних исследованиях эти же авторы обращали внимание на тот факт, что наилучшее понимание того, как работает МБТЭ, может быть достигнуто в случае использования различных подходов, а именно: ЭИС, развертки потенциала, потенциодинамической поляризации, снятия циклических вольтамперограмм, а также при проведении анализа поверхностных свойств элемента и микробиологических исследований. В указанном исследовании было получено несколько важных закономерностей. Так, было показано, что во всех случаях импедансные спектры подчиняются простой модели, которая названа моделью «одной константы времени». В соответствии с этой моделью сопротивление раствора включено последовательно с параллельной комбинацией поляризационного сопротивления и емкости электродов, что соответствует ЭЭЦ Рэндлса [6]. Анализ импедансных спектров установил, что введение микроорганизмов и лактата в анодное отделение вызывает резкое окисление лактата. Кроме того, значительное снижение потенциала

разомкнутой цепи (НРЦ), измеренное для анода, приводит к увеличению общего напряжения и мощности МБТЭ. Измерения импедансных спектров при различных напряжениях МБТЭ позволило определить внутреннее сопротивление ($R_{\text{вн}}$) ячейки и показать, что $R_{\text{вн}}$ является функцией напряжения элемента; дополнительно авторы нашли, что, когда $R_{\text{вн}}$ равно $R_{\text{внеш}}$ ($R_{\text{внеш}}$ сопротивление нагрузки), напряжение МБТЭ соответствует максимальной развиваемой мощности. Обнаружили, что $R_{\text{та}}$ (поляризационное сопротивление) анода значительно выше, чем $R_{\text{кк}}$ (поляризационное сопротивление катода). Этот факт показывает, что в данной топливной системе скорость восстановления кислорода на катоде намного выше скорости окисления лактата на аноде. Измерение спектров импеданса системы при различных напряжениях позволило определить внутреннее сопротивление МБТЭ. $R_{\text{вн}}$ оказалось в 100 раз меньше в присутствии микроорганизмов и лактата и снижалось параллельно снижению напряжения в системе, когда поляризационные сопротивления анода и катода уменьшались при общем росте тока. Измерения напряжения и тока между двумя электродами сравнения было использовано для получения сопротивления мембраны, которое оказалось равным 5 Ом [8].

Применение импедансной спектроскопии для оценки качества и выбора материала электродов

Важный вопрос, связанный с функционированием топливных элементов, представлен в работе [9]. Авторы применили ЭИС для рассмотрения зависимости параметров топливных ячеек от материала электродов. Результаты получили трактовку в терминах ЭЭЦ. Анализ электрической цепи был основан на использовании «элемента постоянной фазы»; он характеризуется тем, что описывает неоднородное распределение микроскопических свойств в материале электрода. Граница «твердый электрод — электролит» никогда не бывает абсолютно гладкой и однородной на микроскопическом уровне. В результате огромное количество дефектов на такой поверхности вносит свой вклад в импеданс системы. Для описания экспериментальных данных в таких случаях вводятся искусственные элементы, способные охарактеризовать распределенные в пространстве характеристики системы (одним из таких элементов является элемент постоянной фазы CPE).

Авторы указывают, что в более ранних работах по сравнению с работой [9] были рассмотрены такие материалы электродов, как углеродная бумага, графитовый фетр, графит, нержавеющая сталь. В некоторых случаях в МБТЭ применяли медиатор электронного

переноса (ионы Mn^{4+} или нейтральный красный). Однако к моменту публикации еще не было представлено сообщений, в которых можно было бы найти критерий выбора материала электродов — вопрос крайне важный и в значительной степени определяющий эффективность БТЭ. На основе имеющихся знаний можно было сформулировать лишь несколько общих требований к характеристикам электродов:

1) материал не должен обладать токсичностью в отношении микроорганизмов (например, не должен быть изготовлен из свинца или ртути);

2) для удовлетворительного длительного функционирования электрод должен быть физически и химически стабилен в различных химических условиях (активированный ил, сточные воды);

3) импеданс электродного материала должен быть низок для предотвращения потерь электрической энергии на электродах как таковых;

4) также должно быть низким сопротивление границы раздела «раствор-электрод» для облегчения переноса электрона между микроорганизмом и /или медиатором, что означает неполяризуемость электрода;

5) с коммерческой точки зрения электрод не должен быть изготовлен из дорогого по стоимости материала — это требование ограничивает применение платины, золота даже несмотря на их стабильность в различных химических условиях.

Имея такие исходные установки, были предприняты попытки выбора и формулировки дополнительных критериев к материалу пяти типов электродов — изготовленных из серебра, алюминия, никеля, нержавеющей стали и углеродной ткани. При описании эффективности материала принимали во внимание такие характеристики, как генерируемое напряжение, плотность тока и плотность энергии. Показали, что такие материалы, как нержавеющая сталь, алюминий и никель, ведут себя как поляризуемые электроды с высоким сопротивлением «раствор-электрод», в то время как электроды из углеродной ткани и серебра имеют низкое импедансное сопротивление и ведут себя как неполяризуемые. Таким образом, авторы [9] пришли к заключению, что углеродная ткань является материалом, который обеспечивает удовлетворительные условия для переноса электрона в топливной системе и создает условия для более высокой энергоотдачи системы.

Измерение импедансных характеристик МБТЭ на основе аэробных микроорганизмов

Эксперименты, в которых представлен собственный опыт авторов данного обзора, выполнены с

использованием бактериальных клеток *Gluconobacter oxydans*. Композиция измерительной ячейки была аналогична описанной в работе [9]. Импедансные спектры регистрировали с помощью установки FRA Solartron 287 по двухэлектродной схеме подключения в интервале частот от 50 кГц до 0,01 Гц и амплитудой сигнала 10 мВ. Одним из преимуществ метода спектроскопии импеданса при двухэлектродной схеме подключения является возможность разделения вкладов катода и анода в поляризационные характеристики МБТЭ. На рисунках 2 и 3 приведены диаграммы Найквиста и Боде (зависимость модуля импеданса $|Z|$ от логарифма частоты переменного тока) для МБТЭ в режиме короткого замыкания с углеродным анодом, а также углеродным анодом и иммобилизованными на его поверхности клетками *G. oxydans* в буферном растворе (рН=6,0) и без него, а также при добавлении топлива, которым служила глюкоза. Как видно из рисунка 2, годограф импеданса состоит из двух полуокружностей различного диаметра и может быть описан эквивалентной схемой, приведенной на рисунке 4, которая включает в себя импедансы катода и анода.

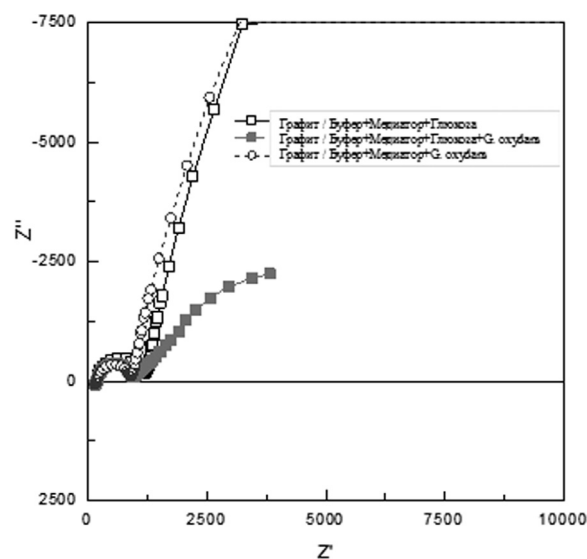


Рис. 2. Диаграмма Найквиста в режиме короткого замыкания для МБТЭ, содержащего иммобилизованные клетки *G. oxydans*

На рисунке 2 импедансный спектр катода характеризуется левой полуокружностью с малым диаметром. Это указывает на относительно небольшое сопротивление переноса заряда на границе катод/раствор ($R_{пт}$), что является следствием высокого значения тока обмена медиаторной редокс-системы (использована пара ферри-ферроцианид калия $K_3Fe(CN)_6/K_4[Fe(CN)_6]$). Введение в анодное пространство клеток *G. oxydans* и

глюкозы не влияет на импеданс катода. Импедансный спектр анода характеризуется правой полуокружностью значительно большего диаметра (см. рис. 2). Высокое сопротивление переноса заряда на аноде ($R_{\text{паА}}$) является следствием замедленной кинетики окисления глюкозы на аноде.

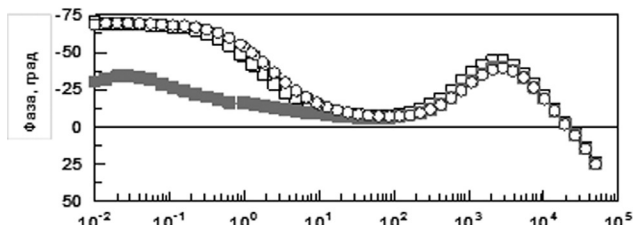
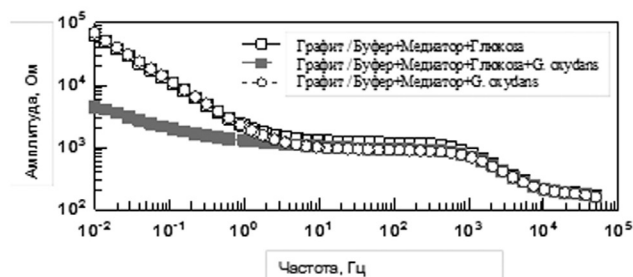


Рис. 3. Диаграммы Боде; режим короткого замыкания для анода, содержащего клетки *G. oxydans*

Параметры эквивалентной схемы МБТЭ, описывающие экспериментальные спектры импеданса, приведены в таблице 1. Из спектров импеданса и из этой таблицы следует, что в исследованном МБТЭ катод является слабополяризуемым электродом и при измерении по двухэлектродной схеме фактически выполняет роль электрода сравнения. Основной вклад в импеданс МБТЭ дает анод. Другими словами, импеданс всего МБТЭ в первом приближении соответствует импедансу анода. Иммунизация клеток *G. oxydans* на поверхности анода снижает $R_{\text{паА}}$ (см. рис. 2 и 3, табл. 1) за счет повышения тока обмена (параметр электрохимической кинетики, характеризующий равные по величине скорости катодного и анодного процессов при равновесном электродном потенциале E_p) реакции окисления глюкозы. Другие параметры — R_p и C_A , так же, как и $R_{\text{пзК}}$ и C_K , остаются практически неизменными (см. табл. 1).

Изменение величины $R_{\text{пзА}}$ характеризует каталитическую активность клеток *G. oxydans* и зависит от их количества на поверхности электрода. Величина $R_{\text{пзА}}$ зависит также от концентрации глюкозы в растворе. Снижение сопротивления переноса заряда в присутствии клеток *G. oxydans* особенно отчетливо прослеживается на диаграмме Боде, где видно существенное снижение модуля

импеданса (см. рис. 3). Величины $R_{\text{пзК}}$ и $R_{\text{пзА}}$ характеризуют кинетические потери, а емкость C_K и элемент постоянной фазы CPE_A — процессы заряжения катода и анода, соответственно; величина R_p в данном случае характеризует омические потери в МБТЭ (сумма сопротивлений электролита, подводящих проводов и мембраны).

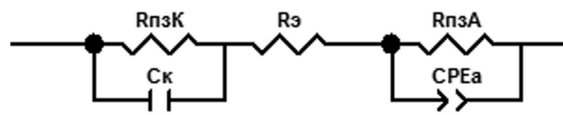


Рис. 4. Эквивалентная схема, описывающая импедансные спектры МБТЭ полностью

Таблица 1

Параметры эквивалентной схемы (рис. 4) для МБТЭ с различным составом анодного раствора

| Состав анода | $R_{\text{пзК}}$, Ом | C_K , мкФ | R_p , Ом | $R_{\text{пзА}}$, Ом |
|---|-----------------------|-------------|------------|-----------------------|
| Углеродный электрод+фосфатный буфер+медиатор+глюкоза (10 мМ) | 850 | 0,16 | 196 | $1,1 \times 10^6$ |
| Углеродный электрод+фосфатный буфер+медиатор+микробные клетки | 685 | 0,18 | 191 | $7,8 \times 10^5$ |
| Углеродный электрод+фосфатный буфер+медиатор+микробные клетки+глюкоза | 728 | 0,17 | 192 | $1,5 \times 10^2$ |

В растворах с низкой концентрацией глюкозы для более адекватного описания экспериментальных спектров импеданса в присутствии клеток *G. oxydans* в ЭЭЦ необходимо дополнительно вводить элемент Варбурга. Это указывает на появление диффузионных ограничений и служит дополнительным подтверждением увеличения тока обмена на аноде за счет каталитического влияния клеток *G. oxydans*. Параметры импеданса Варбурга позволяют оценивать транспортные потери в МБТЭ.

