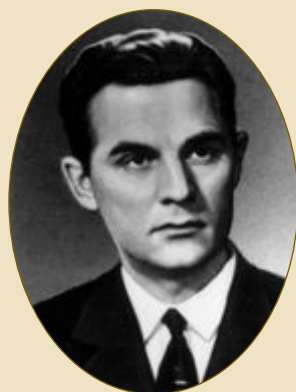


· БЕЛОЗЕРСКИЙ · ТОДД · СЕНГЕР · ОЧОА ·

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

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

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



Т. 9, № 2
2013

· СМИТ · ГИЛБЕРТ · БЕРГ · ЭНГЕЛЬГАРДТ ·

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

Научно-практический журнал

Основан в 2005 году

Главный редактор

Р.Г. Василев

Редакционная коллегия

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

Редакционный совет

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

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

Зав. редакцией О.В. Воробьева

Адрес: 119071 Москва, Ленинский пр-т, 33

Тел.: +7 (495) 648-09-13

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

Учредитель и издатель:

АНО «Информационно-аналитический центр
медико-социальных проблем»

Адрес: 127581 Москва, Керамический проезд, 53, кор. 1

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: raifvasilov@mail.ru

Издается при поддержке

Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

ISSN 1996-4741

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

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора К читателям. <i>Р.Г. Василев</i>	4
Оригинальные статьи	
Новая сайт-специфическая эндонуклеаза рестрикции <i>BruN4I</i> узнает и расщепляет последовательность ДНК 5'-G ⁺ GNNCC-3'. <i>В.А. Чернухин, Н.А. Михненко, Е.Н. Ломаковская, Н.М. Шинкаренко, В.С. Дедков, С.Х. Дегтярев</i>	5
Технология получения жира пищевого из голов лососевых рыб ферментативным способом. <i>А.Г. Артемова</i>	9
Растительно-микробные нутриенты. Сообщение 2: дрожжевая биоконверсия растительного сырья. <i>Чан Ван Ти, Л.А. Гулимова, Нгуен Чьонг Занг, К.В. Горин, Е.Г. Борисенко</i>	17
Совершенствование и обоснование технологии хранения икры лососевых рыб зернистой в полимерной таре. <i>Н.А. Платонова, Т.Е. Рубцова, Л.Д. Курлапова</i>	24
Метилзависимая сайт-специфическая ДНК-эндонуклеаза <i>BlsI</i> узнает и расщепляет последовательность ДНК 5'-RYNRY-3' при наличии в ней не менее двух 5-метилцитозинов. <i>В.А. Чернухин, Д.А. Гончар, Ю.Э. Томилова, А.А. Болтенгаген, Л.Н. Голикова, С.Х. Дегтярев</i>	30
Электрофоретическая подвижность эритроцитов как способ оценки функции коры надпочечников при стрессовых и патологических состояниях организма. <i>В.Н. Крылов, А.В. Дерюгина, Е.А. Антипенко</i>	39
Скрининг микробных сообществ — продуцентов биоводорода. <i>Э.Р. Садраддинова, А.И. Шестаков, С.М. Абрамов, Л.А. Кошкарлова, Т.И. Митрофанова, Р.Г. Василев, А.И. Нетрусов</i>	43
Влияние различных факторов на эффективность процесса термофильной микробной конверсии органических отходов в биоводород. <i>Э.Р. Садраддинова, А.И. Шестаков, С.М. Абрамов, В.И. Федосова, Л.А. Кошкарлова, Т.И. Митрофанова, Р.Г. Василев, А.И. Нетрусов</i>	52
Обзоры	
Предпосылки формирования Кировской областной программы развития биотехнологии как инструмента формирования региональной модели биоэкономики. <i>Р.Г. Василев, Т.Н. Гаева</i>	63
Физико-химические и кинетические свойства инулина. <i>В.Г. Артюхов, М.Г. Холявка, Т.А. Ковалева</i>	67
Страницы истории	
Юбилейные даты 2013 года в генетике (материал подготовлен <i>В.С. Воробьевым</i>)	77
Хроника	
События первой половины 2013 года	84
Правила для авторов	86

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. *R.G. Vasilov* 4

Original articles

A new site-specific restriction endonuclease BpuN4I recognizes and cleaves DNA sequence 5'-G⁺GNNCC-3'.

V.A. Chernukhin, N.A. Mikhnenkova, E.N. Lomakovskaya, N.M. Shinkarenko, V.S. Dedkov, S.Kh. Degtyarev..... 5

Technology for enzymatically producing edible fat from the heads of salmon.

A.G. Artemova 9

Plant-microbe nutrients. Report 2: yeast bioconversion of plant material.

Tran Van Chi, L.A. Gulimova, Nguyen Truong Giang, K.V. Gorin, E.G. Borisenko 17

Improvement and validation of technology storage of salmon caviar grains in plastic containers.

N.A. Platonova, I.E. Rubtsova, L.D. Kurlapova 24

Methyl-directed site-specific endonuclease BlnI recognizes and cleaves the DNA sequence 5'-RYNRY-3' in the presence of at least two 5-methylcytosines.

V.A. Chernukhin, D.A. Gonchar, J.E. Tomilova, A.A. Boltengagen, L.N. Golikova, S.Kh. Degtyarev 30

The electrophoretic mobility of red blood cells as a way to assess the function of the adrenal cortex in stress and pathological states of the organism.

V.N. Krylov, A.V. Deryugina, E.A. Antipenko 39

Screening of microbial communities – producing biohydrogen.

E.R. Sadraddinova, A.I. Shestakov, S.M. Abramov, L.A. Koshkarova, T.I. Mitrofanova, R.G. Vasilov, A.I. Netrusov 43

The effect of different factors on the efficiency of thermophilic microbial conversion of organic waste into biohydrogen.

E.R. Sadraddinova, A.I. Shestakov, S.M. Abramov, V.I. Fedosova, L.A. Koshkarova, T.I. Mitrofanova, R.G. Vasilov, A.I. Netrusov 52

Reviews

Prerequisites for the formation of the Kirov regional program of development of biotechnology as a tool for development of a regional model of the bioeconomy.

R.G. Vasilov, T.N. Gaeva 63

Physico-chemical and kinetic properties of inulinases.

V.G. Artukhov, M.G. Kholyavka, T.A. Kovaleva..... 67

Pages of history

Anniversary dates 2013 in genetics (material composed *V.S. Vorobyev*) 77

The chronicle

Events of the first half-year 2013 84

Rules for authors 86

К читателям

Во втором номере журнала за 2013 год сформирована подборка статей, охватывающих разные направления теоретической и практической биотехнологии. Традиционную нишу по изучению рестриктаз занимает коллектив исследователей из НПО «СибЭнзим» (Новосибирск). Они представили две статьи, в которых приводятся данные о новой сайт-специфической эндонуклеазе рестрикции *VruN41* и об особенностях субстратной специфичности метилзависимой сайт-специфической ДНК эндонуклеазы *BlsI* (Чернухин В.А. и др.).

Из ВНИРО (Москва) поступили две работы по морской биотехнологии (Артемова А.Г., Платонова Н.А. и др.) – в них говорится об усовершенствовании методов обработки икры лососевых рыб и технологиях получения пищевого жира из отходов рыбной промышленности.

Сотрудники Московского государственного университета пищевых производств (Борисенко Е.Г. с соавт.) продолжили свою серию публикаций о растительно-микробных нутриентах и приводят данные о дрожжевой био-конверсии растительного сырья.

Шестаков А.И. с коллегами (биологический факультет МГУ, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт») выполнили объемистое скрининговое исследование различных бактериальных сообществ с целью поиска перспективных объектов для производства биоводорода, а также апробировали наиболее ценные отобранные таксоны на модели конверсии в биоводород. Их материал отражен в двух статьях.

Группа авторов из Нижнего Новгорода (Крылов В.Н. с соавт.) представила данные о возможностях метода электрофоретической активности эритроцитов для оценки функции коры надпочечников.

В номере помещены также два обзора: один посвящен анализу физико-химических и кинетических свойств инулиназ (авторы из Воронежа – Артюхов В.Г. и др.), а в другом обзоре рассматриваются перспективы формирования региональной программы по биотехнологии в Кировской области (Василов Р.Г., Гаева Т.Н.) по итогам состоявшегося там недавно форума. В информационном разделе более подробно сообщается о работе этого форума.

В исторической рубрике проанализированы юбилейные даты 2013 года по генетике: приведены биографические сведения об известном отечественном цитогенетике А.А. Прокофьевой-Бельговской в связи со 110-летием со дня ее рождения, прокомментированы события, связанные с датами вручения Нобелевских премий Томасу Ханту Моргану и Барбаре Мак-Клинтон и др. (материал подготовлен В.С. Воробьевым).

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

НОВАЯ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА РЕСТРИКЦИИ VruN4I УЗНАЕТ И РАСЩЕПЛЯЕТ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ДНК 5'-G[↓]GNNCC-3'

В.А. ЧЕРНУХИН*, Н.А. МИХНЕНКОВА, Е.Н. ЛОМАКОВСКАЯ, Н.М. ШИНКАРЕНКО,
В.С. ДЕДКОВ, С.Х. ДЕГТЯРЕВ

НПО «СибЭнзим», Новосибирск

Из бактериального штамма *Bacillus pumilus* N4 выделена новая эндонуклеаза рестрикции VruN4I, определена ее субстратная специфичность и место расщепления ДНК. Эндонуклеаза рестрикции VruN4I узнает последовательность ДНК 5'-G[↓]GNNCC-3' и расщепляет ее как указано стрелкой. Фермент, расщепляющий сайт 5'-GGNNCC-3' с образованием четырех нуклеотидных 5'-лишних концов, обнаружен впервые. Рестриктаза VruN4I является неоизомером фермента NlaIV, имеющего такую же последовательность узнавания, но образующего фрагменты ДНК с тупыми концами.

Ключевые слова: эндонуклеаза рестрикции, неоизомер.

Введение

Эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы) являются сайт-специфическими ДНК-эндонуклеазами бактерий и, как правило, входят в состав систем рестрикции-модификации. К настоящему времени известно более 3900 систем рестрикции-модификации, узнающих около 330 различных последовательностей ДНК (<http://rebase.neb.com>) [5]. Некоторые рестриктазы имеют одинаковый сайт узнавания, однако расщепляют ДНК в различных позициях и называются неоизомерами.

В данной статье описывается новая рестриктаза VruN4I, являющаяся неоизомером эндонуклеазы рестрикции NlaIV.

Материалы и методы

Выращивание штамма-продуцента. Биомассу *B. pumilus* N4 выращивали в бульоне, содержащем 1% триптон («Organotechnie», Франция), 0,5% дрожжевой экстракт («Organotechnie», Франция), 0,5% NaCl,

0,05% MgCl₂ и 0,001% тиамин, рН 7,0. Для засева использовали культуру, выращенную при 30 °С в течение 18 ч при встряхивании в 6 колбах объемом 500 мл, содержащих по 300 мл бульона. Выращивание проводили в 20 литрах в ферментере («New Brunswick», США) при 30 °С, аэрации 15 л/мин., перемешивании 200 об./мин. в течение 5 ч до плотности A550 = 3,4. Клетки осаждали на центрифуге J2-21 («Beckman», США) в течение 30 минут в роторе JA-10 при 8000 об./мин. и замораживали. Было получено 74 г замороженных клеток.

Выделение и очистка фермента. Выделение фермента проводили при 4 °С путем колоночной хроматографии. 10 г замороженной биомассы суспендировали в 40 мл буфера А (10 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 0,1 мМ ЭДТА, 7 мМ β-меркаптоэтанол), содержащего 0,05 М NaCl, 0,3 мг/мл лизоцим, 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторид (PMSF), и инкубировали в течение 3 ч при постоянном перемешивании. Далее клетки разрушали ультразвуком и центрифугировали в течение 30 мин. в роторе JA-20 при 15000 об./мин. Супернатант пропускали через колонку с фосфоцеллюлозой P-11 («Whatman», Англия) объемом 30 мл, предварительно уравновешенную буфером А, содержащим 0,1 М NaCl, затем белок элюировали линейным градиентом NaCl (0,1 – 0,65 М) в буфере А объемом 500 мл, собирая фракции по 10 мл. Активные фракции объединяли и наносили на колонку с гидроксилapatитом объемом 2 мл, предварительно уравновешенную буфером В (0,01 М K₂HPO₄, рН 7,2, 7 мМ β-меркаптоэтанол). Колонку промывали 10 мл

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

* Автор для переписки:

Чернухин Валерий Алексеевич

ООО «СибЭнзим»

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

Тел./факс: +7 (383) 209-27-40

E-mail: valera@sibenzyme.ru

буфера В и проводили элюцию линейным градиентом K_2HPO_4 (0,01 – 0,2 М), в буфере В объемом 150 мл, собирая фракции объемом по 2 мл. Активные фракции объединяли и наносили на колонку с гепарин-сефарозой объемом 4 мл. Элюцию проводили линейным градиентом NaCl (0,1 – 0,7 М) в буфере А, объемом 120 мл, собирая фракции по 3 мл. Активные фракции объединяли и диализовали против 20 объемов концентрирующего буфера (10 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 0,1 мМ ЭДТА, 7 мМ β -меркаптоэтанол, 0,05 М NaCl, 50% глицерин). Препарат хранили при -20°C .

Полимеразную цепную реакцию проводили на амплификаторе Терцик («ДНК-технология», Россия) в 100 мкл смеси, содержащей 100 нг бактериальной ДНК; однократный буфер («СибЭнзим», Россия) для Taq ДНК полимеразы (60 мМ трис-НСl (рН 8,5); 25 мМ KCl; 1,5 мМ $MgCl_2$, 10 мМ 2-меркаптоэтанол; 0,1% Тритон X-100); 50 мкМ (каждый) дезоксинуклеозид-трифосфат; 0,1 мкМ (каждый) праймер и 1 ед. акт. Taq ДНК полимеразы. Профиль термоциклирования состоял из денатурации при 94°C в течение 3 мин. с последующим добавлением фермента во время паузы при 80°C и проведением 30 циклов: 94°C – 15 с, 45°C – 20 с, 72°C – 90 с. Завершающая стадия: 72°C – 120 с. Полученный фрагмент ДНК выделяли электрофорезом в 1%-ной агарозе и очищали при помощи набора QIAEX II («QIAGEN GmbH», Германия).

ПЦР фрагмента гена 16S РНК проводили с помощью следующих праймеров:

16S-direct 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCA-3'

16S-reverse 5'-TACGGYTACCTTGTTCACGACTT-3'

Определение нуклеотидной последовательности ДНК проводили на приборе 310 Genetic Analyzer ABI PRISM™ («Applied Biosystems», США) в соответствии с рекомендациями производителя.

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

Результаты и обсуждение

Идентификация штамма. Штамм-продуцент нового фермента выделен нами из почвенных изолятов, как описано ранее [2, 3] и депонирован в Коллекции культур микроорганизмов НПО «СибЭнзим» под номером 8M06. Клетки – подвижные грамположительные палочки размером $0,7 \times (2-5)$ мкм. Образуют овальные эндоспоры, не раздувающие клетку, расположенные

центрально. Клетки аэробные, каталазоположительные, растут при температуре от 10 до 45°C . На питательном агаре при 30°C за ночь образуют колонии, которые немного выпуклые, матово-блестящие, полупрозрачные, сероватые, до 4 мм в диаметре, нередко расплзаются. При старении колонии белеют и становятся непрозрачными. Образуют кислоту и ацетон из глюкозы, но не газ. Не гидролизуют крахмал, не восстанавливают нитрат в нитрит. Содержание G+C в ДНК штамма, определенное по методу [1], составляет 40%.

Определение первичной структуры гена 16S рРНК. Полимеразную цепную реакцию с праймеров 16S-direct и 16S-reverse на ДНК бактерии с последующим выделением полученного фрагмента ДНК и определением его первичной структуры проводили, как описано в методах. В соответствии с классификатором (<http://rdp.cme.msu.edu>) данная последовательность 16S РНК соответствует бактерии рода *Bacillus*. Идентификация по определителю Берджи [4] также позволяет отнести изучаемый штамм к виду *Bacillus pumilus*. Следовательно, на основе полученных морфологических данных и структуры гена 16S РНК штамм 8M06 был определен нами как *Bacillus pumilus* N4, а продуцируемая им рестриктаза в соответствии с номенклатурой [6] названа VpuN4I.

Определение оптимальных условий действия фермента. Оптимальные условия активности рестриктазы определяли путем расщепления λ ДНК (50 мкг/мл) при 37 , 55 и 70°C в 5 стандартных SE буферных растворах: буфер В – 10 мМ трис-НСl (рН 7,6 при 25°C), 10 мМ $MgCl_2$ и 1 мМ ДТТ; буфер G – 10 мМ трис-НСl (рН 7,6), 10 мМ $MgCl_2$, 50 мМ NaCl и 1 мМ ДТТ; буфер O – 50 мМ трис-НСl (рН 7,6), 10 мМ $MgCl_2$, 100 мМ NaCl и 1 мМ ДТТ; буфер W – 10 мМ трис-НСl (рН 8,5), 10 мМ $MgCl_2$, 100 мМ NaCl и 1 мМ ДТТ; буфер Y – 33 мМ трис-ацетат (рН 7,9), 10 мМ ацетат магния, 66 мМ ацетат калия и 1 мМ ДТТ. За единицу активности VpuN4I принимали минимальное количество фермента, необходимое для полного расщепления 1 мкг ДНК фага λ в буфере Y за 1 ч при 37°C в 20 мкл инкубационной смеси.

Все дальнейшие реакции с рестриктазой VpuN4I проводили в оптимальных условиях в течение 1 часа.

Определение сайт-специфичности VpuN4I. Сайт, узнаваемый рестриктазой, определяли по картинам расщепления различных ДНК. На рисунке 1 представлена электрофореграмма продуктов расщепления ДНК фагов λ и T7 эндонуклеазами рестрикции VpuN4I и PspN4I, причем последняя имеет узнаваемую

последовательность 5'-GGNNCC-3' (www.sibenzyme.com). Поскольку фрагменты ДНК были идентичны, это значит, что PspN4I и VruN4I узнают и расщепляют одну и ту же последовательность ДНК. То есть, эндонуклеаза рестрикции VruN4I узнает и расщепляет разнесенную тетрануклеотидную последовательность 5'-GGNNCC-3'.