Таким образом, импедансная спектроскопия дает возможность разделять омические, транспортные и кинетические потери и проследить за их изменением при изменении качественного и количественного состава МБТЭ. Мониторинг указанных потерь методом импедансной спектроскопии представляется важным инструментом оптимизации МБТЭ с целью снижения

потерь и увеличения его разрядных характеристик. Из анализа следует, что оптимизировать работу МБТЭ можно за счет изменения концентрации глюкозы в объеме раствора, типа и количества бактериальных клеток на поверхности анода, пористости анода, изменения способа иммобилизации бактериальных клеток, а также за счет изменения концентрации фонового электролита и проводимости мембраны, разделяющей катодное и анодное пространства МБТЭ, например, варьируя ее толщину.

Заключение

В заключение можно отметить, что применение ЭИС к функционированию МБТЭ основано на возможности получения важных экспериментальных данных. Так, ЭИС позволяет оптимизировать работу БТЭ путем разделения и мониторинга отдельных параметров, отвечающих за омические, транспортные и кинетические потери в БТЭ. Собственный опыт авторов показал, что метод ЭИС может обеспечивать разделение вкладов анода и катода в поляризационные характеристики МБТЭ. Для каждого из электродов имеется возможность определять омические транспортные и кинетические потери и проследить за их изменением при варьировании качественного и количественного состава МБТЭ. Мониторинг указанных потерь методом импедансной спектроскопии является ценным инструментом оптимизации МБТЭ с целью снижения потерь и увеличения его разрядных характеристик.

Работа была частично поддержана фондом РФФИ (13-07-12052, ОФИ_М_2013).

Литература

1. Келл Д.Б. Изучение электрического импеданса / В кн.: «Биосенсоры: основы и приложения». Ред. Тернер Э., Карубе И., Уилсон Дж. — М.: Мир, 1992. — С. 344–374.
2. Bard A., Faulkner L. *Electrochemical Methods. Fundamentals and Application*. 2nd ed. — Wiley, New York, 2001. — P. 368–414.
3. Bonanni A., del Valle M. Use of nanomaterials for impedimetric DNA sensors: a review // *Analytica Chimica Acta*. — 2010. — Vol. 678. — P. 7–17.
4. Ershler B.V. Investigation of electrode reactions by the method of charging-curves and with the aid of alternating currents // *Discuss. Faraday Soc.* — 1947. — Vol. 1. — P. 269–278.
5. Katz E., Willner I. Review. Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: Routes to impedimetric immunosensors, DNA-sensors, and enzyme biosensors // *Electroanalysis*. — 2003. — Vol. 15. — No. 11. — P. 913–947.
6. Lasia A. *Modern Aspects of Electrochemistry*. № 32. Ed. by B.E. Conway et al. — Kluwer Academic/Plenum, New York, 1999. — P. 143–248.
7. Manohar A., Bretschger O., Neilson K., Mansfeld F. The use of electrochemical impedance spectroscopy (EIS) in the evaluation of the electrochemical properties of a microbial fuel cell // *Bioelectrochemistry*. — 2008. — Vol. 72. — P. 149–154.
8. Ouitrakul S., Sriyudthsak M., Charojrochkul S., Kakizono T. Impedance analysis of bio-fuel cell electrodes // *Biosensors and Bioelectronics*. — 2007. — Vol. 23. — P. 721–727.
9. Randles J.E.B. Kinetics of rapid electrode reactions // *Discuss. Faraday Soc.* — 1947. — No. 1. — P. 11–19.

ELECTROCHEMICAL IMPEDANCE SPECTROSCOPY APPLIED TO RESEARCH OF MICROBIAL FUEL CELLS

A.N. RESHETILOV^{1,3}, V.V. EMETS², A.N. KLYUEV², T.A. RESHETILOVA¹, R.G. VASILOV³

¹ G.K. Scriabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino, Moscow region;

² A.N. Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry RAS,

³ National Research Centre «Kurchatov Institute», Moscow

In overview with using of their own researches the application of electrochemical impedance spectroscopy in the study of microbial fuel cells (MFC) is considered. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) to date was mainly a tool for electrochemical studies, not involving the use of biological material. However, EIS provides study electrochemical parameters that are essentially the method may be applicable to any type of material — as the non-organic or organic, including a biomaterial. This approach is appropriate in the study of electrochemical properties of the component elements of biofuel. The basic idea that we wanted to emphasize the authors of the review, is that the development of the subject will allow the MFC using EIS to make new steps in bioenergy. In particular, the EIS allows to optimize the MFC by separation and monitoring of individual parameters responsible for ohmic, transport and kinetic effects in the MFC.

Keywords: electrochemical impedance spectroscopy, microbial fuel cells, bioengineering, bioelectrochemistry.

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССОВ

П.М. ГОТОВЦЕВ*, Э.Б. НАМСАРАЕВ, К.В. ГОРИН, А.В. КОМОВА, В.В. БУТЫЛИН,
Г.У. БАДРАНОВА, М.А. ЛОМОНОSOVA

НТК биоэнергетики, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

Статья представляет собой обзор и краткий анализ некоторых работ в исследуемой области. Математическое моделирование внутриклеточных процессов на сегодняшний день — динамически развивающееся направление. Ряд научных групп использует разные подходы и принципы для моделирования различных процессов, от отдельных биохимических реакций до клеточного метаболизма. Каждый из применяемых подходов имеет свои преимущества и недостатки и требует различных объемов исходных данных. Рассмотрены некоторые подходы к моделированию внутриклеточных процессов и к структуре моделей клетки в целом.

Ключевые слова: математическое моделирование, внутриклеточные процессы, метаболизм, неравновесные процессы, сети Петри.

Введение

Представление внутриклеточных процессов в виде математических моделей позволяет проводить исследования *in silico* и использовать полученные результаты как базу для дальнейшего планирования экспериментальной работы. Ожидается, что использование математических моделей даст возможность определить функции практически каждого гена в клетке и в перспективе сделать существенный вклад в понимание того, как протекают процессы в биологических системах [18].

На сегодняшний день наибольший интерес вызывает моделирование метаболических потоков [42, 72]. Первые подходы к подобному моделированию сложились в начале 1990-х годов [62, 64] и сейчас получили широкое распространение. Данный вид моделирования получил название — метод анализа баланса метаболических потоков (Flux Balance Analysis, FBA). Такие модели позволяют получить представление о материальном балансе внутриклеточных процессов в стационарных условиях, а в случае полной модели предсказать фенотип на основе генотипа [42].

Важной задачей при моделировании является соблюдение порядка протекания реакций в моделируемом метаболическом пути. При этом также необходимо, чтобы правильно учитывалось изменение количества вещества в каждой из реакций. Такой контроль должен позволить, например, выявить лимитирующие реакции в метаболическом пути. Ныне существуют различные подходы при решении данной задачи как с использованием разных подходов к алгоритмизации, так и с использованием математического аппарата — алгоритмов на графах, в частности, сетей Петри [44, 61, 78].

В целом математическое моделирование внутриклеточных процессов является активно развивающимся направлением, которое может оказать определенную помощь как при проведении научных исследований, так и при решении прикладных биотехнологических задач. Далее будут рассмотрены некоторые подходы к моделированию, которые в настоящее время нашли применение.

Анализ баланса метаболических потоков

Метод анализа метаболических потоков представляет собой наиболее распространенный метод моделирования по причине своей простоты, информативности и относительно низкой вычислительной стоимости разработанных моделей [4]. В данном виде моделирования под метаболическим потоком понимается скорость превращения вещества в метаболическом пути. Соответственно при написании уравнения анализируется скорость протекающих реакций. Следовательно, левая часть уравнения будет представлять скорость изменения

© 2013 г. Готовцев П.М., Намсараев Э.Б., Горин К.В., Комова А.В., Бутылин В.В., Бадранова Г.У., Ломоносова М.А.

* **Автор для переписки:**

Готовцев Павел Михайлович

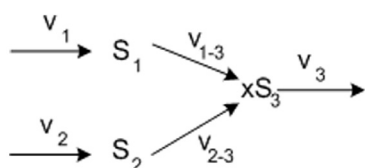
кандидат технических наук

НТК биоэнергетики,

НИЦ «Курчатовский институт»

123182 Москва, пл. Академика Курчатова, 1.

анализируемого метаболита — dS_i/dt , а правая часть будет суммировать скорости реакций, приводящих к увеличению либо снижению его концентрации. Для примера рассмотрим следующую схему реакций:



где:

S_1, S_2, S_3 — метаболиты;

$v_1, v_2, v_{1-3}, v_{2-3}, v_3$ — скорости реакций;

x — стехиометрический коэффициент.

Для предложенной схемы реакций можно записать следующую систему уравнений:

$$\begin{aligned} dS_1/dt &= v_1 - xv_{1-3} \\ dS_2/dt &= v_2 - xv_{2-3} \\ dS_3/dt &= xv_{1-3} + xv_{2-3} - v_3 \end{aligned} \quad (1)$$

Если обобщить данный подход, то можно записать обобщенное уравнение:

$$dS_i/dt = \sum v_{in_i} - \sum v_{out_j} \quad (2)$$

где:

v_{in_i} — скорость i -той реакции, ведущей к увеличению концентрации метаболита;

v_{out_j} — скорость j -той реакции, ведущей к уменьшению концентрации метаболита.

В ряде работ [8, 67] уравнение (2) дополняется еще одним слагаемым — скоростью роста μ . Отмечается, что рост клетки ведет к некоторому разбавлению метаболитов, однако в работе [8] подчеркивается, что данное разбавление незначительно и не влияет существенно на точность модели. С учетом скорости роста уравнение (2) записывается следующим образом:

$$dS_i/dt = \sum v_{in_i} - \sum v_{out_j} - \mu S_i \quad (3)$$

Предложенные уравнения решаются в стационарных условиях, то есть при допущении, что в системе устанавливается равновесие [4]. В случае данного допущения должно выполняться равенство между потоками, ведущими к образованию метаболита, и потоками, ведущими к уменьшению его концентрации. Следовательно, применительно, например, к уравнению (3) производная dS_i/dt будет равна нулю и само уравнение примет вид:

$$\sum v_{in_i} - \sum v_{out_j} - \mu S_i = 0 \quad (4)$$

Для стационарных условий решение системы уравнений проводится с целью максимизации или мини-

мизации одного или нескольких метаболических потоков. Например, систему уравнений (1) для стационарного состояния можно записать в следующем виде:

$$\begin{aligned} v_1 - xv_{1-3} &= 0 \\ v_2 - xv_{2-3} &= 0 \\ xv_{1-3} + xv_{2-3} - v_3 &= 0 \end{aligned} \quad (5)$$

Решение может проводиться с целью максимизации метаболического потока v_3 :

$$y = v_3 \rightarrow \max \quad (6)$$

где: y — целевая функция.

Сложность подобных моделей зависит от количества потоков, которые с их помощью анализируются.

Рассмотрим далее некоторые варианты применения метода анализа балансов метаболических потоков. Применение метаболических моделей показало свою эффективность при выборе потенциальных штаммов, питательных сред, продуктов и определении путей повышения продуктивности как при производстве биотоплива, так и фармацевтических препаратов [7, 23, 54].

В работе [8] метод анализа балансов метаболических потоков был использован для вычисления метаболических потоков, связанных с биологической фиксацией углерода. Авторы провели сопоставление известных шести видов фиксации [8] по критериям максимизации роста биомассы и энергетической эффективности. Три из них присутствуют у фототрофных организмов: восстановительный пентозофосфатный цикл (цикл Кальвина), восстановительный цикл трикарбоновых кислот (цикл Арнона), 3-гидроксипропионатный цикл. Они сравнивались по потребности в квантах света (количество поглощенных фотонов). Самым эффективным по этому показателю оказался цикл Арнона (11 фотонов), далее — цикл Кальвина (13,9 фотонов) и наименее эффективным — 3-гидроксипропионатный цикл (15,3 фотонов). Количество молей фотонов для каждого фотоавтотрофного пути фиксации углерода было преобразовано в общее количество энергии в килоджоулях, затрачиваемое на фиксацию CO_2 . На фиксацию одного моля CO_2 в цикле Кальвина затрачивается 2439 КДж, в цикле Арнона — 2401 КДж, в 3-гидроксипропионатном цикле — 3152 КДж. Интересно, что подавляющее количество всей первичной продукции на планете производится через не самый эффективный цикл Кальвина. Еще три пути фиксации углерода работают в хемотрофных организмах: восстановительный ацетил-КоА путь (путь Вуда — Льюнгадала), 3-гидроксипропионатный/4-гидроксипропионатный и дикарбоксилатный/4-гидроксипропионатный путь.

При подсчете термодинамической эффективности всех шести путей фиксации углерода было обнаружено, что три хемотрофных пути (путь Вуда – Льюнгдала, 3-гидроксипропионатный/4-гидроксibuтиратный, дикарбоксилатный/4-гидроксibuтиратный цикл) более эффективны, чем фотоавтотрофные пути (менее 1000 КДж/моль CO_2). Однако при включении в анализ энергетических затрат на генерацию водорода из солнечного света оказалось, что энергозатраты хемотрофных путей увеличиваются в 5 раз.

Общая эффективность, полученная путем деления теплоты сгорания биомассы на количество энергии, затраченное на синтез биомассы, выше всего у цикла Арнона (25,3%). Цикл Кальвина немногим менее эффективен (24,9%). Таким образом, с практической точки зрения (с учетом затрат на продукцию водорода), самым эффективным из шести путей является цикл Арнона, ему практически не уступает цикл Кальвина. Хемотрофные пути фиксации углерода могут стать выгодными лишь с развитием дешевых технологий генерации водорода. Для синтеза разных метаболических прекурсоров одни пути фиксации углерода могут быть более эффективными, чем другие.

Результативность исследований метаболизма микроорганизмов ведет к тому, что на сегодняшний день появляется возможность смоделировать максимально возможное количество метаболических путей какого-либо микроорганизма. В работе [42] авторы представили результаты работы над полной моделью бактерии *Mycoplasma genitalium*. Выбор данного микроорганизма был обусловлен тем, что бактерия отличается крайне маленьким геномом, который состоит из 580 070 пар оснований. Также геном *Mycoplasma genitalium* был полностью секвенирован в период с 1993 по 1995 годы [25]. В 2008 году были опубликованы результаты о том, что удалось успешно синтезировать геном данной бактерии [26].

Перед разработкой модели авторы [42] провели анализ примерно 900 публикаций для сбора информации о внутриклеточных процессах *Mycoplasma genitalium*. Задачей моделирования было предсказать фенотип по генотипу и попробовать описать жизненный цикл клетки, проследив изменения метаболических потоков, а также попробовать оценить баланс метаболитов в различные периоды жизни клетки. В данной работе метаболизм моделировался с помощью метода баланса метаболических потоков; за основу для моделирования была взята работа [68], в которой была опубликована наиболее полная метаболическая карта *Mycoplasma genitalium*. В

то же время деградация РНК и белков моделировались как процесс Пуассона (подробное описание данного стохастического процесса представлено в [60]). В целом авторами [42] было разработано 28 субмоделей, описывающих различные внутриклеточные процессы. Таким образом, перед авторами встала задача интеграции всех субмоделей в единую систему. На сегодня такие методы интеграции уже разрабатываются [12–15]. В рамках разрабатываемой модели авторы для интеграции субмоделей приняли допущение об автономности, то есть каждая из субмоделей на очень короткий период времени (менее чем 1 секунда) является автономной и не зависит от остальных субмоделей. При этом на каждой итерации расчета каждая из субмоделей проводит расчет на основе данных, полученных на предыдущей итерации всеми субмоделями.

Все переменные в модели были разделены на пять больших групп: процессы, связанные с ДНК; процессы, связанные с РНК; процессы, в которых участвуют белки; процессы с участием различных метаболитов; другие, к которым отнесены все процессы, не входящие в первые четыре группы. Тестирование модели проводилось по опубликованным данным с использованием более чем 1900 различных параметров. Для тестирования были выбраны ключевые параметры, известные значения которых сопоставлялись с результатами моделирования. Само тестирование заключалось в симуляции 128 клеток дикого штамма *Mycoplasma genitalium*. В результате тестирования $R^2=0,68$ при анализе клеточного химического состава, массы и экспрессии генов.

В целом разработанная модель показала хорошую согласованность с реальными данными. Так, модель смогла спрогнозировать, что материальный поток через гликолиз значительно больше, чем через пентозофосфатный путь или через биосинтез липидов, что согласуется с экспериментальными данными [75].

Одной из задач, которую авторы попытались решить с помощью разработанной модели, являлось прогнозирование поведения ДНК-связывающих белков. Сейчас ведутся активные исследования в области распределения ДНК-связывающих белков [35, 71] и их диффузионной динамики [9]. Опираясь на опубликованные данные, авторы [42] включили в свою модель 30 ДНК-связывающих белков, включая ДНК- и РНК-полимеразы и белок-инициатор репликации DnaA. Результаты расчета по модели показывают, что в течение первых 6 минут клеточного цикла 50% хромосомы связано, как минимум, с одним белком, а в течение 20 минут — уже 90%. Основным белком при этом является

РНК-полимераза, которая связывается с 90% хромосомы в течение первых 49 минут клеточного цикла.

С использованием модели [42] были проведены *in silico* исследования по определению единичных генов, изменение любого из которых будет существенным для роста микроорганизма. В результате проведения более чем 3000 симуляций авторам удалось установить 284 гена, которые являются важнейшими для роста клетки. Сопоставление с экспериментальными данными, представленными в [27], показало, что в рамках указанной задачи точность модели составила 79%.

Среди задач, решенных с помощью математической модели клетки *Mycoplasma genitalium*, определенный интерес представляет глобальное распределение энергии. В процессе симуляций с помощью модели авторы [42] определяли динамику синтеза и потребления энергетических интермедиатов АТР, ГТР, FAD(H₂), NAD(H) и NADF(H). Среди результатов таких симуляций наиболее интересным представляется обнаруженный дисбаланс между потреблением и выработкой энергии, который составил 44%. Необходимо отметить, что подход к определению баланса энергии через баланс энергетических интермедиатов на сегодня активно прорабатывается различными научными группами [72]. Рассмотрим далее детально результаты проведенного исследования.

В работе [72] моделирование осуществлялось методом баланса метаболических потоков, через который авторы стремились получить баланс интермедиатов АТР, ГТР, FAD(H₂), NAD(H) и NADF(H). Изучались процессы, проходящие в микроорганизме *Mycoplasma pneumoniae*, метаболизм которого в достаточной степени описан для моделирования [75]. Разработанная модель включает в себя ряд подсистем, которые описывают процессы, связанные с получением энергии, аминокислотами, нуклеотидами, липидами, и метаболизм, включая кофакторы, а также реакции транспорта. Дополнительно в модель были включены процессы биосинтеза ДНК, РНК и белков. Авторы работы провели анализ литературных данных и поставили ряд экспериментов для определения баланса биомассы в стационарных условиях. В результате ими было принято для модели следующее уравнение биомассы:

$$V_m = M_{DNA} + M_{RNA} + M_{Prot} + M_{lip} + M_{bs} + M_{aa} + M_{fa} + M_{cf} \quad (7)$$

где:

V_m — биомасса;

M_{DNA} , M_{RNA} , M_{Prot} , M_{lip} , M_{bs} , M_{aa} , M_{fa} , M_{cf} — биомасса ДНК, РНК, белков, липидов, оснований,

аминокислот, жирных кислот и кофакторов, соответственно.

Проверка модели проводилась как с использованием собственных экспериментальных данных, так и с уже опубликованными результатами исследований [33, 34].

Первой задачей для разработанной модели была симуляция роста биомассы. В симуляции рост проводился на глюкозе при значениях рН среды в диапазоне от 5,5 до 8,8 в течение 4 дней. При данных условиях наблюдалась секреция молочной и уксусной кислот, а также увеличение в клетке копий лактатдегидрогеназы с 203 до примерно 1000 за весь период симуляции. Полученные результаты согласуются с опытными данными, представленными в [51].

Анализируя *in silico* энергетический баланс *M. pneumoniae*, в работе [72] установили, что в условиях нормального роста после 36 часов наблюдается синтез примерно 60000 молекул АТР в секунду. Далее авторы проводили симуляцию роста бактерий и сопоставляли рост биомассы с потреблением энергии в виде АТР. В результате было обнаружено, что существует разница между экспериментальными данными (в частности [66]) и моделью. Авторы [72] делают вывод, что, видимо, имеется еще целый ряд реакций, проходящих с потреблением АТР, на стадии роста культуры. Анализ *in silico* реакций, требующих АТР, продемонстрировал, что приблизительно от 71 до 88% доступного АТР не используются в процессах увеличения биомассы. После 36 часов роста было получено, что 9,8% от общей энергии используется для синтеза белков и их деградации, 8,4% — на синтез РНК и менее 0,1% — на синтез ДНК. Синтез липидов требует 0,5% доступных молекул АТР, 5,9% расходуется в процессах синтеза вторичных метаболитов, потребление прекурсоров и другие функции. При этих расчетах учитывались данные [51] по периодам полураспада белков (23 ч) и мРНК (1 мин.). Используя полученные данные, авторы решили сопоставить затраты энергии на процессы, связанные с ростом, и процессы, не связанные с ростом. В результате сопоставления было определено, что даже в период экспоненциального роста затраты АТР на его поддержание не превышают 7%. Подобное распределение коррелирует с результатами, представленными в [42], и, возможно, его анализ в дальнейшем позволит определить вычисленный там дисбаланс в 44% между производством и потреблением энергетических интермедиатов.

В приведенных выше примерах речь шла о прокариотах, однако в настоящее время моделирование методом баланса метаболических потоков применяется и

для эукариотов [20, 24]. Очевидно, что многие модели делаются для наиболее изученного микроорганизма — дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, геном которых был полностью секвенирован к 1996 году [28].

В работе [3] были смоделированы 234 реакции, связанные с процессами, протекающими в митохондриях *Saccharomyces cerevisiae*. В результате моделирования было установлено, что в условиях роста 138 реакций имеют нулевые скорости, а стационарный рост митохондрий обеспечивается за счет транспорта из цитоплазмы белков, аминокислот, GDP, CDP, ионов Fe_2O , протопорфирина 9 и АТФ. Проведенные расчеты в целом соответствуют экспериментальным данным.

Таким образом, представленный выше обзор показывает, что на сегодня метод анализа баланса метаболических потоков находит достаточно широкое применение и позволяет получить адекватные прогнозы по результатам моделирования. В то же время данный метод носит ряд недостатков, в частности, он дает возможность анализировать только стационарное распределение метаболических потоков и не учитывает таких факторов, как транспорт, диффузионные процессы в цитоплазме и другие. Также метод в силу своей стационарности не позволяет эффективно анализировать динамику внутриклеточных процессов.

Модели на основе сетей Петри

Метод с использованием сетей Петри также широко распространен при моделировании внутриклеточных процессов [44, 78]. Начнем рассмотрение моделей с краткого описания данных сетей и принципов, заложенных в их работу.

Сети Петри — это набор математических процедур для моделирования динамических систем [37, 39, 58]. По своей сути сети представляют собой двудольный ориентированный граф, в котором присутствуют два типа вершин — позиции и переходы. Позиции являются пассивными элементами сети, при моделировании внутриклеточных процессов это могут быть определенные условия, состояния или химические соединения. Переходы соответственно служат активными элементами системы, то есть представляются некими событиями и действиями, например, химическими реакциями. Вершины соединяются между собой с помощью дуг, которые представляют собой взаимосвязь между активными и пассивными элементами. По сути дуги описывают, какие реагирующие вещества переходят в продукты в результате химической реакции. Также дугам можно присваивать множитель, который будет учитывать стехиометрию моделируемой

реакции. Смещение материального баланса в результате протекания реакций, транспорт моделируются с помощью маркеров, которые перемещаются от одной вершины к другой по направлению процесса. Все перемещения маркеров осуществляются так, что бы их количество в той или иной вершине характеризовало состояние системы в определенный момент времени. Таким образом, работы сети Петри — это перемещение маркеров по вершинам. При этом выполняются следующие условия:

1. Перемещение маркера осуществляется при условии, что все предшествующие вершины заполнены, то есть для реакции доступно как минимум стехиометрическое количество реагирующих веществ; при этом учитывается множитель дуги.