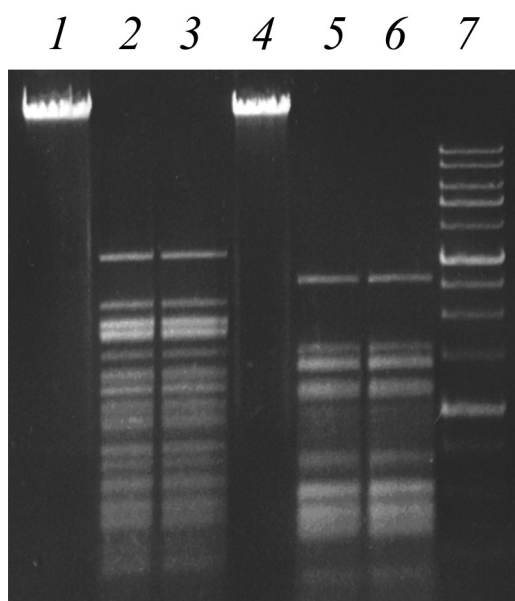


Рис. 1. Гидролиз ДНК фагов лямбда и T7 эндонуклеазами рестрикции PspN4I и VruN4I. Электрофорез в 1% агарозном геле. Дорожки: 1 – ДНК фага λ; 2 – ДНК фага λ + PspN4I; 3 – ДНК фага λ + VruN4I; 4 – ДНК фага T7; 5 – ДНК фага T7 + PspN4I; 6 – ДНК фага T7 + VruN4I; 7 – маркер молекулярной массы ДНК 1 kb (производство НПО «СибЭнзим»)

Определение позиции гидролиза ДНК рестриктазой VruN4I. Для подтверждения правильности установленной последовательности узнавания VruN4I и определения позиции расщепления ДНК мы проводили гидролиз синтетического олигонуклеотидного дуплекса, образованного из комплементарных олигонуклеотидов KpnI-1 и KpnI-2. Узнаваемая VruN4I последовательность выделена рамочкой.



Определение места гидролиза ДНК VruN4I осуществляли путем сравнения длин фрагментов, образуемых при расщеплении эндонуклеазой рестрикции VruN4I с позициями гидролиза эндонуклеазы PspN4I (расщепляющей сайт узнавания 5'-GGNNCC-3' между центральными нуклеотидами N) и Acc65I (расщепляющей сайт узнавания 5'-GGTACC-3' после

первого гуанина). В качестве маркера длин фрагментов использовали продукты частичного расщепления этих же дуплексов экзонуклеазой EhoIII из *E. coli*. На рисунке 2 приведен радиоавтограф электрофореграммы продуктов расщепления радиоактивно меченного дуплекса KpnI-1*/KpnI-2 в 20% ПААГ, с 7M мочевиной.

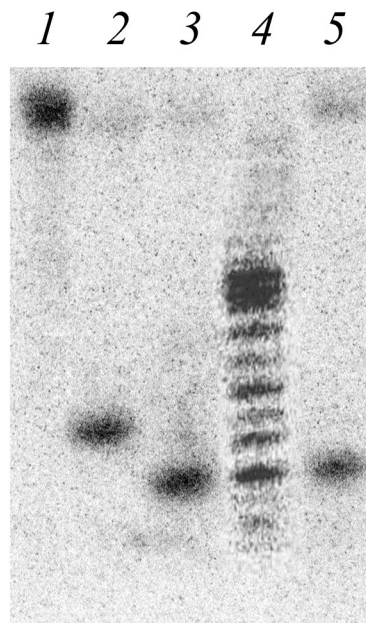


Рис. 2. Определение места расщепления ДНК эндонуклеазой рестрикции VruN4I. Меченые олигонуклеотиды со знаком *. Дорожки: 1 – дуплекс KpnI-1*/KpnI-2; 2 – дуплекс KpnI-1*/KpnI-2 + PspN4I; 3 – дуплекс KpnI-1*/KpnI-2 + VruN4I; 4 – дуплекс KpnI-1*/KpnI-2 + EhoIII; 5 – дуплекс KpnI-1*/KpnI-2 + Acc65I

Как видно из рисунка 2, фрагменты ДНК, образованные гидролизом VruN4I и Acc65I соответствующих дуплексов, имеют одинаковую длину, что свидетельствует об идентичности позиций гидролиза узнаваемой последовательности у этих ферментов на данном дуплексе. В то же время протяженность меченного P³² фрагмента, образованного гидролизом PspN4I, на два нуклеотида длиннее. Таким образом, VruN4I узнает последовательность ДНК 5'-GGNNCC-3' и расщепляет ее после первого гуанина на обеих цепях ДНК, образуя 5'-выступающие тетрануклеотидные концы. Данный фермент является неошизомером NlaIV.

Заключение

При гидролизе узнаваемой последовательности рестриктазой VruN4I образуются 5'-выступающие

«липкие» концы, сходные с концами, образованными в результате гидролиза ДНК ферментами с гексануклеотидным сайтом узнавания, расщепляющими некоторые варианты последовательности 5'-GGNNCC-3': Acc65I (сайт узнавания 5'-G[^]GTACC-3'), HgiCII (сайт узнавания 5'-G[^]GYRCC-3'), BamHI (5'-G[^]GATCC-3'), PspOMI (5'-G[^]GGCCC-3'). Сайты узнавания перечисленных выше рестриктаз входят в состав полилинкерных последовательностей наиболее распространенных векторов для клонирования ДНК.

Учитывая этот факт, а также сходные липкие концы, образующиеся при гидролизе данными ферментами, можно предположить, что описанный новый фермент BpuN4I окажется полезным для генно-инженерных манипуляций.

Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации по государственному контракту, заключенному в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы».

Литература

1. Дедков В.С. Определение содержания G+C в ДНК бактерий при помощи эндонуклеаз рестрикции // Биотехнология. — 2004. — № 4. — С. 77–82.
2. Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Определение эндонуклеаз рестрикции в колониях микроорганизмов *Streptomyces* и *Nocardia* // Прикл. биохимия и микробиология. — 1992. — Т. 28. — С. 309–313.
3. Дедков В.С., Погребняк В.Б. Определение эндонуклеаз рестрикции в лизатах из отдельных колоний бактерий и измерение активности BamHI, PstI и MspI у бактерий, выращенных на питательном агаре и в бульоне / Внехромосомные генетические элементы: значение для науки и практики: 6-е рабочее совещание по программе «Плазмида». Тезисы докладов. — М., 1981. — С. 50–51.
4. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта и др.: 9-е изд. в 2 томах: Пер. с англ. под ред. акад. РАН Г.А. Заварзина. — М., 1997.
5. Roberts R.J., Vincze T., Posfai J., Macelis D. REBASE — a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes // Nucleic Acids Res. — 2010. — Vol. 38. — P. 234–236.
6. Smith H.O., Nathans D. A suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes // J. Mol. Biol. — 1973. — Vol. 81. — P. 419–423.

Список сокращений:

ДТТ — дитиотреитол;

Трис — трис (оксиметил) аминометан;

ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота;

BSA-Ас — бычий сывороточный альбумин ацетилированный;

N — нуклеотид, содержащий аденин или цитозин или гуанин или тимин.

A NEW SITE-SPECIFIC RESTRICTION ENDONUCLEASE BpuN4I RECOGNIZES AND CLEAVES DNA SEQUENCE 5'-G[^]GNNCC-3'

V.A. CHERNUKHIN, N.A. MIKHENKOVA, E.N. LOMAKOVSKAYA,
N.M. SHINKARENKO, V.S. DEDKOV, S.Kh. DEGTYAREV

SibEnzyme Ltd, Novosibirsk

A new restriction endonuclease BpuN4I from *Bacillus pumilus* N4 has been isolated. The substrate specificity and cleavage position of BpuN4I have been studied. BpuN4I recognizes and cleaves DNA sequence 5'-G[^]GNNCC-3' as indicated by arrow. BpuN4I is a first restriction enzyme which cleaves a recognition site GGNNCC-3' producing the four base pairs 5'-sticky ends. BpuN4I is a neoschizomer of NlaIV which cleaves the same recognition site producing blunt ends.

Keywords: restriction endonuclease, neoschizomer.

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЖИРА ПИЩЕВОГО ИЗ ГОЛОВ ЛОСОСЕВЫХ РЫБ ФЕРМЕНТАТИВНЫМ СПОСОБОМ

А.Г. АРТЕМОВА*

ФГУП ВНИРО, Москва

Мониторинг состояния питания населения России указывает на постоянно растущий дефицит рыбных жиров, и, как следствие, наблюдается существенное снижение показателей здоровья детского и взрослого населения. При этом в последнее время возросла потребность в пищевом жире с высокой биологической ценностью, полученном с использованием щадящих температурных режимов. Решить данную проблему возможно, используя биотехнологические приемы модификации биологического материала. В работе обоснована возможность получения ферментативным способом из отходов переработки лососевых рыб пищевого жира, что позволит обеспечить население уникальными по составу рыбными жирами, а также повысить рентабельность рыбоперерабатывающих предприятий Дальнего Востока.

Ключевые слова: морская биотехнология, пищевой рыбный жир, лососевые рыбы, отходы от разделки, ферментативный гидролиз.

Введение

Водные биологические ресурсы имеют большое значение в решении проблемы снабжения населения продуктами с повышенной пищевой и биологической ценностью, заданными свойствами, в частности, пищевыми рыбными жирами, предназначенными для профилактики и лечения наиболее распространенных заболеваний, таких как сердечно-сосудистые, гипертония, сахарный диабет и др. [2, 7, 16].

Важнейшей отличительной особенностью жиров рыб от жиров животного и растительного происхождения является наличие в их составе высоконенасыщенных жирных кислот (с 4–6 двойными связями) и полиненасыщенных жирных кислот омега-3 (эйкозапентаеновая и докозагексаеновая кислоты), что обуславливает их высокую биологическую ценность [2, 8, 9]. Присутствующие в жире рыб линолевая, линоленовая и арахидоновая кислоты являются очень важными, физиологически необходимыми веществами, называемыми витамином F [8, 9].

Одним из перспективных видов сырья для получения пищевого жира являются отходы от разделки лососевых рыб (горбуша, кета, нерка, кижуч) на рыбоперерабатывающих предприятиях, что объясняется рядом объективных причин.

Во-первых, лососевые рыбы имеют огромное промысловое значение для Российской Федерации. В таблице 1 представлены объемы фактического изъятия основных промысловых лососевых рыб за период с 2004 по 2011 гг.

Таблица 1

Объем возможного вылова (ВВ) вылова дальневосточных лососевых рыб в Российской Федерации за 2004–2011 гг., тыс. т*

Наименование объекта	Год вылова							
	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Горбуша	114,8	202,3	202,6	263,4	164,1	426,5	199,8	389,4
Кета	24,8	28,8	52,3	55,9	62,8	90,7	90,9	75,6
Нерка	20,5	23,6	30,4	34,7	32,4	30,5	36,2	33,6
Кижуч	2,3	1,1	1,7	3,9	3,8	3,9	5,1	5,3
Всего	162,4	255,8	287,0	387,9	263,1	551,6	332,0	503,9

Примечание: * взято из материалов [3, 11–14]

© 2013 г. Артемова А.Г.

* **Автор для переписки:**

Артемова Анна Георгиевна

научный сотрудник лаборатории кормовых продуктов и БАВ

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

Тел.: +7 (499) 264-90-76

E-mail: bav@vniro.ru

Объем ВВ дальневосточных лососевых рыб (горбуши, кеты, нерки и кижуча) за последние семь лет вырос с 162,4 тыс. т в 2004 году до чуть более 500 тыс. т в 2011 году. Необходимо отметить, что установленный ВВ для лососевых рыб осваивается практически на 100%. К примеру, в 2011 году ВВ для лососевых прогнозировался на уровне 403,0 тыс. т, а фактически было выловлено 504,7 тыс. т, что составляет 125,2% от прогноза.

Во-вторых, лососевые рыбы являются лучшим по своим качествам сырьем для технологической обработки с высоким выходом пригодной в пищу части. Согласно нормам отходов, потерь, выхода готовой продукции по Дальневосточному рыбохозяйственному бассейну при обезглавливании лососевых рыб, отходы костно-хрящевой ткани (головы, в том числе жабры) составляют 9,2–23,0%; при потрошении внутренности составляют 9,5–18,1%, при изготовлении филе с кожей объем образующихся отходов достигает 62,9%, а для филе без кожи – 72,0% [17].

Однако основную долю товарно-пищевой продукции, выпускаемой предприятиями Дальнего Востока, составляет продукция с малой степенью обработки, то есть с малой добавленной стоимостью – рыба мороженая и охлажденная. Соответственно на предприятиях при промпереработке в основном образуются такие отходы, как головы и внутренности лососевых рыб, которые при полной загруженности производства измельчают и сбрасывают в море. Одним из путей решения существующих проблем комплексного рационального использования лососевых видов рыб на предприятиях Дальнего Востока, а также обеспечения населения уникальными по составу рыбными жирами, является разработка технологии получения жира пищевого из отходов лососевых рыб.

В-третьих, лососевый жир не только богат омега-3 и омега-6 жирными кислотами, но и характеризуется высоким содержанием пигментов (например, астаксантин, эфиры лютеина), придающих ему оранжево-красную окраску. Поэтому он может быть использован, в частности, в пищевых и в фармацевтических целях [19]. В настоящее время зарубежные компании активно рассматривают новые проекты выработки из высококачественных свежих отходов от переработки лососевых рыб других высокоценных продуктов [19].

Так, в Норвегии более 15 лет назад была образована компания Maritex по утилизации отходов рыбноводных хозяйств по производству товарного лосося. Раньше лосось экспортировали в неразделанном виде, но в свете новых требований Европейского союза лосось должен поступать на экспорт только потрошеным. Это привело

к резкому увеличению объема рыбных отходов. Одним из первых продуктов, выработанных из внутренностей лососевых рыб, был рыбий жир с высоким содержанием омега-3 ПНЖК, который был рекомендован к использованию в качестве добавки к функциональным пищевым продуктам. Производство этого жира, в свою очередь, сопровождалось образованием отходов в виде сырой белковой массы, которую можно использовать для приготовления креветочного корма. Кроме этого, из отходов от разделки рыбы получают пищевые добавки, подобные жиру с высоким содержанием ПНЖК омега-3. Их вносят в сливочное масло, молоко или хлеб, а также выпускают в капсулах для приема в профилактических целях [20].

В Исландии фирма Tjordlaks открыла завод по получению рыбьего жира из внутренностей и голов рыб. Производительность завода по сырью составляет 11 тыс. т в год, а по готовой продукции – 2,5 тыс. т. Завод располагается рядом с портом и получает на переработку только свежее сырье, что обеспечивает высокое качество готового продукта [21].

Фирма Pacific Star (Чили) давно проявляла интерес к проблеме утилизации отходов переработки лосося. Компанией были построены три рыбомучных завода с производительностью до 25 т/ч в разных районах страны. Уже в 2001 году только на заводе в Castro было обработано около 40,6 тыс. т отходов лосося, в результате чего получено 13 тыс. т готовой продукции в виде 7600 т лососевого жира и 5400 т рыбной муки. Поскольку отходы (внутренности, кожа) отличались высокой жирностью, масса выработанного жира была больше, чем масса рыбной муки. Продолжительность процесса переработки отходов с получением рыбной муки и жира не превышает 3 ч. Процесс непрерывный, хотя сырье поступает порциями, каждая из которых в начале процесса анализируется в лаборатории. Это позволяет оптимизировать условия обработки сырья. Весь процесс находится под компьютерным контролем. После прохождения через детектор металлов сырье нагревают в течение 1 ч при температуре около 105 °С, обеспечивающей проваривание массы и микробиологическую чистоту. Затем разваренную массу прессуют, чтобы отделить жидкую часть, направляемую на производство ценного лососевого жира. Оставшуюся твердую часть высушивают и измельчают, получая высококачественную лососевую муку. На заводах Pacific Star используют аппараты непрямого сушки, что дает возможность получить качественную муку, в частности, с высокими показателями перевариваемости [19]. Таким

образом, в Чили лососевый жир находит применение в производстве маргарина, а мука — в основном в изготовлении кормов для животных.

О возрастающем интересе к переработке рыбных отходов в России, в частности на Дальнем Востоке, свидетельствует следующее: в 2012 г. на реке Хайлюля Камчатского края заработал новый комплекс по переработке рыбных отходов. Из голов и внутренностей лососевых рыб начали выпускать рыбную муку высокого качества и пищевой рыбий жир, соответствующие требованиям ГОСТ на кормовую и пищевую продукцию.

Исходным сырьем для получения жировой продукции является жир-сырец, который получают различными способами, основанными на выделении жира из жировой ткани путем разрушения структуры жировых клеток и освобождения частичек жира от их связи с белками [4, 15].

При этом в последнее время возросла потребность в пищевом жире с высокой биологической ценностью, полученного с использованием щадящих температурных режимов, поскольку, вследствие высокой чувствительности липидов рыбного жира к окислению, нагревание жиросодержащего сырья при контакте с воздухом приводит к запуску механизма образования перекисных соединений, имеющих высокую токсичность [18]. Поэтому получение жира при пониженной температуре является актуальной задачей, решить которую возможно, используя биотехнологические приемы модификации биологического материала.

При выделении жира из биологического материала одним из главных этапов является разрушение его клеточной структуры, которое можно осуществить не только высокотемпературным нагревом, но и другими способами. Поскольку основным структурным элементом голов и внутренностей лососевых рыб является белок, то для обработки в целях получения жира можно применять протеолитические ферментные препараты. Это дает возможность обеспечить использование мягких температурных режимов и, вследствие этого, минимальную степень окисления получающегося продукта, а также более полное извлечение жирорастворимых компонентов из нативных липопротеидных комплексов [6].

Целью работы является обоснование возможности получения ферментативным способом из отходов переработки лососевых рыб дополнительной продукции, в частности, пищевого жира, что позволит повысить рентабельность рыбоперерабатывающих предприятий Дальнего Востока, а также снизит антропогенную нагрузку на окружающую среду.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись отходы от разделки лососевых рыб горбуши (*Oncorhynchus gorbuscha*) и кеты (*Oncorhynchus keta*) — головы, внутренности и жир из голов горбуши и кеты, полученный ферментативным способом.

Вылов лососевых рыб и их последующая разделка производились в августе 2012 года. Отходы от разделки лососевых рыб хранили в холодильной камере при температуре минус 18 °С в течение 3 мес.

В отечественной рыбной промышленности ферментативный (биотехнологический) способ разрушения жиросодержащих тканей нашел применение в технологиях, предусматривающих выделение жира из сырья и дальнейшее изготовление кормовой рыбной муки из обезжиренного жома [4, 8, 15].

В настоящей работе для разрушения жиросодержащих тканей измельченных голов лососевых рыб был использован ферментный препарат Махазyme NNP DS, разрешенный для использования в пищевой промышленности. Указанный препарат содержит нейтральную протеазу, полученную из бактерий рода *Bacillus subtilis*.