2. В процессе работы происходит движение всех маркеров в соответствии с множителями от исходных (входных) вершин к выходным.

3. Все события в сети (передача маркеров) происходят автоматически или в соответствии с установленной временной шкалой.

Рассмотрим ту же реакцию, что и при описании метода анализа балансов метаболических потоков, и составим простейшую сеть Петри, которая бы ее описывала.



Для простоты описания предположим, что стехиометрический коэффициент x равен 3. На рисунке 1 представлены исходное состояние сети и результат реакции. В начальном состоянии (левая часть рисунка) присутствуют два моля вещества S_1 и один S_2 , на рисунке они отмечены черными точками в вершинах S_1 и S_2 . Далее происходит реакция и в правой части рисунка показан результат, три моля вещества S_3 и один моль S_1 , который не вступил в реакцию, так как является избыточным относительно стехиометрии. S_1 , S_2 и S_3 в данном случае являются позициями, а r — переходом.

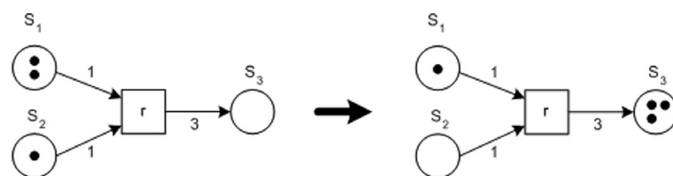


Рис. 1. Работа сети Петри, описывающая реакцию (8)

Как видно из представленного описания, модели на основе сетей Петри не являются строго формальным описанием (или приближением к нему) процессов, протекающих в клетках. Принципы работы данных сетей достаточно адаптивны, чтобы на основе уже созданной системы правил можно было с некоторым приближением

создать аналог моделируемых процессов. Так как данный аналог работает, опираясь на известную систему правил, то он может быть успешно использован для анализа смоделированных процессов. Благодаря этому сети Петри сегодня активно используются для моделирования внутриклеточных процессов [44]. Рассмотрим далее некоторые успешные примеры использования сетей Петри.

Начнем рассмотрение с работы [38], в которой авторы построили модель на основе сети Петри для моделирования такого сложного явления, как апоптоз (запрограммированная клеточная гибель). Данное явление вызывает существенный научный интерес [5, 43]. Апоптозу посвящены многочисленные исследования [2, 11, 43, 74]. В своей модели авторы [38] попытались отразить два наиболее изученных сигнальных пути [74] — рецепторно-зависимый и митохондриальный. В своей модели авторы не рассматривали ингибиторы апоптоза, так как, по их мнению, действие данных веществ по отношению к моделируемому процессу является внешним и при моделировании можно от них отказаться, чтобы не усложнять модель. Также добавление действия ингибиторов возможно путем внесения изменений в исходные данные модели. При разработке модели авторы учли пересечение обоих сигнальных путей через регуляторный белок Bid. Для учета участия ферментов в реакциях авторы ввели тестовые дуги, в которых не происходит снижения количества молекул фермента, катализирующего реакцию. Входные сигналы в модель формируют маркеры на начальных позициях, которые далее в соответствии с системой правил приводят в действие сеть. Маркеры на конечных позициях поглощаются и выводятся из сети как выходные сигналы.

Проверка модели проводилась путем анализа переходов, которые приводят к изменению количества вещества в результате реакции [38]. Анализируя данные переходы в случае неадекватности модели можно получить неадекватный рост либо уменьшение количества вещества, либо модель будет демонстрировать циклическое поведение. Вводя в модель различные комбинации исходных данных, авторы получали один из описанных в литературе сигнальных путей апоптоза; при этом не было получено вариантов с незавершенной работой сети, невозможными сигнальными путями или бесконечным накоплением одного из веществ. Таким образом, проведенный авторами анализ с подачей различных вариантов входных возмущений показал, что модель адекватно описывает заложенные сигнальные пути апоптоза.

Важным преимуществом сетей Петри является возможность учета временных факторов. Их можно учесть, расширив систему правил, которые регулируют

передвижение маркеров, либо добавив новые позиции, которые проводили бы расчет с помощью тех или иных систем уравнений. Примером таких гибридных сетей Петри является работа [73], в которой авторы моделируют сигнальную цепь дофамина и проводят с помощью модели анализ задержек и шумов в данной цепи. Не менее интересным примером является и работа [53], в которой авторы ввели стохастическую систему правил для учета временных факторов сигнального пути интерлейкина 1. В результате удалось обнаружить лимитирующие стадии данного сигнального пути, которые протекают значительно медленнее остальных и тем самым оказывают существенное влияние на весь сигнальный путь.

Как видно из приведенных примеров, сети Петри являются достаточно гибким и интересным методом моделирования внутриклеточных процессов. Однако такой способ моделирования — это система математических правил, которая не представляет собой формульное отображение моделируемых процессов и несет в себе существенную степень условностей. Следовательно, данный метод обладает меньшими возможностями с точки зрения получения новой информации об объекте в результате моделирования по сравнению с методом баланса метаболических потоков. В то же время при моделировании с использованием сетей Петри можно существенно расширять систему правил, что успешно показано в работах [53, 73]. Также вполне перспективным направлением в использовании данного вида моделирования выглядит усложнение множителей и позиций. Например, введение позиций, в которые вписаны формулы, рассчитывающие тот или иной процесс с большей точностью, чем его можно смоделировать набором правил сети. Достаточно просто интегрировать в такие сети и деградацию белков и РНК, смоделировав их, например, по аналогии с [42], как процесс Пуассона. В целом можно сделать вывод, что сети Петри благодаря своей гибкости являются весьма интересным инструментом для моделирования внутриклеточных процессов.

Общие подходы к структуре сложных моделей

Из приведенных выше результатов работ различных научных групп видно, что к настоящему времени накоплено недостаточно данных для составления математической модели, которая включала бы в себя все основные внутриклеточные процессы. В связи с этим авторам моделей приходится идти на ряд допущений, например, пренебрегать транспортом, использовать стохастические подходы. В то же время на сегодня существует достаточно работ по моделированию свойств различных биомоле-

кул в различных средах (например, [21]), а также есть работы по формализованному физическому описанию отдельных процессов, таких как работа определенных ферментов или комплексов. Например, в исследовании [6] представлено достаточно глубокое описание процесса фотосинтеза.

Таким образом, на сегодняшний день моделирование внутриклеточных процессов идет как со стороны основных процессов с последующим их уточнением, так и со стороны работы отдельных комплексов или даже отдельных реакций с дальнейшим усложнением. Схематично по аналогии с «пирамидой сложности живого», представленной в [55], оба подхода продемонстрированы на рисунке 2. Очевидно, что оба описанных выше подхода в отдаленной перспективе ведут к созданию полной модели микроорганизма или животной клетки вплоть до физико-химических процессов, связанных с отдельными реакциями и биомолекулами, включая конформационные изменения. Хотя пока недостаточно информации для создания таких моделей, тем не менее существуют подходы по интеграции различных элементов и субмоделей в единый комплекс.

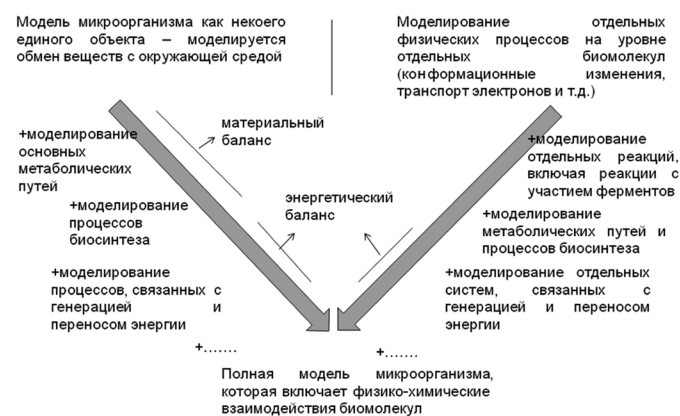


Рис. 2. Основные направления моделирования

Первый путь уже представлен в работе [42], где вся модель состоит из субмоделей, каждая из которых отвечает за собственную группу процессов. Так, авторы проводят разделение всех процессов на группы по функциональности. При учете того, что в модели используется допущение об автономности субмоделей, применяя такой подход, можно сочетать различные подходы к моделированию в каждой из субмоделей. В этом случае важной задачей является обеспечение обмена данными между субмоделями, поскольку возможна ситуация, когда, например, одна субмодель будет выдавать результаты в количественных единицах (например, концентрации), а другая будет сетью Петри и будет работать с маркерами, которые переводятся в физические величины в соответствии с заложеной в сеть системой правил.

Другим подходом является пространственное разделение процессов, когда каждая субмодель моделирует определенную локализованную в пространстве систему. Локализация может быть нежесткой по размерности, а, например, привязана к определенному органоиду клетки. При таком подходе возникает задача верификации материальных потоков между субмоделями, однако именно эти потоки, по сути, и будут давать информацию о внутриклеточном транспорте. Очевидно, что с учетом имеющейся информации о внутриклеточных процессах и объемах содержащихся там веществ [22, 70] создание такой модели является крайне сложной задачей. С другой стороны, при локализации субмоделей в пространственной системе возможно моделирование пространственных эффектов и их роли в метаболизме.

Развивая вышеизложенное, можно отметить, что в моделях, разбитых на субмодели по принципу пространственной локализации, теоретически возможно дальнейшее разбиение на расчетные элементы в субмоделях уже по принципу функциональности.

Проблема неопределенности моделируемой системы ведет к анализу возможности использования внешних алгоритмов, которые каким-либо образом могли бы провести количественную оценку неопределенных процессов. Такое приближение, безусловно, снизит точность модели. Примером такого подхода является использование процесса Пуассона как модели деградации РНК и белков в исследовании [42]. Ныне существует достаточно алгоритмических подходов к работе со сложными данными, которые затруднительно формализовать, например, в случае если имеются данные только в небольшой части теоретически возможных значений. В качестве примера можно привести искусственные нейронные сети, которые сегодня активно применяются для так называемого black-box моделирования [36]. Под таким моделированием понимается моделирование, в котором моделируемая система представляется как черный ящик и различными математическими методами устанавливается зависимость выходных из системы параметров от входных.

Помимо пространственных эффектов, важным элементом моделей является учет времени. В случае моделей, аналогичных [42], учет проводится с привязкой к известным скоростям реакций. При использовании сетей Петри учет времени можно проводить, например, следующими способами: сделав дополнения в систему правил, искусственно ускоряя либо замедляя движения маркеров по дугам, либо введя дополнительные позиции, которые задерживали бы маркеры.

Как уже упоминалось выше, системы правил, регламентирующих работу модели, являются неотъемлемой частью сетей Петри. Однако в случае если в модели присутствует несколько субмоделей, то возникает необходимость в разработке системы правил для их взаимодействия. Использованное в [42] допущение об автономности вполне эффективно, в случае если субмодели выбирались исключительно из критериев функциональности. При использовании в качестве каких-либо субмоделей «black-box» либо при пространственном разбиении такое допущение может оказаться недостаточно эффективным. Причиной этого является то, что при пространственном разбиении каждая из субмоделей может содержать составляющую, ответственную за материальный поток веществ от одной субмодели к соседней, что, в свою очередь, приводит к появлению порядка расчета по направлению движения материальных потоков. Таким образом, может потребоваться более серьезная система, которая будет регулировать работу различных субмоделей.

В целом, вопрос структуры математических моделей внутриклеточных процессов на сегодня остается открытым. К указанным выше подходам могут добавиться решения, основанные на результатах изучения массопереноса в микропотоках и нанопотоках. Данное направление гидродинамики активно развивается, и из недавних публикаций следует отметить работы [17, 29]. В первой авторы анализируют поток бинарных жидкостей через ряд микроцилиндров, расположенных под определенным углом к потоку. Методами компьютерного моделирования авторы определяют параметры такой системы микроцилиндров, при которых можно провести разделение находящихся в смеси компонентов. В работе [29] авторы изучают такое интересное явление, как термодиффузия. Исследование также проводится методом компьютерного моделирования. В перспективе подобные работы могут стать основой для изучения внутриклеточного движения веществ, что, естественно, найдет свое отражение в математических моделях внутриклеточных процессов.