Эксперимент по выделению жира из голов лососевых рыб (горбуши и кеты) ферментативным способом проводили следующим образом. Замороженные головы горбуши и кеты перед обработкой размораживали на воздухе при температуре не выше 20 °С. Сырье измельчали на волчке до размера кусочков не более 3 мм. Ферментативный гидролиз голов лососевых рыб проводили при следующих рациональных параметрах: гидромодуль 1:1; количество вносимого ферментного препарата 0,2% к общей массе сырья и воды; продолжительность процесса ферментализации 60 мин.; температура 46–48 °С; рН 6,4–6,8.

По окончании процесса полученную смесь направляли на горизонтально-осадительную центрифугу для отделения жира и избыточной влаги. Центрифугирование проводили при скорости вращения вала центрифуги 3000 об./мин. в течение 15 мин.

Полученный после центрифугирования жиросодержащий бульон направляли на сепаратор для отделения жира — полуфабриката для пищевых и/или технических целей [1, 5].

При рациональных параметрах процесса ферментализации голов горбуши и кеты и последующего центрифугирования выход жира составляет 70,0%.

Технологическая схема производства жира пищевого из голов лососевых рыб представлена на рисунке 1.

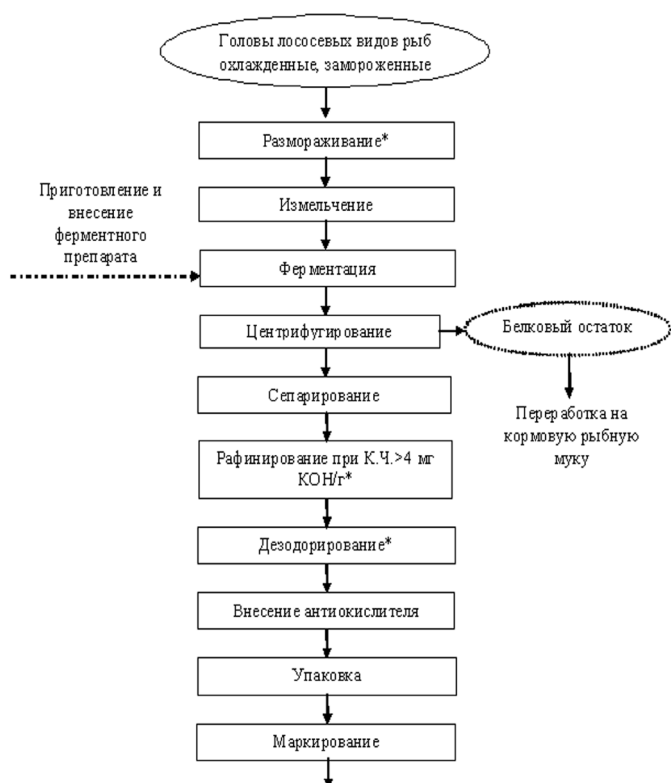


Рис. 1. Технологическая схема получения жира пищевого из голов лососевых рыб ферментативным способом.
Примечание: * при необходимости

Результаты и обсуждение

Были проведены исследования общего химического состава образцов сырья (головы и внутренности лососевых рыб). Полученные данные представлены в таблице 2.

Таблица 2
Общий химический состав голов и внутренностей лососевых рыб

Наименование образца	Содержание, %			
	влаги	белка	жира	зола
Головы горбуши	67,3±0,2	14,1±0,3	15,3±0,1	3,3±0,3
Головы кеты	68,4±0,1	15,2±0,3	13,3±0,2	3,1±0,2
Внутренности горбуши и кеты	77,2±0,2	17,1±0,2	4,3±0,1	1,4±0,3

Головы лососевых рыб (горбуши и кеты) характеризуются высоким содержанием белка (14,1–15,2%) и минеральных веществ (3,1–3,3%). По содержанию липидов головы относятся к высокожирному сырью с

содержанием жира до 15,3%: следовательно, существует возможность использования их в качестве сырья для получения пищевого рыбного жира [1, 15]. Обезжиренный жом может являться дополнительным белковым компонентом при получении рыбной кормовой муки.

Во внутренностях лососевых рыб отмечается высокое содержание белка (до 17,1%) и влаги (77,2%) и низкое содержание жира (4,3%), поэтому данное сырье рекомендуется направлять на получение кормовой рыбной муки без предварительных операций по обезжириванию [1, 5].

В жире, полученном из голов горбуши и кеты ферментативным способом, были определены органолептические показатели, представленные в таблице 3.

Таблица 3
Органолептические показатели жира пищевого из голов лососевых рыб, полученного ферментативным способом

Наименование показателя	Характеристика показателя и его значение
Внешний вид продукта	Однородная маслянистая жидкость
Запах, вкус продукта	Свойственный жирам лососевых рыб, без прогорклости
Цвет продукта	Оранжевый
Прозрачность при 20 °С	Прозрачный

Далее были проведены исследования показателей качества и безопасности полученного жира: кислотное число составляет 8,0–8,1 мг КОН/г, перекисное число – 3,3–3,8 ммоль O₂/кг. Поскольку величина кислотного числа жира, полученного ферментативным способом, превышает 4,0 мг КОН/г, то есть не соответствует «Единым санитарно-эпидемиологическим и гигиеническим требованиям к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю)», его необходимо подвергать рафинированию, которое включает в себя нейтрализацию щелочью (едкий натр или едкое кали), промывку и сепарирование жира.

По величине перекисного числа жир из голов лососевых рыб соответствует «Единым санитарно-эпидемиологическим и гигиеническим требованиям...» (10,0 ммоль O₂/кг).

С целью определения пищевой ценности жира из голов горбуши и кеты был изучен его фракционный состав (табл. 4).

Таблица 4

Фракционный состав липидов из голов лососевых рыб, % от суммы фракций*

Наименование фракции	Липиды голов кеты	Жир, полученный ферментативным способом		Липиды мышечной ткани горбуши
		из голов кеты	из голов горбуши	
Триглицериды	59,4	68,0	71,4	29,5–49,8
Диглицериды	8,8	7,6	8,6	3,8–5,1
Моноглицериды	2,8	1,5	1,5	1,8–3,4
Стерины	2,2	3,2	3,5	2,7–4,9
Эфиры стерин	–	–	–	0,5–1,0
Фосфолипиды	1,4	1,1	1,0	1,1–4,2
СЖК	17,7	17,0	10,8	34,2–46,4

Примечание: * данные предоставлены Т.Е. Рубцовой, вед.н.с. лаборатории аналитического и нормативного обеспечения качества и безопасности ФГУП «ВНИРО», 2012 г.

Согласно полученным данным, ферментативный способ выделения жира из голов лососевых видов рыб не приводит к значительным изменениям фракционного состава липидов. Жир из голов кеты и горбуши, так же, как и жиры большинства морских организмов, в основном представлен триглицеридами, которые составляют 68,0–71,4% от суммы фракций [7, 8, 9]. В липидах голов кеты (исходные данные) содержание триглицеридов составляет 59,4%, в то время как в мышечной ткани горбуши их содержание находится на уровне 29,5–49,8%. Биологической ролью триглицеридов является накопление и «хранение» энергии, выделяющейся в процессе их распада. Они важны для организма и являются запасными веществами [7, 8, 9, 15]. Необходимо также отметить в жире из голов лососевых рыб низкое содержание фосфолипидов (1,0–1,1%) и довольно высокое содержание свободных жирных кислот (СЖК) (10,8–17,0%), что объясняется протеканием гидролитических процессов при хранении и подтверждается высокими значениями кислотного числа липидов [9, 10]. Так, в липидах мышечной ткани горбуши содержание фосфолипидов составляет 1,1–4,2%, а СЖК – колеблется от 34,2 до 46,4%. Кроме того, в жире из голов лососевых видов рыб присутствуют диглицериды – до 8,6%, стерины – до 3,5%, моноглицериды – до 1,5%.

С целью определения биологической ценности жира из голов лососевых рыб был изучен его жирнокислотный состав (табл. 5).

Состав и количественное содержание жирных кислот жира из голов лососевых рыб весьма разнообразны. Анализируя данные таблицы 5, можно видеть, что в составе жирных кислот жира из голов горбуши и кеты в значительных количествах присутствуют (% от суммы кислот): миристиновая (14:0) – 4,0 ÷ 6,8; пальмитиновая (16:0) – 12,2 ÷ 13,6; пальмитолеиновая (16:1) – 6,1 ÷ 8,6; олеиновая (18:1) – 15,6; эйкозаеновая (20:1) – 6,9 ÷ 10,1; эйкозапентаеновая (20:5) – 22,4 ÷ 26,1; докозагексаеновая (22:6) – 10,7 ÷ 11,5. Необходимо отметить, что содержание эйкозапентаеновой омега-3 жирной кислоты в жире из голов более чем в 2,7 раза превышает ее содержание в жире мышечной ткани кеты и горбуши.

Биологическая ценность жира из голов горбуши и кеты определяется наличием в них биологически активных жирных кислот: ПНЖК омега-3, в том числе биологически активных эйкозапентаеновой и докозагексаеновой, пальмитолеиновой кислот и витамина F (линолевая, линоленовая и арахидоновая кислоты) [7–10]. Следует отметить повышенное содержание суммы ПНЖК, которая колеблется от 44,6 до 47,4% от общей суммы кислот, причем на сумму ПНЖК омега-3 приходится до 44,2%, в том числе биологически активных ПНЖК омега-3 (эйкозапентаеновая и докозагексаеновая) от 33,9 до 36,8%. Как уже было отмечено выше, в жире из голов горбуши и кеты содержится от 6,1 до 8,6 пальмитолеиновой кислоты – источника омега-7, которая является «показателем подлинности» рыбного жира и обладает противомикробными и антиоксидантными свойствами, способствует восстановлению и регенерации клеток кожи [7, 8].

В жире из голов горбуши и кеты определено невысокое содержание эссенциальных жирных кислот – витамина F, которое варьирует от 3,8 до 4,1% от суммы кислот. Однако количество витамина F в жире из голов превышает его содержание в жире мышечной ткани горбуши и кеты в 1,6 раза.

Сумма насыщенных жирных кислот в жире из голов горбуши и кеты находится на уровне 20,3 ÷ 23,7% от общей суммы кислот; мононенасыщенных жирных кислот – на уровне 31,7 ÷ 32,2%.

Наряду с изучением показателей качества, пищевой и биологической ценности жира из голов лососевых видов рыб актуален вопрос определения показателей безопасности. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 6.

Таблица 5

**Жирнокислотный состав жира из голов лососевых рыб в сравнении с липидами мышечной ткани
(% от суммы кислот)**

Жирная кислота	Код	Жир, полученный ферментативным способом		Жир из мышечной ткани горбуши*	Жир из мышечной ткани горбуши**		Жир из мышечной ткани кеты**	
		из голов горбуши	из голов кеты		Неполо-возр.	I–II ст. зрел.	Неполо-возр.	I–II ст. зрел.
Миристиновая	14:0	4,0	6,8	5,0	2,9	2,8	5,4	5,2
Миристолеиновая	14:1	0,4	0,6	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2
Пентадекановая	15:0	0,4	0,5	0,6	0,4	0,3	0,5	0,4
Пальмитиновая	16:0	12,2	13,6	20,6	12,2	13,8	16,1	13,4
Пальмитолеиновая	16:1 ω_7	6,1	8,6	6,9	3,9	4,2	5,5	5,9
Маргариновые, Σ	17:0:1	1,7	1,3	0,3	0,3	0,3	-	0,2
Стеариновая	18:0	2,0	1,5	2,6	2,3	2,4	3,3	3,5
Олеиновая	18:1 ω_9	15,6	15,6	19,0	7,7	10,0	14,9	20,2
Линолевая	18:2 ω_6	1,9	1,9	1,4	1,1	1,0	1,2	1,0
α -Линоленовая	18:3 ω_3	1,3	1,9	0,9	0,6	0,5	0,7	0,5
Стеаридоновая	18:4 ω_3	2,2	3,5	2,0	2,0	1,0	1,3	0,7
Эйкозаеновая	20:1 ω_9	10,1	6,9	10,7	6,7	7,5	3,3	7,7
Эйкозациеновая	20:2	0,3	0,3	0,3	0,5	0,6	0,3	0,3
Арахидоновая	20:4 ω_6	0,6	0,3	0,8	1,0	0,7	1,2	0,7
Эйкозапентаеновая	20:5 ω_3	26,1	22,4	5,2	9,5	8,2	8,3	7,2
Докозатриеновая	22:3	0,4	0,5	0,1	—	—	0,2	0,2
Докозапентаеновая	22:5 ω_3	3,9	2,3	0,8	2,1	1,9	2,7	2,6
Докозагексаеновая	22:6 ω_3	10,7	11,5	7,5	19,8	17,8	14,2	12,7
Σ НЖК		20,3	23,7	29,6	18,1	19,6	25,3	22,7
Σ МНЖК		32,2	31,7	49,3	18,4	21,8	23,9	34,0
Σ ПНЖК		47,4	44,6	21,0	36,6	31,7	30,1	25,9
Σ ПНЖК ω_3		44,2	41,6	16,4	34,0	29,4	27,2	23,7
Σ ПНЖК 20:5 ω_3 , 22:6 ω_3		36,8	33,9	12,7	29,3	26,0	22,5	19,9

Примечание: *данные предоставлены Т.Е. Рубцовой, вед. н.с. лаборатории аналитического и нормативного обеспечения качества и безопасности ФГУП «ВНИРО», 2012 г.; ** данные взяты из [10]

Данные показателей безопасности жира из голов лососевых рыб

Наименование определяемого показателя	«Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю)»	Фактическое содержание в жире, полученном ферментативным способом*	
		из голов кеты	из голов горбуши
Токсичные элементы, мг/кг, не более	Кадмий	0,2	0,03
	Свинец	1,0	0,04
	Мышьяк	1,0	0,07
	Ртуть	0,3	0,06
Токсичные соединения, мг/кг, не более	ГХЦГ	0,1	0,05
	ДДТ и метаболиты	0,2	0,07
	ПХБ	3,0	0,03

Примечание: * данные предоставлены А.В. Козиним, ст.н.с. лаборатории аналитического и нормативного обеспечения качества и безопасности ФГУП «ВНИРО», 2012 г.

Фактическое содержание контролируемых показателей безопасности (токсичных элементов и соединений) в жире из голов лососевых рыб полностью соответствует «Единым санитарно-эпидемиологическим и гигиеническим требованиям к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю)».

Заключение

Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют сделать вывод о том, что жир из голов лососевых рыб, полученный ферментативным способом, обладает хорошим качеством, высокой биологической ценностью и безопасен в пищевом отношении. Жир из голов лососевых рыб богат эссенциальными жирными кислотами — до 4,1%, мононенасыщенной пальмитолеиновой жирной кислотой омега-7 — до 8,6%, полиненасыщенной биологически активной эйкозапентаеновой жирной кислотой омега-3 — до 26,1% и полиненасыщенными жирными кислотами омега-3 — до 44,2%, что делает эти жиры уникальными по жирнокислотному составу. Поэтому они могут быть рекомендованы как самостоятельный продукт и как сырье для получения лечебно-профилактических продуктов или БАД к пище гипохолестеринемического, общеукрепляющего и иммуномодулирующего действия.

Литература

- Боева Н.П., Бредихина О.В., Бочкарев А.И. Технология рыбы и рыбных продуктов. Кормовые и технические продукты из водных биологических ресурсов. — М.: ВНИРО. — 2008. — 118 с.
- Боева Н.П., Ржавская Ф.М., Балова О.А. Разработка новых медицинских, лечебно-профилактических препаратов и продуктов на основе рыбных жиров / Технология переработки гидробионтов. Международная конференция. — М., 1994. — С. 113–114.
- Глубоковский М.К., Тарасюк С.Н. Сырьевая база российского рыболовства в 2011 году (районы российской юрисдикции): Справочно-аналитические материалы. — М.: ВНИРО, 2011. — 497 с.
- Зайцев В.П., Кизеветтер В.И., Лагунов Л.Л. и др. Технология рыбных продуктов. — М.: Издательство «Пищевая промышленность», 1965. — С. 530–587.
- Исаев В.А. Кормовая рыбная мука. — М.: Агропромиздат, 1985. — 193 с.
- Кузнецов Ю.Н. Ферментативные технологии для получения кормовой муки и жира из рыбного сырья / Мат-лы конф. «Приморье край рыбацкий». — Владивосток, 2002. — С. 112–116.
- Левачев М.М. Жиры рыб в диетотерапии ГЛП и гипертонии. — М.: Медицина, 1988. — 84 с.
- Петрова М.С. «Обоснование и разработка технологии биологически активной добавки к пище «Лецитин в тю-

- леньем жире». Автореферат дисс. канд. техн. наук. — М.: ВНИРО, 2009. — 25 с.
9. Ржавская Ф.М. Жиры рыб и морских млекопитающих. — М.: Пищевая промышленность, 1976. — 472 с.
 10. Ромашина Н.А., Слуцкая Т.Н., Холоша О.А. Исследование липидов мышечной ткани тихоокеанских лососей в период нерестовой миграции // Известия ТИНРО. Владивосток: ТИНРО, 1997. — С. 184–187.
 11. Статистические сведения по рыбной промышленности России 2004–2005 гг. — М.: ВНИРО, 2006.
 12. Статистические сведения по рыбной промышленности России 2006–2007 гг. — М.: ВНИРО, 2008.
 13. Статистические сведения по рыбной промышленности России 2008–2009 гг. — М.: ВНИРО, 2010.
 14. Статистические сведения по рыбной промышленности России 2009–2010 гг. — М.: ВНИРО, 2011.
 15. Технология рыбы и рыбных продуктов. Под ред. проф. Ершова А.М. — СПб.: ГИОРД, 2006. — 720 с.
 16. Тутельян В.А., Суханов Б.П., Австриевский А.Н., Поздняковский В.М. Биологически активные добавки в питании человека (оценка качества и безопасности, эффективность, характеристика, применение в профилактической и клинической медицине. — Томск: Изд. НТЛ, 1999. — 296 с.
 17. Харенко Е.Н. и др. Единые нормы выхода продуктов переработки водных биологических ресурсов и объектов аквакультуры. Технологическое нормирование. Выпуск 6. — М.: ВНИРО, 2012. — 222 с.
 18. Эммануэль Н.М., Лясковская Ю.Н. Торможение процессов окисления жиров. — М.: Пищепромиздат, 1961. — 359 с.
 19. Fish meal and fish oil from salmon waste // Eurofish Mag. — 2002. — No. 5. — P. 42–43.
 20. Hempel E. There is good in marine waste // Seafood Intern. — 2001. — No. 5. — P. 32–33.
 21. Oil extractor for Iceland // World Fish. — 1999 Dec. — P. 13.

TECHNOLOGY FOR ENZYMATICALLY PRODUCING EDIBLE FAT FROM THE HEADS OF SALMON

A.G. ARTEMOVA

VNIRO, Moscow

Monitoring the nutritional status of the population of Russia points to the growing shortage of fish oils, and as a result, there has been a significant decline in the health of children and adults. In the recent increased demand for edible fat of high biological value obtained using gentle temperature conditions. To solve this problem perhaps it is necessary to use biotechnological methods of modification of the biological material. The paper demonstrated the possibility of obtaining an enzymatic method of waste processing salmon for dietary fat, which will provide the population with unique composition of fish fat, and increase the profitability of fish processing companies in the Far East.

Keywords: marine biotechnology, food fish oil, salmon fish, waste from butchering, enzymatic hydrolysis.

РАСТИТЕЛЬНО-МИКРОБНЫЕ НУТРИЕНТЫ. СООБЩЕНИЕ 2: ДРОЖЖЕВАЯ БИОКОНВЕРСИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

ЧАН ВАН ТИ, Л.А. ГУЛИМОВА, НГУЕН ЧЫОНГ ЗАНГ, К.В. ГОРИН, Е.Г. БОРИСЕНКО*

ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет пищевых производств»
Министерства образования и науки Российской Федерации, Москва

Представлена вторая часть комплексной работы, состоящей из трех частей (сообщений). Показано, что отселекционированные из женского грудного молока дрожжи рода *Pichia* активно накапливают биомассу на различных твердых растительных субстратах. Основные закономерности этой ферментации исследованы на примере автолизатов зерна и их комплексов с измельченными растительными остатками. Отмечены преимущества твердофазной ферментации (ТФФ) по сравнению с глубинным культивированием дрожжей на зерновых средах. Выявлена динамика химического состава в процессе ферментации сырья на примере зерновых отрубей. Обсуждена возможная роль получаемых продуктов в решении проблемы дефицита белка и регулировании микробиоценозов желудочно-кишечного тракта.

Ключевые слова: дрожжи, зерновое сырье, глубинное культивирование, твердофазная ферментация, нутрицевтики, пребиотики.

Введение

В биотехнологической промышленности Советского Союза крупнотоннажное производство микробных нутриентов развивалось в основном по пути производства дрожжевых кормовых препаратов методом глубинного культивирования микроорганизмов на гидролизатах целлюлозосодержащего растительного сырья на базе гидролизных заводов страны [7, 9] и на жидких парафинах нефти (восемь комбинатов БВК) [5, 10]. В связи с разрушением промышленного животноводства продукция всех этих предприятий оказалась невостребованной, производственная деятельность их прекратилась, некоторые из них разрушены до основания. Реанимация производства микробной биомассы в современных условиях методом глубинного культивирования мало реальна из-за высокой материалоемкости, энергоемкости прежних производств, а также из-за потери их кадрового состава. Однако это

относительно не значит, что микробная масса как нутриент полностью утратила свою биологическую ценность; в новых условиях возникли новые продуценты микробной биомассы, новые источники сырья, более рациональные способы культивирования. В последние годы в работах кафедры биотехнологии Московского государственного университета пищевых производств (МГУПП) сформировались общие принципы нового производства микробных нутриентов на базе растительного сырья (легкоферментируемого сахаристого и трудноферментируемого целлюлозосодержащего) [1–4, 6]. В работе мы попытались проанализировать, как может быть рационально использована дрожжевая биоконверсия растительной биомассы на примере зернового сырья. При этом в своем исследовании мы будем преемственно исходить из результатов, изложенных в предыдущем сообщении 1 общей публикации в настоящем журнале [8].

Материалы и методы

Для биоконверсии биомассы зерновых культур использовали высокопродуктивную культуру дрожжей *Pichia anomala* 9a, выделенную из женского грудного молока на кафедре биотехнологии МГУПП и способную активно накапливать биомассу на негидролизованном твердом растительном сырье [3].

Накопление дрожжевой биомассы проводили на дробленом зерне различных видов зерновых культур, зерновых гидролизатах, пророщенном зерне и зерновых

© 2013 г. Чан Ван Ти, Гулимова Л.А., Нгуен Чыонг Занг, Горин К.В., Борисенко Е.Г.

* **Автор для переписки:**

Борисенко Евгений Георгиевич,

д.т.н., профессор

ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет
пищевых производств»

125080 Москва, Волоколамское ш., 11

Тел.: +7 (916) 810-19-07

E-mail: biotech@mgpp.ru

автолизатах, зерновых отрубях, мучках, измельченных растительных отходах.

Контроль за накоплением дрожжевой биомассы вели аналогично сообщению 1 общей публикации [8]. Так как исследуемые растительные питательные субстраты обычно были комплексными и твердыми, при оценке интенсивности роста дрожжей использовали показатели число клеток/ед. массы комплексного субстрата и число клеток/ед. массы более ценного легкоферментируемого сахаристого продукта, что позволяет демонстративно оценить эффективность биоконверсии более ценного субстрата, например, зернового, при разных способах культивирования микроорганизмов.

Глубинное культивирование проводили при 30 ± 2 °С в колбах на качалке при 220 об./мин., а твердофазное культивирование — в стационарном режиме в тех же качалочных колбах при высоте твердого ферментируемого субстрата до 5 см.

Результаты и обсуждение

Если говорить о крупнотоннажном производстве дрожжевой биомассы методом твердофазной ферментации, то для этих целей одних отрубей недостаточно в силу того, что они сами по себе являются высокоценным кормовым продуктом и хорошей добавкой к пище, прежде всего, к хлебобулочным изделиям. Для этих целей нужно иметь множество различных субстратов вторичных и первичных, и в агропромышленном комплексе России они имеются. Одним из таких субстратов является сенная

мука из дикорастущих и сеяных трав, количество которой может достигать сотен миллионов тонн, если учесть те огромные нераспаханные площади в стране, на которых травы вообще никогда не косились, и практически половину пахотных земель, которые заросли травами и нередко мелколесьем за последние 20 лет. Конечно, организация заготовки и переработки такого нетрадиционного для биотехнологии сырья представляет достаточно большие трудности, поэтому методом выбора является биоконверсия более привычных видов растительного сырья, в первую очередь, зернового происхождения. В таблице 1 представлено накопление дрожжей на таких субстратах.

Из таблицы 1 видно, что, действительно, различные продукты зернового происхождения могут быть использованы при дрожжевой биоконверсии методом ТФФ, причем одни более, другие менее продуктивны, чем сенная мука, но во всяком случае все они пригодны для этого процесса. В указанной таблице также достаточно четко видно влияние проращивания на продуктивность дрожжей использованных видов зерна, что свидетельствует о большей доступности полисахаридов зерна после процесса проращивания.

Что касается сенной муки и целлюлозосодержащих вторичных продуктов зерновых культур, то эти субстраты не только могут сами с разной эффективностью использоваться для наращивания дрожжевой биомассы, но и способны заметно и в то же время также различно стимулировать использование дрожжами легкоферментируемых сахаристых субстратов (табл. 2).

Таблица 1

Продуктивность дрожжей *Pichia anomala* 9a на различных субстратах методом ТФФ (посевная доза 3×10^8 кл/г)

№ п/п	Питательная среда	Продуктивность дрожжей, $n \times 10^9$ кл/г продукта		
		после 24 ч	после 48 ч	после 72 ч
1	Сенная мука	3,0	5,0	5,2
2	Пшеничные отруби	2,5	5,5	5,7
3	Рисовая мучка	3,6	10,5	9,8
4	Солома риса	1,5	1,8	1,85
5	Стебли кукурузы	2,5	3,5	3,7
6	Крупа кукурузы	2,0	2,3	2,2
7	Рис дробленый	2,0	3,3	2,7
8	Пшеница измельченная	3,9	5,0	5,1
9	Пророщенная пшеница	3,6	7,1	6,8
10	Пророщенный рис	3,2	5,1	4,3
11	Пророщенная кукуруза	2,2	5,0	4,6

Рост дрожжей *Pichia anomala* 9a на комплексных целлюлозно-сахаристых твердофазных средах

№ п/п	Состав питательной среды (влажность – 55%)		Продуктивность комплексной среды, $n \times 10^9$ кл/г			Продуктивность сахаристого компонента, $n \times 10^{10}$ кл/г		
			после 24 ч	после 48 ч	после 72 ч	после 24 ч	после 48 ч	после 72 ч
1	Раствор глюкозы (7%)	Рисовая солома	2,4	3,7	3,1	4,7	7,0	6,0
2	Раствор глюкозы (7%)	Сенная мука	4,0	6,5	6,2	7,6	12,5	11,8
3	Раствор глюкозы (7%)	Измельченные стебли кукурузы	4,7	6,7	6,0	9,0	12,8	11,5
4	Раствор глюкозы (7%)	Пшеничные отруби	3,9	6,3	6,3	7,4	12,0	12,0
5	Раствор глюкозы (7%)	Рисовая мучка	1,7	3,1	3,0	3,3	5,9	5,7
6	Раствор кукурузной патоки (7%)	Рисовая солома	2,5	3,9	3,6	9,7	7,4	6,8
7	Раствор кукурузной патоки (7%)	Сенная мука	5,2	7,6	7,3	10,0	14,5	14,0
8	Раствор кукурузной патоки (7%)	Измельченные стебли кукурузы	5,8	7,8	7,2	11,0	14,8	13,8
9	Раствор кукурузной патоки (7%)	Пшеничные отруби	5,1	7,3	7,4	9,8	14,0	14,2
10	Раствор кукурузной патоки (7%)	Рисовая мучка	1,6	1,6	1,4	3,0	3,0	2,8

Как видно из таблицы 2, наиболее активными стимуляторами роста в данном случае могут оказаться не обязательно самые продуктивные целлюлозосодержащие материалы. Очевидно, очень большую роль играет пористость целлюлозосодержащих продуктов. И здесь, естественно, возникает самый кардинальный вопрос для крупнотоннажного производства дрожжевой биомассы, если таковое в стране будет реанимировано. Какой способ культивирования дрожжей можно считать наиболее перспективным: глубинный, хорошо известный для биотехнологической промышленности СССР, или значительно менее привычный и изученный – твердофазный? По нашему мнению, сравнение этих двух вариантов довольно демонстративно можно провести по эффективности дрожжевой биоконверсии, прежде всего,

самого зерна или его производных (пророщенного зерна или автолизатов из пророщенного зерна).

В таблице 3 представлен выход дрожжей с 1 г сухого вещества трех зерновых автолизатов при глубинном культивировании, причем достаточно четко видно, что этот выход нарастает до 10%-ной концентрации сухих веществ этих автолизатов (а.с.в.). Если же этими 10%-ными автолизатами увлажнять различные целлюлозосодержащие субстраты, то продуктивность зернового компонента таких комплексных субстратов будет до трех раз более высокой, чем в глубинной культуре (таб. 4). Очень похожие результаты были получены нами на комплексных средах также и при других видах обработки измельченного зернового сырья: при ферментативном и кислотном гидролизе.

Таблица 3

**Рост дрожжей *Pichia anomala* 9a при глубинном культивировании на жидких средах
из автолизатов пророщенного зерна**

№ п/п	Кол-во зерна, %	Продуктивность дрожжей, $n \times 10^{10}$ кл/г а.с.в. зернового автолизата								
		Автолизат риса			Автолизат кукурузы			Автолизат пшеницы		
		после 24 ч	после 36 ч	после 48 ч	после 24 ч	после 36 ч	после 48 ч	после 24 ч	после 36 ч	после 48 ч
1	5	3,47	5,33	4,80	3,47	5,60	4,80	4,00	5,60	4,90
2	6	2,89	5,66	4,22	2,89	5,78	5,11	3,78	6,22	4,22
3	7	2,86	5,52	4,76	3,24	5,91	5,33	4,00	6,67	5,71
4	8	2,83	5,67	4,50	3,33	6,00	5,35	3,83	6,50	5,17
5	9	2,52	5,78	5,33	2,96	6,07	5,48	3,56	6,37	5,78
6	10	2,67	5,60	5,20	3,07	6,00	5,87	3,07	6,27	5,60
7	11	2,42	5,10	4,85	2,91	5,58	5,51	2,91	5,70	5,33
8	12	2,33	4,67	4,33	2,67	5,11	5,22	2,78	5,33	5,00
9	13	2,36	4,10	3,80	2,38	4,41	4,10	2,46	4,62	4,62
10	14	2,00	3,62	3,24	2,00	3,52	3,05	2,00	4,10	4,00

Таблица 4

**Рост дрожжей *Pichia anomala* 9a при твердофазной ферментации на автолизатах
с разными целлюлозосодержащими компонентами**

№ п/п	Состав питательной среды (влажность – 55%)		Продуктивность комплексной среды, $n \times 10^9$ кл/г			Продуктивность сахаристого компонента, $n \times 10^{10}$ кл/г		
	Легкоферментируемый субстрат	Трудноферментируемый субстрат	после 24 ч	после 48 ч	после 72 ч	после 24 ч	после 48 ч	после 72 ч
1	Кукурузный автолизат (10%)	Рисовая солома	2,4	3,1	2,9	6,1	7,88	7,37
2	Кукурузный автолизат (10%)	Сенная мука	4,9	8,2	8,0	12,46	20,85	20,34
3	Кукурузный автолизат (10%)	Измельченные стебли кукурузы	5,3	8,4	8,0	13,48	21,36	20,29
4	Кукурузный автолизат (10%)	Пшеничные отруби	5,3	5,8	6,6	13,31	14,76	16,78
5	Кукурузный автолизат (10%)	Рисовая мучка	0,5	1,6	1,1	1,27	4,07	2,8
6	Пшеничный автолизат (10%)	Рисовая солома	2,5	3,8	4,1	6,36	9,66	10,42
7	Пшеничный автолизат (10%)	Сенная мука	5,4	8,4	8,0	13,73	21,36	19,83
8	Пшеничный автолизат (10%)	Измельченные стебли кукурузы	6,1	8,6	7,8	15,5	21,86	19,91
9	Пшеничный автолизат (10%)	Пшеничные отруби	3,9	5,8	6,6	9,92	14,75	16,78
10	Пшеничный автолизат (10%)	Рисовая мучка	1,3	1,1	1,1	3,3	2,8	2,8
11	Автолизат нешелушенного риса	Рисовая солома	2,1	3,2	3,1	5,34	8,14	7,88
12	Автолизат нешелушенного риса	Сенная мука	4,9	7,4	6,9	12,46	18,81	17,54
13	Автолизат нешелушенного риса	Измельченные стебли кукурузы	5,1	7,6	7,1	12,47	19,32	18,05
14	Автолизат нешелушенного риса	Пшеничные отруби	4,2	4,7	5,2	10,68	11,95	13,22
15	Автолизат нешелушенного риса	Рисовая мучка	1,1	1,3	1,1	2,8	3,31	2,8

Интерпретируя результаты всех этих таблиц, можно отметить их общий недостаток — невозможность четко определить массовую долю микробной биомассы в комплексных растительно-дрожжевых продуктах. Выращивание культуры *Pichia anomala* 9a на агаровых средах, смыв водой и высушивание этих смывов до постоянной массы позволили установить, что в 1 г такой сухой массы содержится приблизительно 200 млрд. клеток этих весьма мелких дрожжей. Содержание белка по Кьельдалю в этой массе составляет около 40%. Методом выбора при определении ценности комплексных продуктов, получаемых в результате дрожжевой биоконверсии, является оценка их химического состава, например, содержания белка и аминокислотного состава. В таблице 5 представлена динамика этих параметров пшеничных отрубей в ходе их ферментации дрожжами. Содержание белка в конечном продукте повышается на 20–25% и, что особенно важно, на 20–30% нарастает содержание особо

ценных незаменимых аминокислот. Конечно, это не будет продукт, аналогичный БВК из парафинов нефти или гидролизным дрожжам, но надо учесть, что такая биоконверсия, увеличивающая процентов на 20 содержание белка в растительных продуктах (среднее его содержание около 10%) при биоконверсии растительной биомассы, формирующейся только в России за год (около 3 млрд. т), вполне может покрывать весь мировой дефицит белка для человека и животных (около 60 млн. т). Все это не считая того позитивного эффекта, который могут оказать такие новые продукты в организме человека, как пробиотики и пребиотики, стимулируя размножение аутохтонной микрофлоры желудочно-кишечного тракта. В таблице 6 представлено влияние дрожжей *Pichia anomala* 9a на лакто- и бифидобактерии в экспериментах *in vitro*, причем из данных этой таблицы видно, что активаторами роста бактерий являются как живые, так и инактивированные дрожжи.

Таблица 5

Содержание сырого протеина и аминокислотный состав проферментированных отрубей

Показатель	Отруби	Отрубевый дрожже-бактериальный полуфабрикат	Относительное изменение, %
Массовая доля сырого протеина, %	14,8	18,6	+25,7
Состав и содержание аминокислот, % на АСВ			
Лизин*	0,52	0,71	+36,5
Гистидин	0,47	0,56	+19,2
Аргинин	1,08	0,97	-10,2
Аспарагиновая кислота	0,92	1,16	+26,1
Треонин*	0,47	0,58	+23,4
Серин	0,59	0,73	+23,7
Глутаминовая кислота	3,28	3,90	+18,9
Пролин	0,84	1,12	+33,3
Глицин	0,75	0,85	+13,3
Аланин	0,67	0,82	+22,4
Цистин	0,30	0,31	+3,3
Валин*	0,72	0,86	+19,4
Метионин*	0,29	0,34	+17,2
Изолейцин*	0,48	0,63	+31,3
Лейцин*	0,92	1,13	+22,8
Тирозин	0,43	0,57	+32,6
Фенилаланин*	0,60	0,80	+33,3

Примечание: * — незаменимые аминокислоты

Влияние дрожжей на рост бактерий *L. acidophilus* La5

№ п/п	Исследуемый материал	КОЕ бактерий при глубинном культивировании, кл/мл			
		0 ч	24 ч	48 ч	72 ч
1	<i>P. anomala</i> (живые) на пророщенной пшенице + 7%-ный р-р сахарозы (1:5) + <i>L. acidophilus</i> La5	$2,6 \times 10^8$	$3,0 \times 10^9$	$7,0 \times 10^9$	$1,1 \times 10^{10}$
2	<i>P. anomala</i> (убитые) на пророщенной пшенице + 7%-ный р-р сахарозы (1:5) + <i>L. acidophilus</i> La5	$2,0 \times 10^8$	$2,0 \times 10^9$	$2,5 \times 10^{10}$	$3,5 \times 10^{10}$
3	Пророщенная пшеница + 7%-ный р-р сахарозы (1:5) + <i>L. acidophilus</i> La5	$2,3 \times 10^8$	$1,10 \times 10^9$	$2,0 \times 10^9$	$2,0 \times 10^9$

В предшествующих работах мы уже наблюдали положительное влияние в клинике разработанных нами растительно-дрожжевых препаратов «Фервитал» и «Фервистим», получаемых с помощью дрожжей из нормальной микрофлоры винодельческого сырья [6], и считаем, что новые более активные дрожжевые культуры, выделенные из такого физиологичного пищевого продукта, как молоко и особенно женское грудное молоко, должны продолжить эту практику.