Еще одним элементом в математических моделях внутриклеточных процессов являются модели неравновесных систем и автоколебательных процессов. Далее рассмотрим это интересное направление отдельно.

Термодинамика неравновесных систем и некоторые аспекты ее применения при моделировании внутриклеточных процессов

Термодинамика химических реакций, при которых происходят колебания концентраций, на сегодня вы-

зывает интерес как теоретическая основа для описания различных биохимических систем [19, 52]. Теоретическую возможность протекания химических реакций и диффузии, в результате которых система спонтанно эволюционирует в пространственно неоднородные структуры, впервые была показана Аланом Тьюрингом [69]. Базовое уравнение реакции с учетом диффузией можно записать в виде:

$$\frac{\partial u}{\partial t} = D \nabla^2 u + f(u, p) \quad (9)$$

где:

u — вектор концентраций, участвующих в процессе веществ;

D — матрица коэффициентов диффузии;

p — параметры, описывающие кинетику процесса.

Функция $f(u, p)$ характеризует изучаемую систему.

В качестве такого описания выступают кинетические уравнения протекающих реакций. Классическим примером [63] для такого описания является следующая система реакций:



Для системы (10) уравнения типа (9) будут записаны следующим образом [69]:

$$\begin{aligned} \frac{\partial u_1}{\partial t} &= D_1 \nabla^2 u_1 + k_2 a - k_1 u_1 + k_3 u_1^2 u_2 \\ \frac{\partial u_2}{\partial t} &= D_2 \nabla^2 u_2 + k_4 b - k_3 u_1^2 u_2 \end{aligned} \quad (11)$$

где:

u_1, u_2, a и b — концентрации X, Y, A, B , соответственно;

$k_1 \dots k_4$ — кинетические константы.

Очевидно, что при $f(u, p) = 0$ в системе наблюдается стационарное состояние. Тьюринг в своей работе [69] показал, что при определенных значениях кинетических параметров и коэффициентов диффузии подобное стационарное состояние может перейти в нестабильное и при наличии диффузии эволюционировать в пространственно неоднородную структуру. Такой эффект отмечается, если один из параметров подвержен бифуркации.

Впервые химическую реакцию, в которой наблюдаются автоколебания, обнаружил Б.П. Белоусов; его работа была опубликована в 1959 году [1]. В данной работе Белоусов пытался обнаружить аналог цикла Кребса в неживой системе. Далее данная реакция была изучена А.М. Жаботинским, полученные результаты [76, 77] вызвали значительный интерес, как с точки

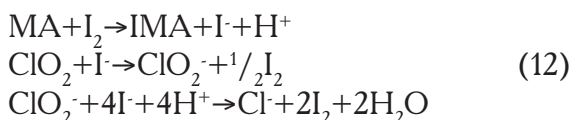
зрения изучения автоколебательных процессов в химии, так и с позиций возможности получения математического описания автоволновых процессов. Отталкиваясь от реакции Белоусова – Жаботинского, к настоящему времени был открыт целый ряд автоволновых химических реакций. Среди этих систем можно упомянуть такие, как:

- реакция Бриггса – Раушера [10];
- система полиакриламид – метиленовый синий, сульфид – кислород (РА-МВО – polyacrylamide-Methylene Blue-sulfide-oxygen) [59];
- реакция гексацианоферрат(II) – йодат – сульфит (FIS – hexacyanoferrate(II)-iodate-sulfite) [46, 47];
- реакция хлорит – йодид – малоновая кислота – крахмал (СИМА – chlorite-iodide-malonic acid-starch reaction) [16].

Подробное описание теоретических вопросов автоволновых химических реакций можно найти в работах [4, 45, 56].

В настоящей статье подробнее остановимся только на некоторых вопросах, связанных с автоволновыми процессами, которые более интересны с точки зрения возможного применения при моделировании внутриклеточных процессов.

Реакция СИМА интересна тем, что в полной мере отражает результаты тех вычислений, которые представил Тьюринг в своей работе [69]. Для данной реакции была разработана математическая модель [49, 50], основные положения которой рассмотрим далее. Модель основана на следующих реакциях:



МА – малоновая кислота.

Скорости реакций определяются в соответствии со следующими уравнениями:

$$\begin{aligned} r_1 &= \frac{k_1[\text{MA}][\text{I}_2]}{w_1 + [\text{I}_2]} \\ r_2 &= k_2[\text{ClO}_2][\text{I}^-] \end{aligned} \quad (13)$$

$$r_3 = k_{3a}[\text{ClO}_2^-][\text{I}^-][\text{H}^+] + k_{3b} \frac{[\text{ClO}_2^-][\text{I}_2][\text{I}^-]}{w_3 + [\text{I}^-]^2}$$

где:

$k_1, k_2, k_{3a}, k_{3b}, w_1, w_3$ – константы.

Основной сложностью при моделировании данной системы является определение коэффициентов диффузии. Авторы [48] предположили, что реакция между йодидом и гелем либо крахмалом может использоваться для снижения скорости диффузии активирующего

реакции вещества. Опираясь на этот эффект, можно получить диффузионные коэффициенты, при которых в результате реакции СИМА образуются структуры Тьюринга. В данном случае модель будет выглядеть следующим образом:

$$\begin{aligned} \frac{\partial u_1}{\partial t} &= k_1 - u - \frac{4u_1u_2}{1+u_1^2} + \nabla^2 u_1 \\ \frac{\partial u_1}{\partial t} &= k_2 \left[k_3 \left(u_1 - \frac{u_1u_2}{1+u_1^2} \right) + c\nabla^2 u_2 \right] \end{aligned} \quad (14)$$

Численные моделирования показали образование структур Тьюринга в данной системе.

При разработке подобных моделей ключевым параметром являются коэффициенты диффузии [52]. В работе [41] приведен подход к определению этих коэффициентов. Рассмотрим его на примере простой реакции (описание по [41, 52]):



Записав уравнение (9) для каждого из веществ, получим следующую систему:

$$\begin{aligned} \frac{\partial u}{\partial t} &= f(u, v) - r_1us + r_2c + D_u\nabla^2 u \\ \frac{\partial v}{\partial t} &= g(u, v) + D_v\nabla^2 v \\ \frac{\partial c}{\partial t} &= r_1us - r_2c \end{aligned} \quad (16)$$

где:

u, s и c – концентрации U, S и C, соответственно;

r_1 – скорость прямой реакции;

r_2 – скорость обратной реакции.

В случае если скорости реакций велики, анализируя систему (16), можно получить, что концентрация S будет близка к исходной.

Сложение первого и третьего уравнений в системе (16) позволяет получить уравнение для концентрации u:

$$(1+r) \frac{\partial u}{\partial t} = f(u, v) + D_u\nabla^2 u \quad (17)$$

где $r = s_0 r_1 / r_2$, s_0 – исходная концентрация вещества s.

Таким образом, при r , намного больших единицы, диффузия вещества U существенно снижается.

Подобный подход к моделированию химических систем был использован в работе [65] для моделирования процесса гликолиза. В дальнейшем появились модификации данной модели [30–32], которые в общем виде сводятся к следующим уравнениям:

$$\begin{aligned} f_1(u_1, u_2) &= u_1 - u_1 u_2^2 + k_1(1 - u_1) \\ f_2(u_1, u_2) &= u_2 + u_1 u_2^2 - (k_1 + k_2)u_2 \end{aligned} \quad (18)$$

Результаты численных симуляций, проведенных по данной модели [57], показали корреляцию с полученными впоследствии экспериментальными данными [46].

Из приведенного обзора можно сделать вывод, что на сегодняшний день существуют подходы к моделированию автоколебательных и неравновесных процессов. Очевидно, что до сих пор недостаточно опытных данных для широкого использования данного подхода при моделировании внутриклеточных процессов. Однако уже сейчас можно опираться на данный подход при анализе некоторых процессов (того же гликолиза) и включать полученные системы уравнений в общую модель.

Заключение

Разработка математических моделей позволяет моделировать различные варианты экспериментов и отобрать те из них, которые показали качественные результаты для дальнейшей экспериментальной работы. С другой стороны, сам процесс разработки моделей дает возможность упорядочить и структурировать известный объем данных и показать направления для дальнейшей экспериментальной работы.

Как видно из приведенного обзора, вопросы моделирования внутриклеточных процессов весьма актуальны. С одной стороны, уже накопилось достаточно информации об этих процессах, для того чтобы получить адекватные модели, с другой, — все еще многое остается неизвестным, что вызывает необходимость использовать модели как один из инструментов в исследовательском процессе. Рост количества работ и многообразие подходов к моделированию в последние годы только подтверждают сказанный выше тезис.

Рассмотрение современных моделей и подходов к моделированию показывает, что уже назрела необходимость включения в модели вопросов, связанных с транспортом веществ внутри клетки. В настоящее время недостаточно данных для полного математического описания этих процессов, однако в отдельных случаях определенные элементы и подходы уже возможно использовать. К таким подходам можно отнести работы по неравновесной термодинамике и диссипативным системам, которые крайне интересны как инструмент для моделирования систем метаболических реакций с

учетом диффузионных процессов. Модель бифуркации нашла применение и для анализа эпигенетических процессов [40].

В целом можно ожидать, что направление математического моделирования внутриклеточных процессов в ближайшем будущем будет активно развиваться и стоит ожидать новых интересных моделей как отдельных реакционных систем, так и клеток в целом.

Литература

1. Белоусов Б.П. Периодически действующая реакция и ее механизм / Сб. рефератов по радиационной медицине за 1958 г. — М: Медгиз, 1959. — С. 145.
2. Гордеева А.В., Лабас Ю.А., Звягильская Р.А. Апоптоз одноклеточных организмов: механизмы и эволюция // Биохимия. — 2004. — Т. 69. — №. 10. — С. 1301–1313.
3. Назипова Н.Н., Панкратов В.В., Звягильская Р.А., Дроздов-Тихомиров Л.Н. Математическое моделирование живой растущей клетки методом баланса стационарных метаболических потоков // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2007. — Т. 3. — № 1. — С. 5–20.
4. Рубин А.Б. Биофизика. Том 1. Теоретическая биофизика. — М. — Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2013. — 472 с.
5. Alberts B. et al. Molecular biology of the cell. 5th ed. — Garland science, 2008. — 1601 p.
6. Bioenergetics of Photosynthesis. Ed. by Govindjee. — Academic Press, 1975.
7. Boghigian B.A., Seth G., Kiss R., Pfeifer B.A. Metabolic flux analysis and pharmaceutical production // Metabolic Engineering. — 2010. — Vol. 12. — P. 81–95.
8. Boyle N.R., Morgan J.A. Computation of metabolic fluxes and efficiencies for biological carbon dioxide fixation // Metabolic Engineering. — 2011. — Vol. 13. — P. 150–158.
9. Bratton B.P., Mooney R.A., and Weisshaar J.C. Spatial distribution and diffusive motion of RNA polymerase in live Escherichia coli // J. Bacteriol. — 2011. — Vol. 193. — P. 5138–5146.
10. Briggs T.S., Rauscher W.C. An oscillating iodine clock // J. Chem. Educ. — 1973. — Vol. 50. — No. 7. — P. 496.
11. Burek M., Oppenheim R.W. Cellular interactions that regulate programmed cell death in the developing vertebrate nervous system / In: Koliatsos, V., Ratan, R. (Eds.). Cell Death and Disease of the Nervous System, vol. 1. — Humana, Totowa, 1999. — P. 145–180.
12. Chandrasekaran S., and Price N.D. Probabilistic integrative modeling of genome-scale metabolic and regulatory networks in Escherichia coli and Mycobacterium tuberculosis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2010. — Vol. 107. — P. 17845–17850.