Заключение

Таким образом, сформировано представление о возможной реанимации крупнотоннажного производства дрожжевой биомассы на растительном сырье. В качестве продуцентов такой биомассы в этом случае могут служить дрожжи, выделенные из молока млекопитающих и человека; исходным сырьем для накопления биомассы будут комплексные продукты из легко- и трудноферментируемых растительных продуктов, причем наиболее рациональным способом при такой биоконверсии растительного сырья будет твердофазная ферментация. Новые комплексные растительно-микробные продукты способны в значительной степени снизить или даже ликвидировать мировой дефицит белка в рационах животных и человека, а также активировать микробиоценозы их желудочно-кишечного тракта.

Литература

1. Горин К.В. Разработка технологии микробных нутриентов — биокорректоров на базе целлюлозосодержащего сырья: дисс. канд. тех. наук. — М., 2011. — 201 с.

2. Каночкина М.С. Разработка технологии активных полимикробных посевных материалов для производства дрожже-бактериальных функциональных продуктов: дисс. канд. тех. наук. — М., 2012. — 174 с.

3. Лыско К.А. Разработка технологии дрожжевых обогатителей пищи на базе молочной сыворотки и растительного сырья: дисс. канд. тех. наук. — М., 2007. — 193 с.

4. Нгуен Чыонг Занг. Разработка продуктов питания на базе микробной биоконверсии комплексного растительного сырья: дисс. канд. тех. наук. — М., 2012. — 210 с.

5. Скрыбин Г.К., Головлев Е.П. Вклад микробиологии в современную биотехнологию / Труды 16-й конф. ФЕБО. — М., 1984. — Т. 2. — С. 304–318.

6. Солдатова С.Ю. Разработка технологии биологически активного полуфабриката пищи и корма на основе растительного сырья и дрожжей: дисс. канд. тех. наук. — М., 2004. — 170 с.

7. Сушкова В.И., Воробьева Г.И. Безотходная конверсия растительного сырья в биологически активные вещества. — М.: Де Ли принт, 2008. — 117 с.

8. Чан Ван Ти, Гулимова Л.А., Нгуен Чыонг Занг, Горин К.В., Борисенко Е.Г. Растительно-микробные нутриенты. Сообщение 1: селекция микроорганизмов-продуцентов биомассы из биоценозов молока // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2013. — Т. 9. — № 1. — С. 44–50.

9. Dale Bruce E. Lignocellulose conversion and the future of fermentation biotechnology // Trends Biotechnol. — 1987. — Vol.5. — No. 10. — P. 287–291.

10. Sasson A. Les biotechnologies et la bioindustrie // Recherche. — 1987. — Vol. 18. — No. 188. — P. 726–734.

Список сокращений:

ТФФ — твердофазная ферментация

БВК — белково-витаминный концентрат

PLANT-MICROBE NUTRIENTS. REPORT 2: YEAST BIOCONVERSION OF PLANT MATERIAL

TRAN VAN CHI, L.A. GULIMOVA, NGUYEN TRUONG GIANG, K.V. GORIN, E.G. BORISENKO

Moscow State University of Food Production, Ministry of Education and Science of the Russian Federation, Moscow

The second part of the integrated article, consisting of three parts (reports) was presented. It was shown that selected of human breast milk yeast genus *Pichia* actively accumulate biomass at different solid growing media. Basic laws of the fermentation were studied on the example of autolysate of grain and their complexes with pulverized plant residues. The advantages of solid-state fermentation (SSF) as compared to the deep cultivation of yeast on grain environments were noted. The dynamics of the chemical composition of the fermentation raw material cereal bran example was presented. The possible role of the products obtained in solving the problem of protein deficiency and regulation microbiocenoses gastro-intestinal tract was discussed.

Keywords: yeast, grain raw, deep cultivation, solid-state fermentation, nutraceuticals, prebiotics.

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ И ОБОСНОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ХРАНЕНИЯ ИКРЫ ЛОСОСЕВЫХ РЫБ ЗЕРНИСТОЙ В ПОЛИМЕРНОЙ ТАРЕ

Н.А. ПЛАТОНОВА*, Т.Е. РУБЦОВА, Л.Д. КУРЛАПОВА

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

Представлены результаты органолептических, микробиологических и физико-химических исследований икры лососевых рыб в полимерной упаковке при температуре хранения -4°C — -6°C . Обоснованы условия и сроки хранения икры лососевой зернистой в полимерной таре. Качество и безопасность икры в полимерной упаковке, хранившейся при -4°C — -6°C , соответствуют требованиям ГОСТ 1629-97 и СанПиН 2.3.2.1078-01 на протяжении 12 месяцев.

Ключевые слова: лососевая икра, полимерная тара, сроки хранения, качество и безопасность.

Введение

Икра лососевых рыб, обладающая высокими вкусовыми и питательными свойствами, является одним из ценнейших пищевых продуктов. Известно, что качество икры при хранении зависит от соблюдения технологических режимов ее приготовления, а также вида тары, условий хранения, санитарного состояния производства и других факторов.

Согласно данным органов Госсанэпиднадзора РФ и исследований, проведенных в ИЦ «ВНИРО-ТЕСТ», качество этого деликатесного продукта с каждым годом ухудшается. Связано это как с нарушением технологии приготовления икры лососевых рыб, так и с нарушением правил упаковки, условий транспортирования и хранения.

В последние годы предприятия-изготовители расфасовывают икру не в деревянные бочки, предусмотренные ГОСТ 1629-97, а в тару из полимерных материалов. При этом используют тару различных видов: ведра, баки, плоские и высокие куботейнеры и емкости (от 5 до 50 л) с перфорированным двойным дном и без него, с полиэтиленовыми вкладышами и без них, с пергаментом, смоченным в тузлуке и подложенным на дно и под крышку, или без него.

В связи с этим проведение работ по исследованию качества икры лососевых рыб в полимерной таре представляется актуальным.

Целью исследований является совершенствование и обоснование технологии хранения икры лососевых рыб зернистой в полимерной таре.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие основные задачи:

- исследовать изменение микробиологических, органолептических и физико-химических показателей икры лососевых рыб в полимерной таре в процессе хранения;
- установить сроки хранения икры в полимерной таре при температуре -4°C — -6°C .

Материалы и методы

Объектами исследований служили образцы икры горбуши и кеты, заготовленные на предприятиях Сахалинской обл. (ПК «Рыболовецкий колхоз им. Кирова») и Хабаровского края (Охотский р/н, с. Булгин, Рыб. колхоз им. Ленина) с консервантами и без консервантов. В качестве тары для икры использовали ведра, объемом 5 л с полиэтиленовыми вкладышами, с пергаментом, смоченным в тузлуке, на дне и под крышкой, с бязевыми кружками и куботейнеры объемом 25 л. В качестве контроля рассматривали икру в жестябанках, выработанную по ГОСТ 18173-2004.

Икру хранили при температуре -4°C — -6°C . Сроки годности устанавливали в соответствии с методическими указаниями Госсанэпиднадзора РФ (МУ 4.2.727-99). Санитарно-микробиологический контроль икры лососевых рыб проводили согласно МУК 4.2.727-99 «Санитарно-эпидемиологическая оценка обоснования

© 2013 г. Платонова Н.А., Рубцова Т.Е., Курлапова Л.Д.

* Автор для переписки:

Платонова Наталья Александровна

научный сотрудник

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

107140 Москва, ул. В. Красносельская, 17

Тел./факс: +7 (499) 264-18-33

E-mail: vniro-test@vniro.ru

сроков годности и условий хранения пищевых продуктов» на соответствие Единым санитарно-эпидемиологическим и гигиеническим требованиям к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю) по количеству мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ), бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий), бактерий рода *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, сульфитредуцирующих клостридий, дрожжей и плесневых грибов.

Органолептические показатели икры оценивали на соответствие требованиям ГОСТ 1629-97 при участии экспертов рыбной продукции.

Динамику показателей качества икры при хранении характеризовали по изменению: содержания азотистых веществ (небелкового азота, азота летучих оснований), значений показателей степени гидролиза и окисления липидов (кислотного числа и содержания оксикислот) по ГОСТ 7636-85 и по руководству А.А. Лазаревского «Техно-химический контроль в рыбообрабатывающей промышленности» (1955 г.) [1–5].

Результаты и обсуждение

В результате исследований установлено, что во всех образцах через 1 месяц хранения отсутствовали бактерии

группы кишечной палочки, бактерии рода *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, сульфитредуцирующих клостридий. Дрожжи и плесневые грибы в жестебанках, в ведрах с бязью не были обнаружены, а в куботейнерах и в ведрах с пергаментом и полиэтиленовыми вкладышами были представлены единичными клетками.

Изменение общей обсемененности и количества дрожжей икры лососевых рыб в процессе хранения представлено в таблицах 1 и 2.

К 3-му месяцу хранения икры отмечена тенденция к снижению КМАФАнМ, через 4 месяца общая обсемененность снизилась до 10^2 и при дальнейшем хранении икры в ведрах с пергаментом и бязевыми кружками оставалась стабильной.

В куботейнерах после 7 месяцев хранения отмечена тенденция к увеличению общей обсемененности, однако, к концу 12-го месяца хранения КМАФАнМ не превышало 10^3 КОЕ/1 г; количество микроорганизмов в икре, расфасованной в ведра с полиэтиленовыми вкладышами в процессе хранения увеличилось и к концу 12-го месяца хранения составило 3×10^4 КОЕ в 1 г.

На протяжении всего срока хранения количество дрожжей во всех образцах, кроме образцов икры с полиэтиленовыми вкладышами, было ниже нормируемого значения.

Таблица 1

Изменение КМАФАнМ в образцах икры лососевых рыб при хранении, КОЕ в 1 г

Номер партии	Срок хранения, месяцы								
	1	2	3	4	5	6	7	9	12
Икра с консервантами, ж/б (контроль)									
1	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	$8,6 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$	$4,8 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$	$6,7 \times 10^2$	$6,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$
2	$3,6 \times 10^3$	$3,2 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	$6,8 \times 10^2$	$7,0 \times 10^2$	$6,7 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$	
Куботейнеры высокие, 25 л									
1	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	$8,6 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$	$4,8 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$	$6,7 \times 10^2$	$6,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$
2	$3,6 \times 10^3$	$3,2 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	$6,8 \times 10^2$	$7,0 \times 10^2$	$6,7 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$	
3	$2,3 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$	$9,3 \times 10^2$	$5,9 \times 10^2$	$5,9 \times 10^2$	$5,9 \times 10^2$	$3,9 \times 10^3$	$4,0 \times 10^3$	
Ведра с пергаментом, смоченным в тузлуке, 5 л									
1	$7,0 \times 10^3$	$2,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	$1,2 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$	$4,1 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$
2	$2,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	$5,0 \times 10^2$	$5,1 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$	$4,2 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$	$5,1 \times 10^2$	
3	$3,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	$6,1 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$	$5,6 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$	$4,8 \times 10^2$	
Ведра с полиэтиленовым вкладышем, 5 л									
1	$6,8 \times 10^3$	$6,0 \times 10^3$	$5,4 \times 10^3$	$5,4 \times 10^3$	$1,8 \times 10^3$	$2,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$	$3,0 \times 10^4$
2	$3,0 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$	$8,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$	$4,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	
3	$3,2 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$	$7,8 \times 10^2$	$2,8 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$3,8 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$	
Ведра с бязевыми кружками, 5 л									
1	$1,6 \times 10^5$	$4,0 \times 10^2$		$3,8 \times 10^2$	$3,7 \times 10^2$		$<1,0 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$
2	$8,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$		$2,3 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$		$<15,0 \times 10^1$	$<15,0 \times 10^1$	$1,5 \times 10^2$

Изменение количества дрожжей в образцах икры лососевых рыб при хранении, КОЕ в 1 г

№ п/п	Номер партии	Срок хранения, месяцы								
		1	2	3	4	5	6	7	9	12
Куботейнеры высокие, 25 л										
1	1	$<5,0 \times 10^1$	$<5,0 \times 10^1$	$<5,0 \times 10^1$	$3,5 \times 10^1$	$1,2 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$
	2	$<5,0 \times 10^1$	$<5,0 \times 10^1$	$<5,0 \times 10^1$	$<5,0 \times 10^1$	$3,5 \times 10^2$	$8,0 \times 10^1$	$2,2 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	
	3	$<5,0 \times 10^1$	$<5,0 \times 10^1$	$<5,0 \times 10^1$	$4,2 \times 10^1$	$7,8 \times 10^1$	$1,0 \times 10^2$	$2,1 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	
Ведро с пергаментом, смоченным в тузлуке, 5 л										
2	1	$<5,0 \times 10^1$	$<5,0 \times 10^1$	$<5,0 \times 10^1$	$<5,0 \times 10^1$	8×10^1	$1,2 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	$2,5 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$
	2	$<5,0 \times 10^1$	$<5,0 \times 10^1$	$<5,0 \times 10^1$	$<5,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	
	3	$<5,0 \times 10^1$	$<5,0 \times 10^1$	$<5,0 \times 10^1$	$<5,0 \times 10^1$	$1,5 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$2,5 \times 10^2$	$2,7 \times 10^2$	
Ведро с полиэтиленовым вкладышем, 5 л										
3	1	$<5,0 \times 10^1$	$<5,0 \times 10^1$	$<5,0 \times 10^1$	$1,5 \times 10^2$	$3,6 \times 10^2$	$4,0 \times 10^2$	$6,0 \times 10^2$	$7,2 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$
	2	$<5,0 \times 10^1$	$<5,0 \times 10^1$	$<5,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^2$	$3,5 \times 10^2$	$3,8 \times 10^2$	$5,8 \times 10^2$	$6,3 \times 10^2$	
	3	$<5,0 \times 10^1$	$<5,0 \times 10^1$	$<5,0 \times 10^1$	$1,8 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$	$4,2 \times 10^2$	$6,2 \times 10^2$	$8,0 \times 10^2$	

В образцах икры с полиэтиленовым вкладышем уже через 5 месяцев хранения количество дрожжей увеличилось в 10 раз, и к концу 12 месяцев хранения составило более 3×10^4 КОЕ в 1 г икры. Качество икры в полиэтиленовых ведрах с пергаментом и бязью сохраняется лучше, чем в ведрах с полиэтиленовым вкладышем.

Следовательно, в результате микробиологических исследований установлено, что икра в ведрах с пергаментом и бязью и в куботейнерах по микробиологическим показателям на протяжении всего срока хранения соответствовала требованиям СанПиН 2.3.2.1078-01.

Полученные данные микробиологических исследований в полной мере коррелируют с органолептической оценкой икры. В результате органолептической оценки в образцах икры с полиэтиленовым вкладышем через 5 месяцев хранения был выявлен привкус окислившегося жира и обнаружен запах дрожжей. В образцах икры с пергаментом эти же признаки были отмечены только через 7 месяцев хранения. Икра в ведрах с бязевыми кружками и в куботейнерах соответствовала требованиям нормативной документации на протяжении 12 месяцев хранения.

Исследованиями установлено, что в образцах при хранении наблюдается накопление продуктов распада белков и липидов. В ведрах с бязевыми кружками гидролитические процессы распада белков, гидролитические и окислительные процессы распада липидов выражены в меньшей степени. В образцах икры из куботейнеров значения данных показателей практически не изменились.

Изменения небелкового азота в икре в различной упаковке в процессе хранения представлены на рисунке 1.

Расщепление белков с образованием небелкового азота активнее проходило в первые 6 месяцев

хранения. После 6 месяцев хранения содержание небелкового азота в икре в ведрах с полиэтиленовым вкладышем и с пергаментом, смоченным в тузлуке, возросло от 0,19 и 0,14% до 0,31 и 0,33%, а к концу хранения (12 месяцев) увеличение составило в 1,8 и 2,4 раза, соответственно.

В икре в ведрах с бязевыми кружками в первые 6 месяцев хранения наблюдался незначительный рост небелкового азота (от 0,19 до 0,25%). К 12 месяцам хранения содержание его в икре в ведрах с бязевыми кружками, так же, как в икре в жестебанке (контроль), составляло 0,28%.

В икре в куботейнерах высоких в процессе хранения увеличение содержания небелкового азота выражено в меньшей степени, чем в ведрах с полиэтиленовым вкладышем и с пергаментом, смоченным в тузлуке, — в 1,7 раз (от 0,17 до 0,30%, соответственно).

Динамика содержания азота летучих оснований в процессе хранения аналогична изменениям содержания небелкового азота (рис. 2).

Увеличение содержания азота летучих оснований при хранении в икре в ведрах с пергаментом, смоченным в тузлуке, и с полиэтиленовым вкладышем составило от 14,69–13,15 мг% до 27,39–30,02 мг%, соответственно.

Процесс накопления азота летучих оснований менее всего выражен в икре в ведрах с бязевыми кружками и в куботейнерах высоких: от 15,68–17,95 мг% до 24,17–25,14 мг%, соответственно (табл. 3).

Таким образом, самые низкие значения содержания азота летучих оснований, так же, как и небелкового азота, были отмечены в икре с бязевыми кружками и в куботейнерах высоких.

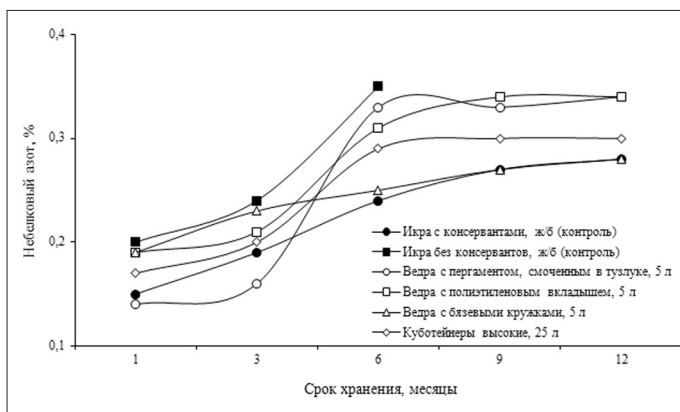


Рис. 1. Динамика изменения содержания небелкового азота в икре лососевых рыб в процессе хранения

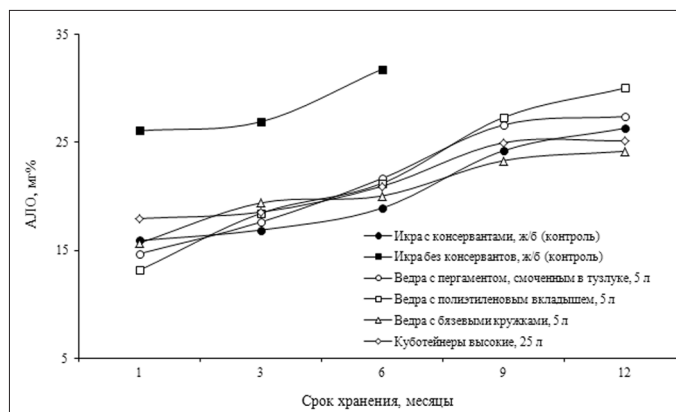


Рис. 2. Динамика содержания азота летучих оснований в икре лососевых рыб в процессе хранения

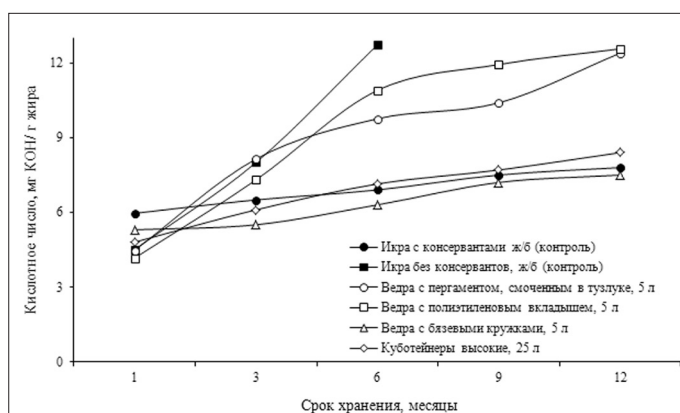


Рис. 3. Динамика кислотного числа липидов икры лососевых рыб в процессе хранения

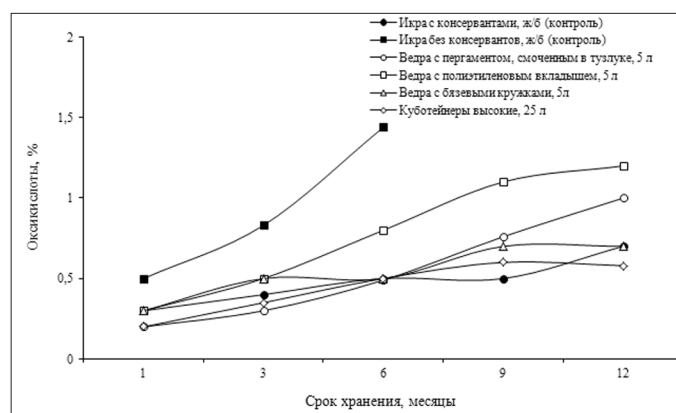


Рис. 4. Динамика содержания оксикислот липидов икры лососевых рыб в процессе хранения

Анализ данных позволяет сделать заключение, что расщепление белков с накоплением первичных продуктов распада в икре в ведрах с бязевыми кружками и в куботейнерах проходит медленнее, чем в икре в ведрах с пергаментом, смоченным в тузлуке, и в ведрах с полиэтиленовым вкладышем.

Содержание кислотного числа и оксикислот в липидах икры в определенной степени также зависело от вида упаковки (табл. 4). Так, наиболее подверженной окислительной и гидролитической порче оказалась икра в ведрах с пергаментом, смоченным в тузлуке, и в ведрах с полиэтиленовым вкладышем. К концу срока хранения кислотное число составляло 12,40–12,57 мг КОН/г жира, оксикислоты — 1,0–1,2%, соответственно.

Наименьшее содержание свободных жирных кислот (7,5; 8,4 мг КОН/г жира) и наименьшая интенсивность их накопления (в 1,3; 1,4 раза) при длительном хранении наблюдались в липидах икры, заготовленной в ведрах с бязевыми кружками и в куботейнерах высоких.

Изменения кислотного числа липидов икры лососевых рыб изображены на рисунке 3.

Наиболее высокая доля оксикислот (1,0–1,2%) и соответственно более интенсивный прирост количества оксикислот (в 3,3 и 4 раза) на протяжении 12 месяцев хранения наблюдались в липидах икры в ведрах с пергаментом, смоченным в тузлуке, и с полиэтиленовым вкладышем.

На рисунке 4 представлена динамика оксикислот липидов икры лососевых рыб.

Менее подверженными окислительной порче оказались липиды икры в ведрах с бязевыми кружками и в куботейнерах высоких, где количество оксикислот возросло от 0,3; 0,2% до 0,7; 0,58%, соответственно. Таким образом, содержание оксикислот в этих образцах возросло в 2 и 2,9 раза.

Полученные данные физико-химических исследований подтверждаются результатами органолептической оценки (они сходны с данными микробиологического исследования).

Таблица 3

Динамика содержания азотистых веществ в икре лососевых рыб в процессе хранения

Срок хранения, месяцы									
1		3		6		9		12	
Небелковый азот, %	АЛО, мг%	Небелковый азот, %	АЛО, мг%	Небелковый азот, %	АЛО, мг%	Небелковый азот, %	АЛО, мг%	Небелковый азот, %	АЛО, мг%
Икра с консервантами, жестебанки (контроль)									
0,15	15,91	0,19	16,88	0,24	18,91	0,27	24,22	0,28	26,30
Ведро с пергаментом, смоченным в тузлуке, 5 дм ³									
0,14	14,69	0,16	17,61	0,33	21,65	0,33	21,61	0,34	27,39
Ведро с полиэтиленовым вкладышем, 5 дм ³									
0,19	13,15	0,21	18,43	0,31	21,20	0,34	27,30	0,34	30,02
Ведро с бязевыми кружками, 5 дм ³									
0,19	15,68	0,23	19,39	0,25	20,04	0,27	25,30	0,28	24,17
Куботейнеры высокие, 25 дм ³									
0,17	17,95	0,20	18,54	0,29	20,93	0,30	24,96	0,30	25,14

Таблица 4

Динамика содержания продуктов окисления липидов в икре лососевых рыб в хранении

Срок хранения, месяцы									
1		3		6		9		12	
Кислотное число, мгКОН/г жира	Оксикислоты, %	Кислотное число, мгКОН/г жира	Оксикислоты, %	Кислотное число, мгКОН/г жира	Оксикислоты, %	Кислотное число, мгКОН/г жира	Оксикислоты, %	Кислотное число, мгКОН/г жира	Оксикислоты, %
Икра с консервантами, жестебанки (контроль)									
5,96	0,3	6,5	0,4	6,9	0,5	7,5	0,5	7,8	0,7
Ведро с пергаментом, смоченным в тузлуке, 5 л									
4,47	0,2	8,14	0,3	9,76	0,49	10,4	0,76	12,40	1,0
Ведро с полиэтиленовым вкладышем, 5 л									
4,16	0,30	7,3	0,50	10,9	0,8	11,94	1,10	12,57	1,20
Ведро с бязевыми кружками, 5 л									
5,3	0,3	5,5	0,5	6,3	0,5	7,2	0,7	7,5	0,7
Куботейнеры высокие, 25 л									
4,8	0,20	6,1	0,35	7,14	0,50	7,7	0,60	8,4	0,58

Заклучение

Таким образом, результаты микробиологических, органолептических и физико-химических исследований свидетельствуют о том, что качество икры в полиэтиленовых куботейнерах из полимерных материалов соответствует требованиям ГОСТ 1629-97 и СанПиН 2.3.2.1078-01 [1] в течение 12 месяцев.

Качество икры в полиэтиленовых ведрах с пергаментом и бязью сохраняется лучше, чем в ведрах с полиэтиленовым вкладышем. Полученные данные позволяют сделать заключение, что срок хранения икры лососевых рыб в полимерной таре при температуре $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ составляет не менее 9 месяцев хранения.

Литература

1. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы. СанПиН

2.3.2.1078-01. – 2-е изд. испр. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. – 143 с.

2. Копыленко Л.Р. и др. Испытание пищевых продуктов для последующей сертификации / Краткие результаты научной деятельности ВНИРО за 2002 г. – М.: Изд. ВНИРО, 2002. – С. 446–448.
3. Платонова Н.А. Сравнительный анализ икры лососевых рыб в полимерной банке и традиционной стеклобанке в хранении / В кн.: VI Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – М., 2011. – С. 238–240.
4. Рубцова Т.Е., Платонова Н.А. Технология получения икры лососевой замороженной // Рыбная промышленность. – 2012. – № 1. – С. 27–31.
5. Санитарно-эпидемиологическая оценка обоснования сроков годности и условий хранения пищевых продуктов. Методические указания Госсанэпиднадзора Минздрава России (МУК 4.2.1847-04).

IMPROVEMENT AND VALIDATION OF TECHNOLOGY STORAGE OF SALMON CAVIAR GRAINS IN PLASTIC CONTAINERS

N.A. PLATONOVA, I.E. RUBTSOVA, L.D. KURLAPOVA

All-Russian Research Institute of Fisheries and Oceanography, Moscow

The results of the organoleptic, microbiological and physico-chemical studies of salmon roe in plastic containers at a storage temperature of $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ are presented. Grounded conditions and terms of salmon caviar grain in plastic containers were founded. The quality and safety of salmon's caviar granular in plastic packaging, stored at $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$, meet the requirements of GOST 1629-97 and SanPin 2.3.2.1078-01 for 12 months.

Keywords: salmon caviar, plastic packaging, shelf life, quality and safety.

МЕТИЛЗАВИСИМАЯ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ДНК-ЭНДОНУКЛЕАЗА BslI УЗНАЕТ И РАСЩЕПЛЯЕТ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ДНК 5'-RYNRY-3' ПРИ НАЛИЧИИ В НЕЙ НЕ МЕНЕЕ ДВУХ 5-МЕТИЛЦИТОЗИНОВ

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

НПО «СибЭнзим», Новосибирск

Изучена субстратная специфичность метилзависимой сайт-специфической ДНК-эндонуклеазы BslI. Показано, что BslI гидролизует вырожденную последовательность ДНК 5'-RYNRY-3' (где R – А или G, а Y – Т или С) при наличии в ней двух или более 5-метилцитозиннов. Эффективность гидролиза ДНК ферментом зависит от числа 5-метилцитозиннов и их положения в узнаваемой последовательности. Поскольку эндонуклеаза BslI расщепляет только С5-метилованную ДНК, она может быть использована в молекулярно-биологических и эпигенетических исследованиях для оценки метилирования геномной ДНК эукариот.

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

Введение

5-Метилцитозин-зависимые сайт-специфические ДНК эндонуклеазы (MD-эндонуклеазы, от англ. «methyl-directed») были обнаружены сравнительно недавно [3, 7]. Эти ферменты узнают и специфически расщепляют определенные последовательности ДНК только при наличии в них 5-метилцитозина. По своим биохимическим свойствам MD-эндонуклеазы аналогичны хорошо изученным эндонуклеазам рестрикции типа II.

Однако, если эндонуклеазы рестрикции узнают и гидролизуют немодифицированную ДНК и не расщепляют метилированную, то MD-эндонуклеазы, наоборот, гидролизуют метилированную ДНК и совершенно не расщепляют нативную немодифицированную ДНК [1–7].

Ранее нами было показано, что MD-эндонуклеаза BslI гидролизует последовательность ДНК 5'-G(5mC)NGC-3'/3'-CGN(5mC)G-5' [5]. В настоящей работе мы предприняли детальное изучение субстратной специфичности BslI.

Материалы и методы

Препараты ферментов и субстраты для них.

Для экспериментов использовали препарат фермента BslI с активностью 16 ед./мкл, T4 полинуклеотидкиназу, препараты ДНК и буферные растворы производства НПО «СибЭнзим» (Россия), а также ДНК-метилтрансферазу CviPI производства «New England Biolabs» (США). Олигодезоксирибонуклеотиды были синтезированы в НПО «СибЭнзим» (Россия). Их первичная структура приведена в таблице 1.

В качестве маркера молекулярных масс ДНК использовали ДНК-маркер 1 kb и pUC19/MspI («СибЭнзим», Россия).

Метилирование субстратных ДНК ферментом M.CviPI. Метилирование pUC19 и других плазмидных ДНК проводили при 37 °С в течение 1 часа в 20 мкл реакционной смеси, содержащей ДНК в количестве 0,2 мкг, SE-буфер «Y» (33 mM Трис-ацетат pH 7,9 – при 25 °С, 66 mM калия ацетат, 10 mM магния ацетат, 1 mM DTT), SAM – 100 мкм, препарат фермента M.CviPI (4 ед./мкл) – 1 мкл.

Гидролиз плазмидной ДНК эндонуклеазой BslI и анализ продуктов реакции. Гидролиз плазмидной ДНК проводили при 37 °С в 20 мкл реакционной смеси, содержащей SE-буфер «W» (10 mM Трис-HCl pH 8,5 – при 25 °С, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM DTT), ДНК в количестве 0,5 мкг и 1 мкл препарата фермента BslI (16 ед./мкл) в течение 2 часов.

© 2013 г. Чернухин В.А., Гончар Д.А., Томилова Ю.Э., Болтенгаген А.А., Голикова Л.Н., Дегтярев С.Х.

* Автор для переписки:

Чернухин Валерий Алексеевич

ООО «СибЭнзим»

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

Тел./факс: +7 (383) 209-27-40

E-mail: valera@sibenzyme.ru

**Структура олигонуклеотидов, использованных в данной работе.
Нуклеотиды, входящие в состав изучаемого участка, подчеркнуты**

- N1: 5'-CCCTTTCCTCTTTTGTAG(5mC)TTTTCCC-3'
 N2: 5'-GGGAAAAG(5mC)TACAAAAGAGGAAAGGG-3'
 N3: 5'-CCCTTTCCTCTTTTACAG(5mC)TTTTCCC-3'
 N4: 5'-GGGAAAAG(5mC)TGTA AAAAGAGGAAAGGG-3'
 N5: 5'-CCCTTTCCTCTTTTATAG(5mC)TTTTCCC-3'
 N6: 5'-GGGAAAAG(5mC)TATAAAAAGAGGAAAGGG-3'
 N7: 5'-GGGAAAAG(5mC)TA(5mC)AAAAGAGGAAAGGG-3'
 N8: 5'-CCCTTTCCTCTTTTA(5mC)AG(5mC)TTTTCCC-3'
 N9: 5'-GGGAAAAGCTA(5mC)AAAAGAGGAAAGGG-3'
 N10: 5'-GCTTGTA CTTTGA(5mC)GGTATTGATTCTCACCACG-3'
 N11: 5'-CGTGGTGAGAATCAATA(5mC)CGTCAAAGTACAAGC-3'
 N12: 5'-CCCTTTCCTCTTTTA(5mC)AGCTTTTCCC-3'
 N13: 5'-GCTTGTA CTTTGA(5mC)AGTATTGATTCTCACCACG-3'
 N14: 5'-CGTGGTGAGAATCAATA(5mC)TGTCAAAGTACAAGC-3'
 N15: 5'-GCTTGTA CTTTAGCGGCATTGATTCTCACCACG-3'
 N16: 5'-CGTGGTGAGAATCAATGCCGCTAAAGTACAAGC-3'
 N17: 5'-GCTTGTA CTTTAG(5mC)GGCATTGATTCTCACCACG-3'
 N18: 5'-CGTGGTGAGAATCAATG(5mC)CGCTAAAGTACAAGC-3'
 N19: 5'-GCTTGTA CTTTAGCGG(5mC)ATTGATTCTCACCACG-3'
 N20: 5'-CGTGGTGAGAATCAATGCCG(5mC)TAAAGTACAAGC-3'
 N21: 5'-GCTTGTA CTTTAG(5mC)GG(5mC)ATTGATTCTCACCACG-3'
 N22: 5'-CGTGGTGAGAATCAATG(5mC)CG(5mC)TAAAGTACAAGC-3'
 N23: 5'-GCTTGTA CTTTAA(5mC)GA(5mC)ATTGATTCTCACCACG-3'
 N24: 5'-CGTGGTGAGAATCAATGTCGTAAAGTACAAGC-3'

Для разделения продуктов гидролиза плазмидной ДНК применяли электрофорез в 1% агарозном или 15% полиакриламидном гелях в буфере ТАЕ.

Приготовление олигонуклеотидного дуплекса. Одну из цепей изучаемого олигонуклеотидного дуплекса модифицировали по 5'-концу с помощью T4 полинуклеотидкиназы и γ [32 P]-АТФ. После очистки олигонуклеотида от побочных продуктов реакции к нему добавляли эквимольное количество комплементарного немеченного олигонуклеотида и пробирку прогревали 5 минут при 95 °С с последующим охлаждением до комнатной температуры на рабочем столе.

Гидролиз олигонуклеотидных дуплексов эндонуклеазой BslI. Реакцию гидролиза проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей SE-буфер «W», олигонуклеотидный дуплекс в концентрации 40 нМ и 1 мкл препарата фермента BslI при температуре 37 °С в течение 1 часа. Электрофорез продуктов гидролиза проводили в денатурирующем 20%-ном полиакриламидном геле с 7 М мочевиной в трис-боратном буфере. Радио-

автографию геля проводили с помощью прибора Personal Molecular Imager («BioRad», США) и программы Quantity One V.4.6.7 («BioRad», США).

Определение степени гидролиза олигонуклеотидных дуплексов. Для установления степени расщепления на радиоавтографе электрофореграммы продуктов гидролиза олигонуклеотида определялась величина DLU (Digital Light Units), которая пропорциональна интенсивности излучения изотопом 32 P, за вычетом фона. Процент гидролиза определяли как отношение DLU для полученного продукта реакции к сумме DLU, приходящихся на оставшуюся исходную ДНК и полученный фрагмент ДНК. Обработку данных осуществляли с помощью программы OptiQuant V. 0.3.00 (Packard Instrument Co., USA).

Результаты и обсуждение

Гидролиз метилированной последовательности 5'-GCNGC-3' эндонуклеазой BslI. Ранее нами было показано, что MD-эндонуклеаза BslI расщепляет ДНК

плазмиды ρF_{sp4HI1} [5]. Эта плазида содержит ген ДНК-метилтрансферазы $M.F_{sp4HI}$ [8], модифицирующей сайты $5'-GCNGC-3'$ с образованием последовательностей $5'-G(5mC)NGC-3'/3'-CGN(5mC)G-5'$, по которым и осуществляется гидролиз ферментом $BlsI$. На рисунке 1 приведена фотография агарозного геля, на которой видно, что $BlsI$ специфически расщепляет плазмиду ρF_{sp4HI1} , образуя характерный набор фрагментов (дорожка 8). При этом фермент не гидролизует такие субстраты, как, например, ДНК фага λ ($dcm+$) (дорожка 2), фага T7 (дорожка 4) и ДНК плазмиды ρH_{spAI} [3], в которой метилированы сайты $5'-GCGC-3'$ с образованием последовательности $5'-G(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)G-5'$ (дорожка 6).