13. *Covert M.W., Knight E.M., Reed J.L., Herrgard M.J., and Palsson B.O.* Integrating high-throughput and computational data elucidates bacterial networks // *Nature*. – 2004. – Vol. 429. – P. 92–96.
14. *Covert M.W., Schilling C.H., and Palsson B.O.* Regulation of gene expression in flux balance models of metabolism // *J. Theor. Biol.* – 2001. – Vol. 213. – P. 73–88.
15. *Covert M.W., Xiao N., Chen T.J., and Karr J.R.* Integrating metabolic, transcriptional regulatory and signal transduction models in *Escherichia coli* // *Bioinformatics*. – 2008. – Vol. 24. – P. 2044–2050.
16. *De Kepper P., Epstein I.R., Kustin K., Orban M.* Batch oscillations and spatial wave patterns in chlorite oscillating systems // *J. Phys. Chem.* – 1982. – Vol. 86. – P. 170.
17. *Devendra R., Drazer G.* Deterministic fractionation of binary suspensions moving past a line of microposts // *Microfluid Nanofluid.* – 2014 (on-line access paper).
18. *Di Ventura B., Lemerle C., Michalodimitrakis K., and Serrano L.* From in vivo to in silico biology and back // *Nature*. – 2006. – Vol. 443. – P. 527–533.
19. *Dolnik M., Zhabotinsky A.M. and Epstein I.R.* Modulated and alternating waves in a reaction-diffusion model with wave instability // *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* – 1996. – Vol. 92. – P. 2919.
20. *Duarte N.C., Herrhard M.J., Palsson B.O.* Reconstruction and validation of *Saccharomyces iND750*, a fully compartmentalized genome-scale metabolic model // *Genome Res.* – 2004. – Vol. 14(7). – P. 1298–1309.
21. *Fedorov M.V., Goodman J.M. and Schumm S.* To switch or not to switch: The effects of potassium and sodium ions on r-poly-L-glutamate conformations in aqueous solutions // *J. Am. Chem. Soc.* – 2009. – Vol. 131. – P. 10854–10856.
22. *Feijo Delgado F., Cermak N., Hecht V.C., Son S., Li Y., et al.* Intracellular water exchange for measuring the dry mass, water mass and changes in chemical composition of living cells // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8(7): e67590. doi:10.1371/journal.pone.0067590.
23. *Fischer C.R., Klein-Marcuschamer D., Stephanopoulos G.* Selection and optimization of microbial hosts for biofuels production // *Metabolic Engineering*. – 2008. – Vol. 10. – P. 295–304.
24. *Foster J., Famili I., Palsson B.O., Nielsen J.* Large-scale evaluation of in silico gene deletions in *Saccharomyces cerevisiae* // *OMICS*. – 2003. – Vol. 7(2). – P. 193–202
25. *Fraser C.M., Gocayne J.D., Venter J.C., et al.* The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium* // *Science*. – 1995 Oct 20. – Vol. 270(5235). – P. 397–403.
26. *Gibson D.G., Glass J.I., Venter J.C. et al.* Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome // *Science*. – 2010 July 2. – Vol. 329(5987). – P. 52–56. DOI: 10.1126/science.1190719.
27. *Glass J.I., Assad-Garcia N., Alperovich N., Yooseph S., Lewis M.R., Maruf M., Hutchison C.A., III, Smith H.O., and Venter J.C.* Essential genes of a minimal bacterium // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2006. – Vol. 103. – P. 425–430.
28. *Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H., Davis R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D., Jacq C., Johnston M., Louis E.J., Mewes H.W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H. & Oliver S.G.* // *Science*. – 1996. – Vol. 274(5287). – P. 546, 563–567.
29. *Goyal M., Bhargava R.* Numerical study of thermodiffusion effects on boundary layer flow of nanofluids over a power law stretching sheet // *Microfluid Nanofluid.* – 2014 (on-line access paper).
30. *Gray P. and Scott S.K.* Autocatalytic reactions in the isothermal continuous stirred tank reactor: isolas and other forms of multistability // *Chem. Eng. Sci.* – 1983. – Vol. 38(1). – P. 29–43.
31. *Gray P. and Scott S.K.* Autocatalytic reactions in the isothermal continuous stirred tank reactor: oscillations and instabilities in the system $a + 2b \rightarrow 3b; b \rightarrow c$ // *Chem. Eng. Sci.* – 1984. – Vol. 39(6). – P. 1087–1097.
32. *Gray P. and Scott S.K.* Sustained oscillations and other exotic patterns of behavior in isothermal reactions // *J. Phys. Chem.* – 1985. – Vol. 89. – P. 22–32.
33. *Guell M., van Noort V., Yus E., Chen W-H., Leigh-Bell J., Michalodimitrakis K., Yamada T, Arumugam M., Doerks T., Kuhner S., Rode M., Suyama M., Schmidt S., Gavin A-C., Bork P., Serrano L.* Transcriptome complexity in a genome-reduced bacterium // *Science*. – 2009. – Vol. 326. – P. 1268–1271.
34. *Hames C., Halbedel S., Hoppert M., Frey J., Stulke J.* Glycerol metabolism is important for cytotoxicity of *Mycoplasma pneumoniae* // *J. Bacteriol.* – 2009. – Vol. 191. – P. 747–753.
35. *Harada Y., Funatsu T., Murakami K., Nonoyama Y., Ishihama A., and Yanagida T.* Single-molecule imaging of RNA polymerase-DNA interactions in real time // *Biophys. J.* – 1999. – Vol. 76. – P. 709–715.
36. *Haykin S.* Neural networks and learning machines (3rd ed.). – Pearson Education Inc., New Jersey, 2009.
37. *Heiner M., Deussen P., Spranger J.* A case study in design and verification of manufacturing system control software with hierarchical Petri nets // *Int. J. Adv. Manuf. Technol.* – 1999. – Vol. 15. – P. 139–152.
38. *Heiner M., Koch I., Will J.* Model validation of biological pathways using Petri nets –demonstrated for apoptosis // *BioSystems*. – 2004. – Vol. 75. – P. 15–28.
39. *Heiner M., Ventre G., Wikarski D.* A Petri net based methodology to integrate qualitative and quantitative analysis // *J. Inf. Software Technol., Special Issue on Software Engineering for Parallel Systems*. – 1994. – Vol. 36/7. – P. 435–441.
40. *Jost D.* Bifurcation in epigenetics: Implications in development, proliferation, and diseases // *Physical Review E Accepted paper* – Jan 10, 2014.

41. *Kapral R.* Pattern formation in chemical systems // *Physica D.* — 1995. — Vol. 86. — P. 149.
42. *Karr J.R., Sanghvi J.C., Macklin D.N. et al.* A whole-cell computational model predicts phenotype from genotype // *Cell.* — 2012. — Vol. 150. — P. 389-401.
43. *Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R.* Apoptosis: a basic phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics // *Br. J. Cancer.* — 1972. — Vol. 26. — P. 239-257.
44. *Koch I. and Heiner M.* Petri nets in analysis of biological networks / In: *Wiley Book Series in Bioinformatics.* Junker B.H. and Schreiber F. (eds.), Pan Y. and Zomaya A.Y. (series eds.). — Wiley, 2008. — P. 139-180.
45. *Kondepudi D., Prigogine I.* Modern Thermodynamics. From Heat Engines to Dissipative Structure. — John Wiley and Sons, Inc., 1998.
46. *Lee K.J., McCormick W.D., Ouyang Q., Swinney H.L.* Pattern formation by interacting chemical fronts // *Science.* — 1993. — Vol. 251. — P. 192.
47. *Lee K.J., McCormick W.D., Swinney H.L., Pearson J.E.* Experimental observation of self-replicating spots in a reaction-diffusion system // *Nature.* — 1994. — Vol. 369. — P. 215.
48. *Lengyel I. and Epstein I.R.* Modeling of Turing structures in the chlorite-iodide-malonic acid-starch reaction system // *Science.* — 1991. — Vol. 251. — P. 650.
49. *Lengyel I., Rabai G. and Epstein I.R.* Batch oscillation in the reaction of chlorine dioxide with iodine and malonic acid // *J. Am. Chem. Soc.* — 1990. — Vol. 112. — P. 4606-4607.
50. *Lengyel I., Rabai G. and Epstein I.R.* Experimental and modeling study of oscillations in the chlorine dioxide-iodine-malonic acid reactions // *J. Am. Chem. Soc.* — 1990. — Vol. 112. — P. 9104.
51. *Maier T., Schmidt A., Guell M., Kuhner S., Gavin A-C., Aebersold R., Serrano L.* Quantification of mRNA and protein and integration with protein turnover in a bacterium // *Mol. Syst. Biol.* — 2011. — Vol. 7. — P. 511.
52. *Maini Ph.K., Painter K.J. and Helene Nguyen Phong Chau.* Spatial pattern formation in chemical and biological systems // *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* — 1997. — Vol. 93(20). — P. 3601-3610.
53. *Miwa Y., Li C., Ge Q-W, Matsuno H., and Miyano S.* On determining firing delay time of transitions for Petri net based signaling pathways by introducing stochastic decision rules // *In Silico Biology.* — 2010. — Vol. 10, 0004.
54. *Nicolaou S.A., Gaida S.M., Papoutsakis E.T.* A comparative view of metabolite and substrate stress and tolerance in microbial bioprocessing: From biofuels and chemicals, to biocatalysis and bioremediation // *Metabolic Engineering.* — 2012. — Vol. 12. — P. 307-331.
55. *Oltvai Z.N. & Barabasi A.-L.* Life's complexity pyramid // *Science.* — 2002. — Vol. 298(5594). — P. 763-764.
56. *Oscillations and traveling waves in chemical systems.* Ed. by R.J. Field and M. Burger. — John Wiley and Sons, Inc., 1985.
57. *Pearson J.E.* Complex patterns in a simple system // *Science.* — 1983. — Vol. 261. — P. 189-192.
58. *Reisig W.* Petri Nets. An Introduction. — Springer. Schacherer, F.G.D., 1982.
59. *Resch P., Field R.J., Schneider F.W., Burger M.* Reduction of methylene blue by sulfide ion in the presence and absence of oxygen: Simulation of the methylene blue-O₂-HS-CSTR oscillations // *J. Phys. Chem.* — 1989. — Vol. 93(25). — P. 8181-8186.
60. *Ross S.M.* Stochastic Processes. 2nd ed. — Wiley, 1996. — 528 p.
61. *Sackmann A., Heiner M. and Koch I.* Application of Petri net based analysis techniques to signal transduction pathways // *BMC Bioinformatics.* — 2006. — Vol. 7. — P. 482.
62. *Savinell J.M., Palsson B.O.* Network analysis of intermediary metabolism using linear optimization. I. Development of mathematical formalism // *J. Theor. Biol.* — 1992. — Vol. 154(4). — P. 421-454.
63. *Schnakenberg J.* Simple chemical reaction systems with limit cycle behavior // *J. Theor. Biol.* — 1979. — Vol. 81. — P. 389.
64. *Schuster R. & Schuster L.* Refined algorithm and computer program for calculation all non-negative fluxes admissible in steady states of biochemical reaction system with or without some flux rates fixed // *Comput. Appl. Biosci.* — 1993. — Vol. 9. — P. 79-85.
65. *Selkov E.E.* Self-oscillations in glycolysis // *Eur. J. Biochem.* — 1968. — Vol. 4. — P. 79.
66. *Seybert A., Herrmann R., Frangakis A.S.* Structural analysis of Mycoplasma pneumoniae by cryo-electron tomography // *J. Struct. Biol.* — 2006. — Vol. 156. — P. 342-354.
67. *Stephanopoulos G.N., Aristidou A.A., Nielsen J.* Metabolic Engineering Principles and Methodologies. — Academic Press, San Diego, 1998.
68. *Suthers P.F., Dasika M.S., Kumar V.S., Denisov G., Glass J.I., and Maranas C.D.* A genome-scale metabolic reconstruction of Mycoplasma genitalium, iPS189 // *PLoS Comput. Biol.* — 2009. — Vol. 5. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1000285.
69. *Turing A.M.* Chemical basis of morphogenesis // *Philos. Trans. R. Soc. London, Sect. B.* — 1952. — Vol. 327. — P. 37.
70. *Volkmer B., Heinemann M.* Condition-dependent cell volume and concentration of Escherichia coli to facilitate data conversion for systems biology modeling // *PLoS ONE.* — 2011. — Vol. 6(7): e23126. doi:10.1371/journal.pone.0023126.
71. *Vora T., Hottes A.K., and Tavazoie S.* Protein occupancy landscape of a bacterial genome // *Mol. Cell.* — 2009. — Vol. 35. — P. 247-253.
72. *Wodke J.A.H., Puchalka J., Lluch-Senar M. et al.* Dissecting the energy metabolism in Mycoplasma pneumoniae through genome-scale metabolic modeling // *Molecular System Biology.* — 2013. — Vol. 9. — No. 633. — P. 1-19.