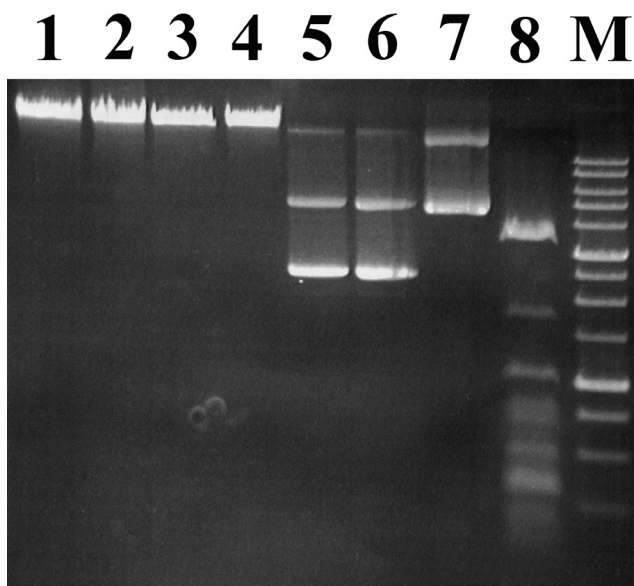


Рис. 1. Расщепление эндонуклеазой $BlsI$ ДНК плазмиды ρF_{sp4HI1} , содержащей метилированные последовательности $5'-GCNGC-3'$. Электрофорез в 1% агарозном геле. Дорожки: 1 – ДНК фага λ ; 2 – ДНК фага λ + $BlsI$; 3 – ДНК фага T7; 4 – ДНК фага T7 + $BlsI$; 5 – ДНК ρH_{spAI} ; 6 – ДНК ρH_{spAI} + $BlsI$; 7 – ДНК ρF_{sp4HI1} ; 8 – ДНК ρF_{sp4HI1} + $BlsI$; М – ДНК-маркер 1kb

В настоящей работе мы исследовали способность MD-эндонуклеазы $BlsI$ расщеплять другие субстраты. Последовательность $5'-GCNGC-3'/3'-CGNCG-5'$ может включать от одного до четырех метилированных цитозинов (не считая центрального основания N). Необходимо было определить активность фермента $BlsI$ при расщеплении сайта $5'-GCNGC-3'/3'-CGNCG-5'$, содержащего различное количество 5-метилцитозинов. Кроме того, как мы установили ранее, MD-эндонуклеаза $GlaI$ расщепляет не только по-

следовательность $5'-G(5mC)GC-3'$, но и вырожденные варианты данной последовательности с общей формулой $5'-R(5mC)GY-3'$ [10]. В связи с этим мы определяли способность MD-эндонуклеазы $BlsI$ гидролизовать вырожденные варианты последовательности $5'-GCNGC-3'/3'-CGNCG-5'$.

Гидролиз ДНК, содержащей метилированные G(5mC)-динуклеотиды. Способность $BlsI$ расщеплять последовательность $5'-GCNGC-3'/3'-CGNCG-5'$ с различным количеством 5-метилцитозинов определялась в экспериментах на специально подобранных плазмидных ДНК. Для получения таких субстратов мы использовали ДНК-метилтрансферазу $M.CviPI$, которая метилирует динуклеотид $5'-GC-3'$ с образованием $5'-G(5mC)-3'/3'(5mC)G-5'$ [9]. ДНК $\rho UC19$ была обработана ферментом $M.CviPI$, как описано в разделе «Материалы и методы», и далее подвергалась гидролизу MD-эндонуклеазой $BlsI$. Стоит отметить, что плазида $\rho UC19/M.CviPI$ содержит метилированные цитозины не только в последовательностях $5'-GCNGC-3'/3'-CGNCG-5'$, но и в последовательностях вида $5'-RYNGC-3'/3'-YRNCG-5'$, которые также могут служить мишенью для $BlsI$.

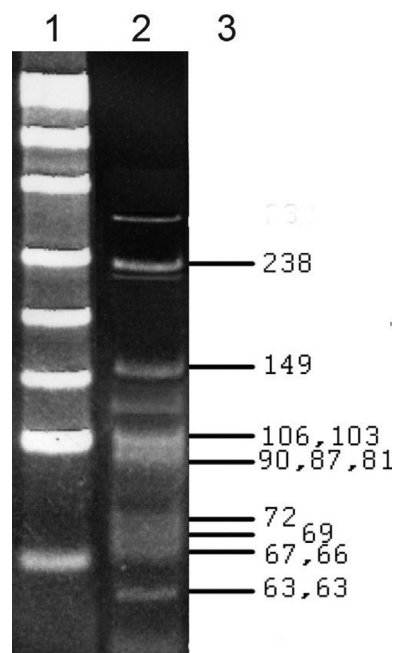
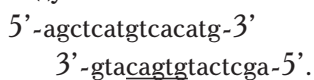


Рис. 2. Электрофореграмма ДНК-фрагментов, образованных в результате сайт-специфического гидролиза плазмиды $\rho UC19/M.CviPI$ эндонуклеазой $BlsI$. Электрофорез в 15% ПААГ. Дорожки: 1 – маркер $\rho UC19/MspI$; 2 – ДНК $\rho UC19/M.CviPI$ + $BlsI$; 3 – теоретически рассчитанные длины фрагментов ДНК, образующихся при расщеплении $\rho UC19$ по последовательностям $5'-GCNRY-3'$ и $5'-RYNGC-3'$

Результаты эксперимента приведены на рисунке 2. Справа от фотографии геля на рисунке представлена полученная расчетным путем теоретическая картина расщепления $\rho UC19$ по последовательности 5'-GCNRY-3' и комплементарной ей последовательности 5'-RYNGC-3' с указанием длин получаемых фрагментов. Как видно из рисунка 2, длины фрагментов ДНК, образованных при гидролизе $\rho UC19$ /M.CviPI ферментом BlnI, близки к расчетным длинам, полученным при расщеплении плазмиды $\rho UC19$ по последовательностям 5'-GCNRY-3' и 5'-RYNGC-3'. Несколько дополнительных фрагментов, видимых на электрофореграмме и имеющих меньшую интенсивность, являются, видимо, результатом неполного гидролиза плазмидной ДНК. То есть, помимо последовательности 5'-G(5mC)NGC-3'/3'-CGN(5mC)G-5' [3], BlnI способен узнавать и расщеплять последовательность 5'-G(5mC)NRY-3'/3'-(5mC)GNYR-5'.

Гидролиз ДНК, содержащей A(5mC) динуклеотиды в сайте 5'-RYNRY-3'. Для проверки способности фермента BlnI расщеплять полностью выродженный сайт 5'-RYNRY-3' с 5-метилцитозинами, но без G(5mC)-динуклеотидов, мы использовали плазмиду $\rho Fat/Kz3$ (GTNAC), содержащую последовательности 5'-GTNA(5mC)-3'/3'-(5mC)ANTG-5'. Исходная плаزمиды $\rho Fat/Kz3$ была получена путем клонирования Kzo9I-фрагмента геномной ДНК бактериального штамма *Flavobacterium aquatile* NL3, содержащего ген ДНК-метилтрансферазы M.FatI, в вектор $\rho UC19$ по сайту эндонуклеазы рестрикции BamHI. ДНК-метилтрансфераза M.FatI метилирует цитозин в сайте 5'-CATG-3' с образованием последовательности 5'-(5mC)ATG-3'. Плазмиды $\rho Fat/Kz3$ (GTNAC) была получена путем встраивания в плазмиды $\rho Fat/Kz3$ по сайту эндонуклеазы рестрикции HindIII олигонуклеотидного дуплекса:



Ввиду наличия в олигонуклеотидном дуплексе двух сайтов метилирования 5'-CATG-3', в плазмиде $\rho Fat/Kz3$ (GTNAC) возникает уникальная последовательность 5'-(5mC)ATGTCA(5mC)ATG-3'/3'-GTA(5mC)AGTGTA(5mC)-5', содержащая изучаемый сайт 5'-GTNA(5mC)-3'/3'-(5mC)ANTG-5' (подчеркнут).

На рисунке 3 приведена картина расщепления эндонуклеазой BlnI плазмид $\rho Fat/Kz3$ и $\rho Fat/Kz3$ (GTNAC), предварительно линейаризованных рестриктазой DriI. Как видно из этого рисунка, $\rho Fat/Kz3$ (GTNAC) расщепляется эндонуклеазой BlnI в

единственном месте, в то время как гидролиз плазмиды $\rho Fat/Kz3$ не происходит. Электрофоретическая подвижность продуктов гидролиза соответствует теоретически рассчитанным длинам фрагментов (3660 и 1260 п.н.), которые должны образоваться при расщеплении метилированной последовательности 5'-GTNA(5mC)-3'/3'-(5mC)ANTG-5'.

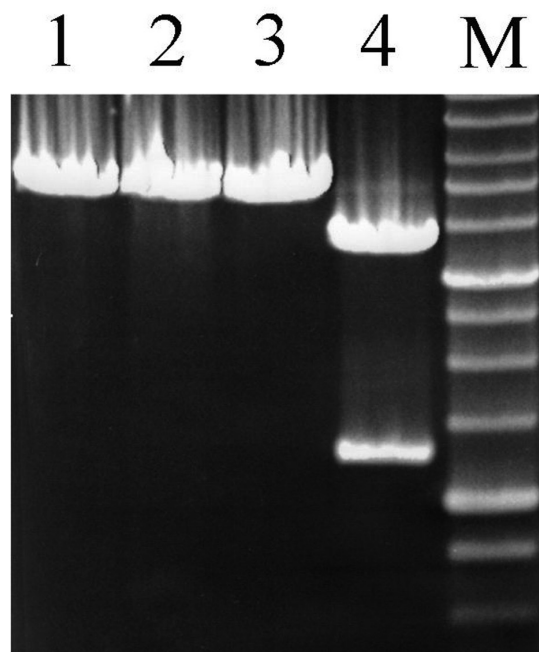


Рис. 3. Гидролиз плазмид $\rho Fat/Kz3$ и $\rho Fat/Kz3$ (GTNAC) ДНК-эндонуклеазой BlnI. Дорожки: 1 – ДНК $\rho Fat/Kz3$ + DriI; 2 – ДНК $\rho Fat/Kz3$ + DriI + BlnI; 3 – ДНК $\rho Fat/Kz3$ (GTNAC) + DriI; 4 – ДНК $\rho Fat/Kz3$ (GTNAC) + DriI + BlnI; М – ДНК-маркер 1kb

Таким образом, BlnI гидролизует последовательность 5'-GTNA(5mC)-3'/3'-(5mC)ANTG-5' в плазмиде $\rho Fat/Kz3$ (GTNAC). Выявленная нами способность MD-эндонуклеазы BlnI расщеплять метилированный сайт, не содержащий в своем составе GC-динуклеотидов, ставит вопрос о возможности расщепления других сайтов, содержащих 5-метилцитозин в последовательности 5'-RYNRY-3'.

Гидролиз олигонуклеотидов с различными вариантами метилированной последовательности 5'-RYNRY-3'. Для подтверждения возможности расщепления эндонуклеазой BlnI различных вариантов метилированной последовательности 5'-RYNRY-3' мы использовали синтетические олигонуклеотидные дуплексы, содержащие два и более 5-метилцитозина в последовательности 5'-RYNRY-3'. Результаты экспериментов приведены на рисунках 4–8.

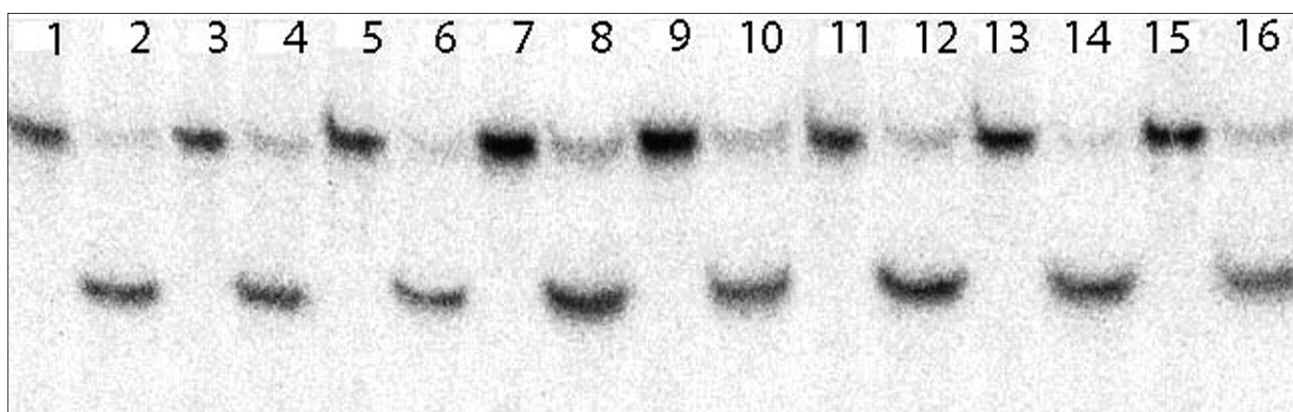


Рис. 4. Расщепление эндонуклеазой BlnI дуплексов, содержащих сайт 5'-GCNGC-3' с различным количеством и расположением 5-метилцитозинов.

Дорожки:

- 1, 2 – дуплекс N17*/N18 (последовательность 5'-G(5mC)GGC-3'/3'-CGC(5mC)G-5');
- 3, 4 – дуплекс N17*/N20 (5'-G(5mC)GGC-3'/3'-(5mC)GCCG-5');
- 5, 6 – дуплекс N17*/N22 (5'-G(5mC)GGC-3'/3'-(5mC)GC(5mC)G-5');
- 7, 8 – дуплекс N19*/N20 (5'-GCGG(5mC)-3'/3'-(5mC)GCCG-5');
- 9, 10 – дуплекс N19*/N22 (5'-GCGG(5mC)-3'/3'-(5mC)GC(5mC)G-5');
- 11, 12 – дуплекс N21*/N18 (5'-G(5mC)GG(5mC)-3'/3'-CGC(5mC)G-5');
- 13, 14 – дуплекс N21*/N20 (5'-G(5mC)GG(5mC)-3'/3'-(5mC)GCCG-5');
- 15, 16 – дуплекс N21*/N22 (5'-G(5mC)GG(5mC)-3'/3'-(5mC)GC(5mC)G-5').

Нечетные номера – интактный дуплекс, четные номера – дуплекс, обработанный BlnI. Значком * выделена меченая олигонуклеотидная цепь. Электрофорез в 20%-ном полиакриламидном геле с 7 М мочевиной

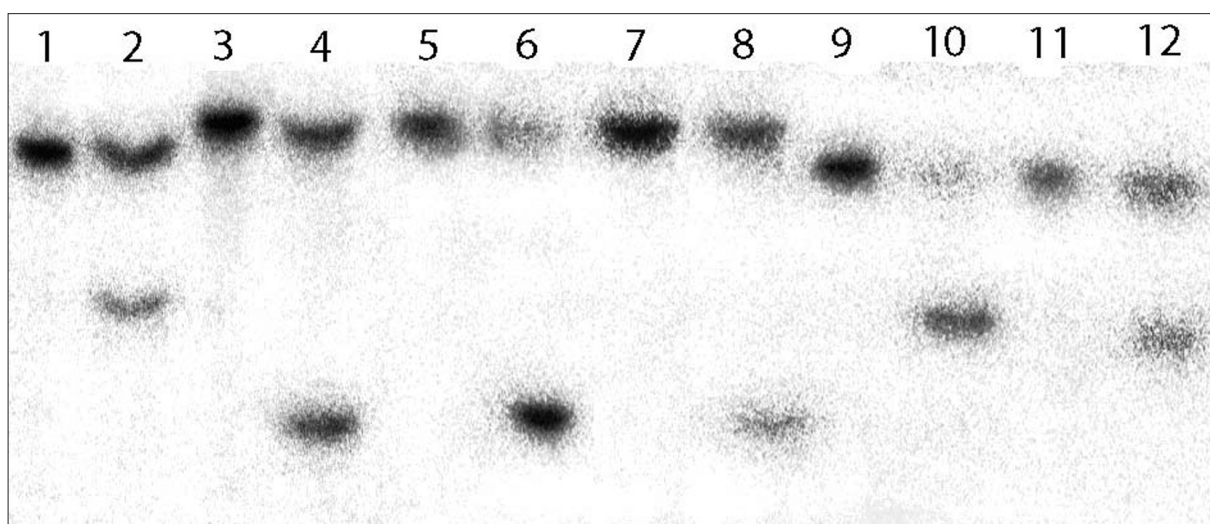


Рис. 5. Расщепление эндонуклеазой BlnI дуплексов, содержащих сайт 5'-ACNGC-3'/3'-TGNCG-5' с различными вариантами расположения метилированных цитозинов.

Дорожки:

- 1, 2 – дуплекс N3*/N4 (5'-ACAG(5mC)-3'/3'-TGT(5mC)G-5');
- 3, 4 – дуплекс N4*/N3 (5'-G(5mC)TGT-3'/3'-(5mC)GACA-5');
- 5, 6 – дуплекс N4*/N8 (5'-G(5mC)TGT-3'/3'-(5mC)GA(5mC)A-5');
- 7, 8 – дуплекс N4*/N12 (5'-G(5mC)TGT-3'/3'-CGA(5mC)A-5');
- 9, 10 – дуплекс N8*/N4 (5'-A(5mC)AG(5mC)-3'/3'-TGT(5mC)G-5');
- 11, 12 – дуплекс N12*/N4 (5'-A(5mC)AGC-3'/3'-TGT(5mC)G-5').