73. Wu J., Qi Z. and Voit E.O. Impact of delays and noise on dopamine signal transduction // *In Silico Biology*. – 2010. – Vol. 10, 0005.
74. Wyllie A.H. Apoptosis: an overview // *Br. Med. Bull.* – 1997. – Vol. 53. – P. 451–465.
75. Yus E., Maier T., Michalodimitrakis K., van Noort V., Yamada T., Chen W.H., Wodke J.A., Guell M., Martinez S., Bourgeois R., et al. Impact of genome reduction on bacterial metabolism and its regulation // *Science*. – 2009. – Vol. 326. – P. 1263–1268.
76. Zaikin A.N. and Zhabotinsky A.M. Concentration wave propagation in two-dimensional liquid-phase self-oscillating system // *Nature*. – 1970. – Vol. 225. – P. 535.
77. Zhabotinsky A.M. Periodic liquid phase reactions // *Proc. Ac. Sci. USSR*. – 1964. – Vol. 157. – P. 392.
78. Zhang S., Jin G., Zhang X.-S. and Chen L. Discovering functions and revealing mechanisms at molecular level from biological networks // *Proteomics*. – 2007. – Vol. 7. – P. 2856–2869.

MATHEMATICAL MODELING OF INTRACELLULAR PROCESSES

P.M. GOTOVTSEV, Z.B. NAMSARAEV, K.V. GORIN, A.V. KOMOVA, V.V. BUTYLIN,
H.W. BADRANOVA, M.A. LOMONOSOVA

NTK Bioenergetics, National Research Centre «Kurchatov Institute», Moscow

The article presents an overview and a brief analysis of some of the work in the study area. Mathematical modeling of intracellular processes today – dynamically developing area. Several research groups use different approaches and principles for modeling various processes of biochemical reactions specific to cell metabolism. Each of the existing approaches has its advantages and disadvantages, and requires different amounts of initial data. Some approaches to the modeling of intracellular processes and the structure of the cell models in general.

Keywords: mathematical modeling, intracellular processes, metabolism, nonequilibrium processes, Petri nets.

ЮБИЛЕЙНЫЕ И ЗНАМЕНАТЕЛЬНЫЕ ДАТЫ

К 10-летию основания Общества биотехнологов России имени Ю.А. Овчинникова

Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова отмечает свой хотя и небольшой, но значимый юбилей — 10-летие со дня своего основания. Это произошло 29 октября 2003 года в Пушкино-на-Оке, в знаменитом биологическом академгородке, на базе Филиала Института биоорганической химии им. М.М. Шемакина и Ю.А. Овчинникова РАН. Именно здесь заседал Учредительный съезд, который после обсуждения всех научных и организационных вопросов принял Устав Общества под названием «Общероссийская общественная организация «Общество биотехнологов России». избрал Центральное правление, Попечительский совет, утвердил структуру региональных отделений Общества (в 2004 году Обществу было присвоено имя Ю.А. Овчинникова). К этому времени уже было сформировано 46 отделений Общества с общим числом членов более тысячи человек. В управляющие структуры были избраны известные специалисты (Дебабов В.Г., Сандахчиев Л.С., Мирошников А.И., В.А. Быков и др.). Первым президентом был выбран Анатолий Андреевич Воробьев, академик РАН, заместитель академика-секретаря Отделения профилактической медицины РАН, генерал-майор медицинской службы — крупный ученый, обладавший значительным авторитетом в среде биотехнологов, человек большой душевной щедрости, мудрый, доброжелательный, с открытым, но сильным характером. Такие качества первого лица Общества оказались как нельзя кстати в то непростое для нашего отечества время. Это во многом способствовало тому, что Общество сравнительно быстро преодолело свойственный для нашей национальной специфики период раскачивания, организационных неурядиц или борьбы за первенство.

Инициаторы формирования этой общественной организации отдавали себе отчет в том, что речь шла не о построении с нуля новой структуры, а о преемственном воссоздании координирующего негосударственного органа, который помог бы обеспечить научно-методические и организационные возможности для возрождения отечественной биотехнологии. Еще в ходе вводной дискуссии на Учредительном съезде будущий президент Общества А.А. Воробьев сказал свои памятные слова: «Куда девалась биотехнология?».

Действительно, положение с биотехнологией в стране к началу 2000-х годов было просто катастрофическим. Впрочем, и с другими научно-практическими направлениями ситуация была не лучше. Россия из государства времен СССР, занимавшего лидирующие позиции по биотехнологии в мире, откатилась на места, явно не соответствовавшие ее научному, производственному и кадровому потенциалу. Это четко понимали организаторы вновь создаваемого Общества, многие из которых были реальными деятелями славного прошлого нашей страны, связанного с биотехнологией, и патристическое чувство которых не позволяло смотреть со стороны на продолжающуюся деградацию их детища.

Последующие события показали правильность, своевременность и социальную востребованность указанного организационного шага. Во многом благодаря усилиям Общества биотехнологов России за истекшие 10 лет удалось, используя механизм государственно-частного и общественного партнерства, повысить интерес, прежде всего, органов законодательной и исполнительной власти к проблемам развития биотехнологии на федеральном и региональном уровнях и начать практическую разработку этого направления. Сейчас сложно вычлнить конкретно или персонально, кто оказался наиболее активным и результативным в осуществлении позитивных сдвигов в данной сфере, но одно можно сказать твердо, что Общество сыграло свою роль как иницирующей центр кристаллизации актуальных начинаний в теории, методологии и практике биотехнологии. И это не просто голословное утверждение, ибо принцип коллективизма, соборности, социальной гармонии всегда импонирует российскому менталитету.

Прежде всего, от Общества постоянно исходила инициатива совершенствования законодательного обеспечения развития биотехнологии. Юбилейная дата позволяет подвести некоторый итог по этому вопросу. Всего было проведено три парламентских слушания и несколько круглых столов в Государственной Думе Федерального Собрания РФ. Очень важной вехой стал круглый стол «Законодательное обеспечение развития биотехнологической отрасли промышленности», состоявшийся в ГД ФС РФ 8 февраля 2005 года — спустя чуть больше года после создания Общества. Вся идеологическая основа данного мероприятия была заложена и реализована Обществом, включая подбор участников, профессионально владеющих предметом, подготовку, анализ, обобщение и публикацию мате-

риалов. Под патронатом Госдумы состоялись и другие обсуждения биотехнологических тем (генно-модифицированные продукты и др.). Среди них особое место занимает круглый стол «О совершенствовании законодательного обеспечения сохранения биологических коллекций для развития биотехнологической отрасли Российской Федерации», который прошел 9 июня 2011 года. В результате обсуждения был предложен комплекс мер по государственному регулированию сохранности биологических коллекций и созданию сети национальных биоресурсных центров как базы развития промышленной биотехнологии. Знаковым событием стали и парламентские слушания «Законодательное регулирование оборота генетически модифицированных продуктов в Российской Федерации» (проведены 7 июня 2012 г.). В целом думские мероприятия сыграли свою консолидирующую роль в формировании отношения государственных и общественных структур и бизнеса к биотехнологии как к приоритету высокого уровня. В этом несомненна заслуга и заместителя (а затем первого заместителя) Председателя ГД ФС РФ О.В. Морозова, всегда поддерживавшего биотехнологию в качестве неоспоримого приоритета современного государства и общества.

На первых этапах функционирования Общества существенную объединительную миссию выполняли съезды, которые проводились в Москве. Помимо прямого общения и разноплановой повестки дня, съезды решали организационные вопросы и обсуждали проблемы выработки наиболее перспективных направлений деятельности. Обязательно издавались материалы съездов, которые также выполняли объединяющую функцию и создавали постепенно расширяющийся информационный базис для специалистов биотехнологического профиля. За это время было проведено пять съездов Общества.

Параллельно велась работа по организации конференций, симпозиумов и семинаров в различных регионах страны, преимущественно в нестоличных городах. Так, например, за эти годы в Анапе прошел цикл конференций по медицинской биотехнологии, в Калининграде — по морской и пищевой биотехнологии. В Кирове состоялись конференции, семинары и рабочие совещания по методологии формирования и реализации региональных программ развития биотехнологии. В Санкт-Петербурге были организованы симпозиумы по общим вопросам биотехнологии и проблеме биобезопасности. В Казани были проведены разные форумы, посвященные геномным и постгеномным технологиям, вопросам подготовки биотехнологических кадров, мемориальное заседание

памяти крупного биохимика и биотехнолога академика А.А. Баева, конкурсные отборы работ молодых ученых по программе «Умник» (в рамках поддержки Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере — И.М. Бортник) и др. Часто использовалась площадка Пушкинского научного центра РАН, особенно для мероприятий, связанных с обсуждением исследований молодых ученых. Вообще теме поддержки начинающих исследователей в Обществе уделялось постоянное внимание, в том числе проведению конкурсов молодых ученых с вручением победителю медали имени Ю.А. Овчинникова.

Принципиальным действием руководства Общества стало решение о создании собственного периодического издания — ежеквартального научно-практического журнала «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова», главным редактором которого является президент Общества Р.Г. Васильев, сменивший первого президента А.А. Воробьева (1923—2006). Первый том журнала вышел в свет в 2005 году. Сейчас выпускается 9-й том. Он включен ВАК в число рецензируемых журналов. За истекшие девять лет журнал занял определенную информационную нишу среди профильных периодических изданий в сфере биотехнологии и физико-химической биологии и вызывает интерес у специалистов. Его бумажная версия дублируется электронной формой, помещенной на сайте Общества.

С 2004 года начал функционировать сайт Общества www.biosinfo, который выполняет крайне полезную миссию предоставления текущей электронной информации о состоянии биотехнологического направления в нашей стране и о тенденциях в развитии мировой биотехнологии.

Важной инициативой Общества стала разработка Национальной программы «Развитие биотехнологии в Российской Федерации на 2006—2015 гг.» (принята 27 октября 2005 года Третьим съездом Общества биотехнологии России), механизм реализации которой основан на принципе государственно-частного партнерства. В ней был обоснован перечень приоритетных научно-практических направлений и проектов, необходимых для ускоренного развития биотехнологии на федеральном и региональном уровнях. В 2005 году, когда была сформирована эта программа, она не получила поддержки на федеральном уровне. Однако региональный аспект оказался востребованным и после определенного периода проб и пилотных разработок были приняты собственные программы по биотехнологии в ряде субъектов РФ.

Это, в первую очередь, относится к Республике Татарстан и Чувашской Республике, где идея приоритетного развития биотехнологии нашла поддержку у руководителей регионов: их подписи стоят на титульных листах их программ (это произошло в 2010 году).

В целом следует признать, что, кроме Республики Татарстан и Чувашской Республики, важность биотехнологии на региональном уровне осознается в Кировской области, Калининграде, Владивостоке, Краснодаре, Санкт-Петербурге, Обнинске, Пензе, Саратове, Белгороде, Нижнем Новгороде, Томске, Тюмени, Новосибирске, Красноярске и т.д.

Для улучшения практических аспектов по предложению Общества был организован Союз предприятий биотехнологической отрасли. Объединение усилий двух общественных организаций способствовало решению ряда вопросов производственного характера.

Последние 3–4 года характеризуются значительным повышением интереса к биотехнологии в государственных органах, общественных организациях, у представителей бизнеса. В этих условиях Общество встраивается в общее русло данной позитивной тенденции и принимает активное участие в мероприятиях, которые оно считает актуальными. К числу наиболее значимых событий недавнего времени относится обоснование и разработка Обществом Стратегии развития биотехнологической отрасли промышленности в Российской Федерации до 2020 года (Стратегия «БИО-2020») и участие Общества в разработке Комплексной программы развития биотехнологий на период до 2020 года («Био-2020»), принятой в апреле 2012 г. и подписанной В.В. Путиным в бытность его премьер-министром Правительства РФ.

Другое знаковое событие — участие в формировании технологических платформ «Биотех-2030»,

«Медицина будущего» и «Биоэнергетика». При этом после создания этих платформ руководитель Общества биотехнологов России стал координатором одной из них — платформы «Биоэнергетика».

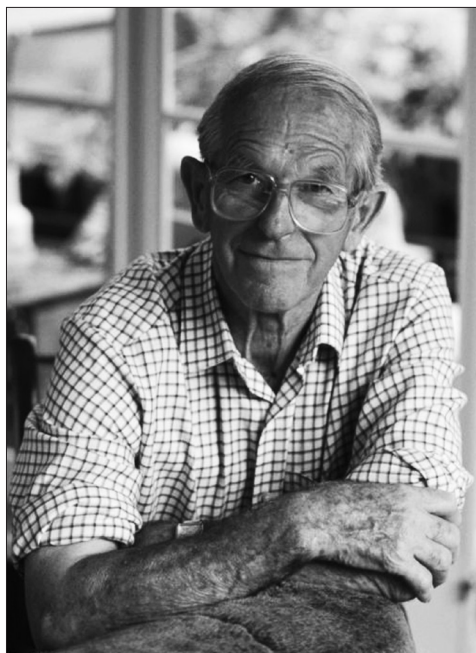
Наконец, стратегически важным направлением деятельности Общества является международное сотрудничество. Здесь установлены творческие контакты с учеными Германии, США, Индии, Финляндии, Кореи, стран СНГ и др. Закономерным развитием этого вектора стала организация такого крупного мероприятия, как выставка-форум «ЕвразияБио». Проведены два таких мероприятия в Москве. Они свидетельствуют о правильности и своевременности такого взаимодействия на евразийском пространстве ученых, практиков и бизнес-структур, работающих в области биоиндустрии.

Будет некорректным умолчать в юбилейные дни о перспективах Общества. 10-летний опыт его работы не дает повода для пессимизма. Напротив, форма общественной организации является вполне адекватной и жизнеспособной в современных экономических и политических условиях. Специалистам Общества видится будущее в концентрации усилий на реализации наиболее приоритетных целевых проектов, а также в преемственном развитии тех эффективных разработок и алгоритмов деятельности, которые вызвали наибольший общественный резонанс и имеют хороший экономический прогноз. К ним относятся платформа «Биоэнергетика», форум «ЕвразияБио», информационное поле, образовательные проекты, региональные программы и др.

Проведенный краткий анализ является предварительным вступлением к планируемому в номере 1 за 2014 год помещению подробной подборки исторических материалов и комментариев деятельности Общества за истекший десятилетний период.

СОБЫТИЯ ВТОРОЙ ПОЛОВИНЫ 2013 ГОДА

Некролог

Памяти Фредерика Сенгера*
(1918–2013)

19 ноября 2013 года скончался в возрасте 95 лет выдающийся химик XX века Фредерик Сенгер. Ушел из жизни человек, достигший беспрецедентного в истории науки результата, — дважды с интервалом в четверть века быть удостоенным Нобелевской премии по химии. Такое достижение вряд ли будет в скором времени повторено, а его имя будет вечно сохраняться в социальной памяти человечества.

Он умер во сне в одной из клиник Кембриджа. Годом раньше закончила свой жизненный путь его жена Маргарет Джоан, с которой они прожили вместе в счастливом браке с 1940 года. О ней супруг сказал: «Она — не ученый, но помогла мне в моих исследованиях более, чем кто-либо, обеспечив тепло и уют дома». Остались двое сыновей и дочь. Коллеги, ученые Англии, США, Франции и других стран выразили глубокое соболезнование в связи с его кончиной (в научных журналах, СМИ, Интернете).

Журнал откликнулся на 90-летний юбилей ученого материалами о его жизни и деятельности (Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А.

Овчинникова, 2008, Т. 4, № 3, с. 54–63). Поэтому в некрологе акцент на подробные биографические сведения делаться не будет, а внимание будет обращать на отдельные, наиболее характерные детали.

Надо подчеркнуть крайне высокую содержательность вклада Сенгера в сформировавшуюся в минувшем столетии молекулярную биологию. Прежде всего, это касается расшифровки структуры инсулина, к которой он приступил в 1943 году, будучи молодым исследователем. Эта задача оказалась ему по силам, и через 13 лет он, практически работая в одиночку (особенно на начальных этапах), решил ее, представив в 1956 году полные данные о химическом строении инсулина, за что был награжден Нобелевской премией в 1958 году. Все получилось просто и изящно, как в музыке Моцарта: была обнаружена структура из двух цепей 51 аминокислот (длинной — 30, короткой — 21), соединенных между собой двумя дисульфидными мостиками; короткая цепь также обладает одной петлей из дисульфидного мостика.

Однако Сенгера ждала и другая не менее значимая удача. Пройдя период некоторого спада в результативности своих исследований («lean years with no major success», как он назвал эти годы и при этом заметил, что жизнь ученого — это не череда сплошных успехов; встречаются и черные полосы, и их надо стойчески переносить), он начиная с 1962 года активно подключился к работам по изучению нуклеиновых кислот в кембриджской лаборатории — MRC Laboratory of Molecular Biology, в которой в разные годы трудились восемь Нобелевских лауреатов. Его упорство и методическая изобретательность проявились и здесь: он предложил метод секвенирования нуклеотидных последовательностей (метод обрыва цепи дидезоксидными основаниями, названный впоследствии методом Сенгера). За это в 1980 году ему была вручена Нобелевская награда (на этот раз вместе с У. Гилбертом и П. Бергом). При вручении премии от имени Шведской королевской академии Б.Г. Мальстрем сказал, что открытия лауреатов «сделали возможным проникновение в еще большие глубины в нашем понимании взаимосвязи между химической структурой и биохимической функцией генетического материала». Примечательно, что он и сам с помощью своего нового дидезоксидного метода сделал ряд выдающихся открытий: раскрыл структуру ДНК митохондрий человека, состоящую из 16338 нуклеотидов (1981), определил полную нуклеотидную последовательность бактериофага лямбда из 48500 нуклеотидов

* Материал подготовлен В.С. Воробьевым

(1982) (еще раньше в 1960–1970-е годы с помощью радиоизотопного метода он выявил структуру 5S РНК, состоящую из 120 оснований, и установил генетическую карту ДНК фага ФХ174, имеющую в своем составе 5375 оснований — опубликовано в «Nature» в 1977 г.). С использованием модифицированного метода Сенгера расшифровывался геном человека и других организмов, и он входит в число современных востребованных биохимических методов.

Человек, сделавший столь экстраординарные открытия, обладал при этом скромностью и сдержанностью в публичной сфере. Как и подобает всякой высокоодаренной личности, это было не причиной, а следствием его внутренней сущности — правильной самооценки собственного таланта. Известно высказывание Сенгера об особенностях своей работы: он считал, что у него все в порядке с экспериментальной работой и обдумыванием фактов, но есть проблемы с разговорами. В некрологе уместно процитировать его на английском языке: «Of the three main activities involved in scientific research, thinking, talking, and doing, I much prefer the last and am probably best at it. I am all right at the thinking, but not much good at the talking» (опубликовано в его автобиографической заметке: Sanger Frederick. Sequences, Sequences, and Sequences // Annual Review of Biochemistry. — 1988. — Vol. 57. — P. 1–29).



Ф. Сенгер получает вторую Нобелевскую премию (1980)

Поэтому-то, выйдя в отставку в возрасте 65 лет, он предпочитал уединение и занятия любимыми ненаучными делами (типа садоводства). Больше того, он избегал лишних коммуникаций (исключая свой институт) и общественной активности. Единжды он сделал исключение из своего правила: подписал коллективное

письмо английских лауреатов Нобелевской премии против поддержанной Великобританией войны США в Ираке в 2003 году. Здесь сказывается его воспитание в духе квакерских принципов: неприятие войны во всех ее видах (известно, что он поэтому был освобожден от воинской повинности во время Второй мировой войны).



Институт Сенгера в Кембриджшире

Как лицо, удостоенное самых высоких орденов Великобритании, по статусу он раз в пять лет должен был участвовать вместе с супругой на торжественных раутах в присутствии королевы. Великий исследователь не без тонкого английского юмора отмечал, что жене очень нравились эти приемы. Известно также, что он отказался от возведения в рыцари, не желая именоваться «сэр».

Сенгер ценил уровень работ советских ученых, общался с академиком Ю.А. Овчинниковым и хорошо понимал его роль в науке своей страны и в международном сотрудничестве. Сохранился теплый отзыв 70-летнего Сенгера о Юрии Анатольевиче, в котором он сожалеет о его раннем уходе из жизни и подчеркивает его научную и организационную роль: такая оценка многого стоит.

Излишне говорить, что на родине ему были оказаны высшие почести. Помимо официальных наград и членства в академиях и обществах, самое главное — это было открытие в Кембридже института его имени: Wellcome Trust Sanger Institute. Это — геномный исследовательский центр в Кембриджшире, основанный в 1992 году фондом «Wellcome Trust» и Британским советом по медицинским исследованиям с целью исследования генома человека и других организмов. Сенгеровский институт стал одним из базовых учреждений по международной программе «Геном человека». Ныне институт по-прежнему сохраняет свою высокую репутацию, ведь он обязан по долгу соответствовать имени того, в честь кого был создан.

Конечно, горько сожалеть, что уходят из жизни последние создатели молекулярной биологии, участники знаменитой генетической гонки истекшего века. Недавно скончались Артур Корнберг, Маршалл Ниренберг, Гобинд Корана. Их долгожительство выполняло важную воспитательную и этическую миссию для новых поколений биохимиков и биотехнологов. Но ведь именно они своим подвижническим трудом и сверхоткрытиями утверждали триумф и бессмертие человеческой мысли, которая может проникать в глубины живой и неживой материи. Поэтому хотя бы удовлетворительным утешением может быть сохранение в корпоративной памяти ученых непреходящей ценности их идей.

Вечная память величайшему английскому гению!

КОНФЕРЕНЦИИ

38-й Конгресс FEBS (Санкт-Петербург, 6–11 июля 2013 г.)

6–11 июля 2013 года в Санкт-Петербурге состоялся очередной, ежегодно проводящийся 38-й Конгресс Федерации европейских биохимических обществ (FEBS). Это уже второй конгресс FEBS, который проводится в нашей стране — первый состоялся в Москве в 1984 году (он был девятым по счету). В то время президентом FEBS был академик Ю.А. Овчинников, и у многих биохимиков среднего и старшего поколения он остался в памяти. На нем присутствовали Нобелевские лауреаты Лайнус Полинг и Дороти Ходжкин, бывшие тогда в зените славы. Биохимия и молекулярная биология в СССР была на подъеме, так что всем московский конгресс запомнился как большой праздник науки.

Организаторы Санкт-Петербургского конгресса старались поддержать традиции отечественной биохимии. Были приглашены десять лауреатов Нобелевской премии, некоторые прибыли и выступили с докладами: среди них — Ричард Робертс, Сидни Альтман, Курт Вютрих, Джек Шостак, Роджер Корнберг, Аарон Чехановер и др.

Мероприятие состоялось в павильонах «Ленэкспо» — специально предназначенном для таких крупных мероприятий месте. Было проведено более 80 научных заседаний, на которых выступили ученые из 26 стран (наибольшие делегации были из США, Великобритании, России, Германии). Однако основной состав участников конгресса был представлен слушателями — их приехало более 2500 человек, из них половина приходилась на молодежь. Это уже становится традицией международных форумов.

В работе конгресса приняли участие около 300 молодых ученых из России (благодаря поддержке грантов Российского фонда фундаментальных исследований). Прибыли ведущие российские специалисты — современные лидеры в научных направлениях конгресса.

В рамках конгресса состоялось примерно 40 симпозиумов по различным актуальным проблемам биохимии и молекулярной биологии: геномика, протеомика, биоинформатика, биотехнология, клеточные технологии и др. Центральной темой всех обсуждений была «Биологические механизмы».

Хороший фон для проведения конгресса создавал Санкт-Петербург с его неповторимой архитектурой и музейными раритетами.

В целом конгресс прошел на высоком уровне, о чем свидетельствуют многочисленные отклики.

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 26.12.13
Формат 60/90¹/₈. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 5,0. 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.

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

Членство в ОБР является бесплатным для физических лиц.

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

Тел.: +7 (495) 648-09-13

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