Нечетные номера – интактный дуплекс, четные номера – дуплекс, обработанный BlnI. Значком * выделена меченая олигонуклеотидная цепь. Электрофорез в 20%-ном полиакриламидном геле с 7 М мочевиной

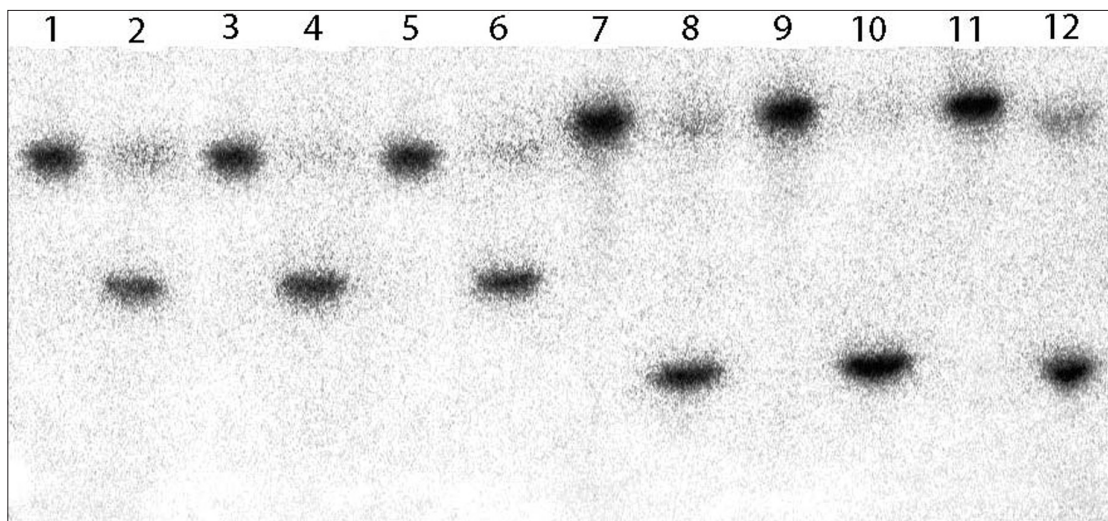


Рис. 6. Расщепление эндонуклеазой BslI дуплексов, содержащих сайт 5'-GTNGC-3'/3'-CANCG-5' с различными вариантами расположения метилированных цитозинов.

Дорожки:

- 1, 2 – дуплекс N1*/N2 (5'-GTAG(5mC)-3'/3'-CAT(5mC)G-5');
- 3, 4 – дуплекс N1*/N7 (5'-GTAG(5mC)-3'/3'-(5mC)AT(5mC)G-5');
- 5, 6 – дуплекс N1*/N9 (5'-GTAG(5mC)-3'/3'-(5mC)ATCG-5');
- 7, 8 – дуплекс N2*/N1 (5'-G(5mC)TAC-3'/3'-(5mC)GATG-5');
- 9, 10 – дуплекс N7*/N1 (5'-G(5mC)TA(5mC)-3'/3'-(5mC)GATG-5');
- 11, 12 – дуплекс N9*/N1(5'-GCTA(5mC)-3'/3'-(5mC)GATG-5').

Нечетные номера – интактный дуплекс, четные номера – дуплекс, обработанный BslI. Значком * выделена меченая олигонуклеотидная цепь. Электрофорез в 20%-ном полиакриламидном геле с 7 М мочевиной

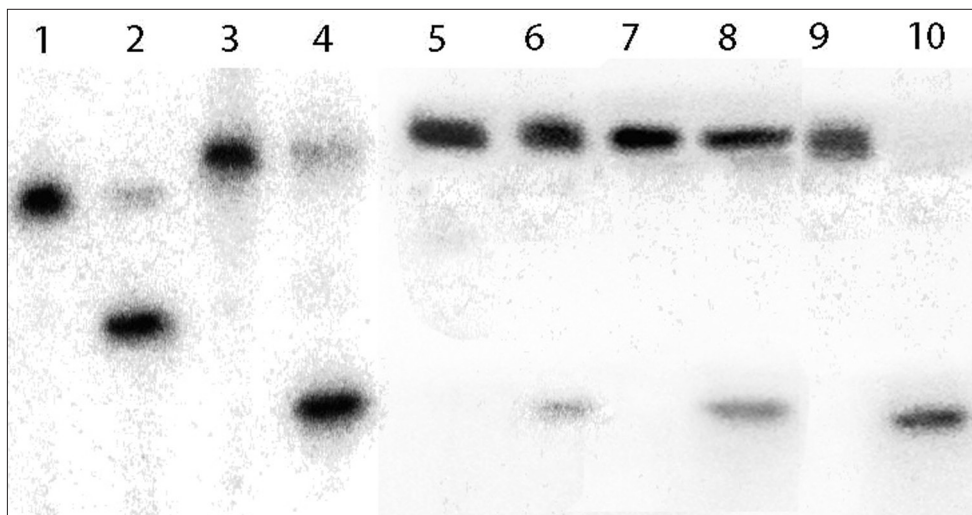


Рис. 7. Расщепление эндонуклеазой BslI олигонуклеотидных дуплексов, содержащих сайты 5'-ATNGC-3' и 5'-ACNGT-3'.

Дорожки:

- 1, 2 – дуплекс N5*/N6 (5'-ATAG(5mC)-3'/3'-TAT(5mC)G-5');
- 3, 4 – дуплекс N6*/N5 (5'-G(5mC)TAT-3'/3'-(5mC)GATA-5');
- 5, 6 – дуплекс N10*/N11 (5'-A(5mC)GGT-3'/3'-TGC(5mC)A-5');
- 7, 8 – дуплекс N13*/N14 (5'-A(5mC)AGT-3'/3'-TGT(5mC)A-5');
- 9, 10 – дуплекс N17*/N18 (5'-G(5mC)GGC-3'/3'-CGC(5mC)G-5');

Нечетные номера – интактный дуплекс, четные номера – дуплекс, обработанный BslI. Значком * выделена меченая олигонуклеотидная цепь. Электрофорез в 20%-ном полиакриламидном геле с 7 М мочевиной

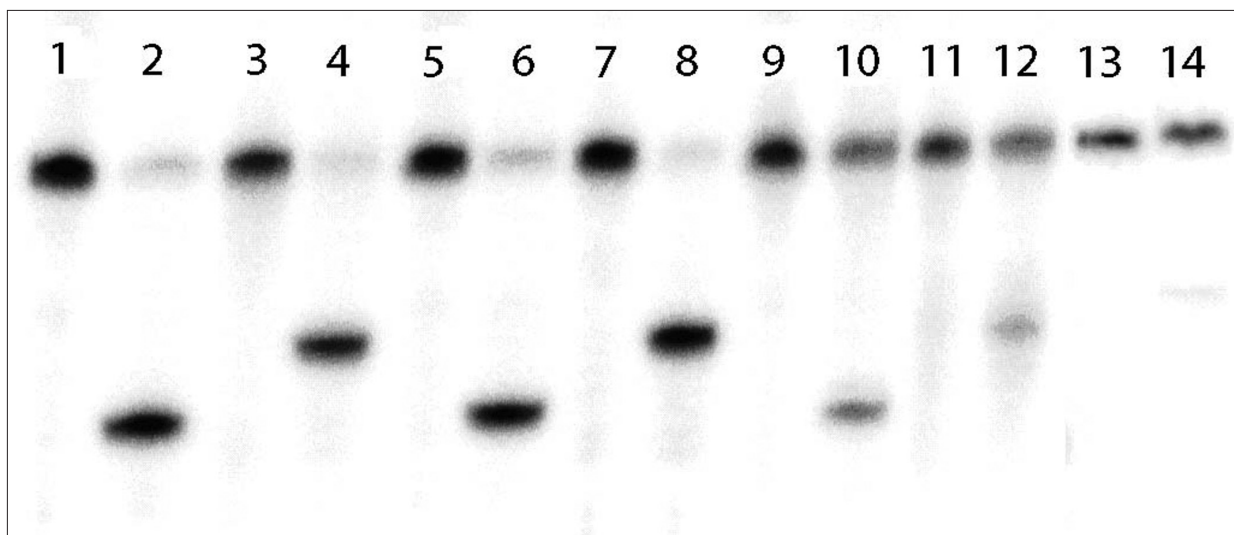


Рис. 8. Гидролиз BlnI олигонуклеотидных дуплексов, содержащих 5-метилцитозин только в одной из цепей последовательности узнавания.

Дорожки:

- 1, 2 – дуплекс N21*/N18 (5'-G(5mC)GG(5mC)-3'/3'-CGC(5mC)G-5');
 3, 4 – дуплекс N18*/N21 (5'-G(5mC)GGC-3'/3'-(5mC)GC(5mC)G-5');
 5, 6 – дуплекс N21*/N16 (5'-G(5mC)GG(5mC)-3'/3'-CGCCG-5');
 7, 8 – дуплекс N16*/N21 (5'-GCGGC-3'/3'-(5mC)GC(5mC)G-5');
 9, 10 – дуплекс N23*/N24 (5'-A(5mC)GA(5mC)-3'/3'-TGCTG-5');
 11, 12 – дуплекс N24*/N23 (5'-GTCTG-3'/3'-(5mC)AG(5mC)A-5');
 13, 14 – дуплекс N17/N16 (5'-G(5mC)GGC-3'/3'-CGCCG-5').

Нечетные номера – интактный дуплекс, четные номера – дуплекс, обработанный BlnI. Значком * выделена меченая олигонуклеотидная цепь. Электрофорез в 20%-ном полиакриламидном геле с 7 М мочевиной

На рисунке 4 представлена электрофореграмма продуктов гидролиза эндонуклеазой BlnI олигонуклеотидов с различным количеством 5-метилцитозинов в сайте узнавания 5'-GCNGC-3'. Как видно из этого рисунка, BlnI эффективно расщепляет последовательность GCNGC при наличии в ней двух (дорожки 2, 4, 8), трех (дорожки 6, 10, 12, 14) или четырех (дорожка 16) 5-метилцитозинов. Следовательно, MD-эндонуклеаза BlnI способна расщеплять узнаваемую последовательность при наличии в ней двух или более 5-метилцитозинов, расположенных в любых возможных комбинациях в последовательности 5'-GCNGC-3'.

На рисунке 5 приведена электрофореграмма продуктов гидролиза эндонуклеазой BlnI олигонуклеотидных дуплексов, содержащих сайт узнавания 5'-ACNGC-3'/3'-TGNGC-5' с двумя и тремя метильными группами. Как можно убедиться на данном рисунке, BlnI эффективно расщепляет обе цепи этой последовательности, если в ней есть два (дорожки 2, 4, 8 и 12) или три (дорожки 6, 10) 5-метилцитозина.

На рисунке 6 приведена электрофореграмма продуктов гидролиза эндонуклеазой BlnI олигонукле-

отидных дуплексов, содержащих последовательность 5'-GTNGC-3'/3'-CANCG-5' с двумя и тремя 5-метилцитозинами. Как видно из этого рисунка, BlnI эффективно расщепляет обе цепи этой последовательности при наличии в ней двух (дорожки 2, 6, 8, 12) и трех (дорожки 4, 10) 5-метилцитозинов.

На рисунке 7 приведены результаты гидролиза ферментом BlnI дуплексов, содержащих сайты 5'-ATNGC-3' (дорожки 2, 4) и 5'-ACNGT-3' (дорожки 6, 8). В качестве положительного контроля на данном рисунке приведен пример полного расщепления дуплекса с последовательностью 5'-G(5mC)GGC-3'/3'-CGC(5mC)G-5' (дорожка 10). Как следует из этого рисунка, последовательность 5'-ATAG(5mC)-3'/3'-TAT(5mC)G-5' эффективно расщепляется эндонуклеазой BlnI по обеим цепям ДНК. В случае же последовательности 5'-ACNGT-3' эффективность гидролиза существенно ниже, причем в случае, когда центральным нуклеотидом N сайта узнавания является комплементарная пара G-C, глубина гидролиза дуплекса наименьшая, не более 1,5% (дорожка 6). Тогда как в случае, если центральный нуклеотид представлен комплементарной

парой А-Т, эффективность гидролиза BslI составляет около 10% (дорожка 8).

На рисунке 8 представлены данные по гидролизу BslI олигонуклеотидных дуплексов, в которых 5-метилцитозин расположен только в одной из цепей узнаваемой последовательности. В качестве контроля активности фермента мы использовали дуплекс N21/N18 с метилированной последовательностью 5'-G(5mC)NG(5mC)-3'/3'-CGN(5mC)G-5' (дорожки 1, 2). Как становится ясным из данного рисунка, BslI способен эффективно расщеплять последовательность 5'-G(5mC)GG(5mC)-3'/3'-CGCCG-5', если на одной из цепей узнаваемой последовательности присутствует два 5-метилцитозина (дорожки 6, 8). Однако, если такая последовательность содержит только один 5-метилцитозин, то не наблюдается сколь-либо значительного гидролиза олигонуклеотидного дуплекса (дорожка 14).

На рисунке 8 также продемонстрированы данные по расщеплению BslI олигонуклеотидного дуплекса, содержащего последовательность 5'-A(5mC)GA(5mC)-3'/3'-TGCTG-5'. Как следует из рисунка, BslI расщепляет обе цепи такого дуплекса (дорожки 10, 12), однако с меньшей эффективностью по сравнению с контролем (дорожки 2, 4).

Заключение

Таким образом, на основании данных, полученных в представленной работе, можно сделать вывод, что BslI расщепляет обе цепи последовательности узнавания 5'-RYNRY-3' при наличии в ней хотя бы двух 5-метилцитозинов. При этом активность фермента зависит от количества и расположения модифицированных цитозинов в сайте узнавания. Наихудшим субстратом MD-эндонуклеазы BslI является последовательность 5'-A(5mC)NGT-3'/3'-TGN(5mC)A-5'.

Литература

1. Чернухин В.А., Журавлева Р.О., Тарасова Г.В., Болтенгаген А.А., Акишев А.Г., Михненко Н.А., Дегтярев С.Х. Штамм бактерии *Cosuria rosea* — продуцент сайт-специфической эндонуклеазы KroI // Патент на изобретение RU 2394099 С1. — 2010.
2. Чернухин В.А., Наякшина Т.Н., Гончар Д.А., Томилова Ю.Э., Тарасова М.В., Дедков В.С., Михненко Н.А., Дегтярев С.Х. Новая сайт-специфическая метилзависимая ДНК эндонуклеаза PkiI узнает и расщепляет метилированную последовательность 5'-GCN^{5mC}GC-3'/3'-CG^{5mC}NCG-5', содержащую не менее трех 5-метилцитозинов // Вестник

- биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2011. — Т. 7. — № 3. — С. 35–42.
3. Чернухин В.А., Наякшина Т.Н., Абдурашитов М.А., Томилова Ю.Э., Мезенцева Н.В., Дедков В.С., Михненко Н.А., Гончар Д.А., Дегтярев С.Х. Новая эндонуклеаза рестрикции GlaI узнает метилированную последовательность 5'-G(5mC)^{5mC}GC-3' // Биотехнология. — 2006. — № 4. — С. 31–35.
4. Чернухин В.А., Наякшина Т.Н., Тарасова Г.В., Голикова Л.Н., Акишев А.Г., Дедков В.С., Михненко Н.А., Дегтярев С.Х. Штамм бактерии *Paracoccus carotinifaciens* ЗК — продуцент сайт-специфической эндонуклеазы Pcs I // Патент на изобретение RU 2377294 С1. — 2009.
5. Чернухин В.А., Томилова Ю.Э., Чмуж Е.В., Соколова О.О., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Сайтспецифическая эндонуклеаза BslI узнает последовательность ДНК 5'-G(5mC)N^{5mC}GC-3' и расщепляет ее с образованием 3'-выступающих концов // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2007. — Т. 3. — № 1. — С. 28–33.
6. Чернухин В.А., Чмуж Е.В., Томилова Ю.Э., Наякшина Т.Н., Гончар Д.А., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Новая сайтспецифическая эндонуклеаза GluI узнает метилированную последовательность ДНК 5'-G(5mC)^{5mC}NG(5mC)-3'/3'-(5mC)GN^{5mC}(5mC)G-5' // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2007. — Т. 3. — № 2. — С. 13–17.
7. Чмуж Е.В., Каширина Ю.Г., Томилова Ю.Э., Мезенцева Н.В., Дедков В.С., Гончар Д.А., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х. Новая эндонуклеаза рестрикции Vis I из *Bacillus subtilis* Т30 узнает метилированную последовательность ДНК 5'-G(m5C)^{5mC}NGC-3' // Биотехнология. — 2005. — № 3. — С. 22–26.
8. Чмуж Е.В., Каширина Ю.Г., Томилова Ю.Э., Чернухин В.А., Охупкина С.С., Гончар Д.А., Дедков В.С., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х. Клонирование генов, сравнительный анализ структуры белков системы рестрикции-модификации Fsp4HI и биохимическая характеристика рекомбинантной ДНК-метилтрансферазы M.Fsp4HI // Молекулярная биология. — 2007. — Т. 41. — № 1. — С. 43–50.
9. Rebase official site <http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>.
10. Tarasova G.V., Nayakshina T.N., Degtyarev S.Kh. Substrate specificity of new methyl-directed DNA endonuclease GlaI // BMC Molecular Biology. — 2008. — Vol. 9. — No. 7. doi:10.1186/1471-2199-9-7.

Список сокращений:
 R — нуклеотид с пуриновым основанием (А или G);
 Y — нуклеотид с пиримидиновым основанием (С или Т);
 п.н. — пары нуклеотидов;
 5mC — 5-метилцитозин;
 SAM — S-аденозил-L-метионин.

**METHYL-DIRECTED SITE-SPECIFIC ENDONUCLEASE B_lI RECOGNIZES
AND CLEAVES THE DNA SEQUENCE 5'-RYNRY-3' IN THE PRESENCE
OF AT LEAST TWO 5-METHYLCYTOSINES**

V.A. CHERNUKHIN, D.A. GONCHAR, J.E. TOMILOVA, A.A. BOLTENGAGEN,
L.N. GOLIKOVA, S.Kh. DEGTYAREV

SibEnzyme Ltd., Novosibirsk

A substrate specificity of methyl-directed site-specific DNA endonuclease B_lI has been studied. B_lI cleaves a degenerate DNA sequence 5'-RYNRY-3' (where R – A or G, and Y – T or C) in the presence of two or more 5-methylcytosines in the recognition site. The efficiency of DNA hydrolysis depends on a number of 5-methylcytosines in the recognition site and their positions. Due to an ability to cleave only methylated sequences B_lI may find a practical application in the molecular biology and epigenetic studies for the evaluation of eucaryotic DNA methylation.

Keywords: methyl-directed site-specific DNA endonucleases, degenerate sequence, methylated DNA.

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ ПОДВИЖНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ КАК СПОСОБ ОЦЕНКИ ФУНКЦИИ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ ПРИ СТРЕССОВЫХ И ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ ОРГАНИЗМА

В.Н. КРЫЛОВ¹, А.В. ДЕРЮГИНА¹, Е.А. АНТИПЕНКО^{2*}

¹ ФГБОУ ВПО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»,

² ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия», Нижний Новгород

Проведено клинико-экспериментальное исследование возможности использования электрофоретической подвижности эритроцитов (ЭФПЭ) в качестве критерия оценки функциональной активности коры надпочечников. Изучена динамика изменения ЭФПЭ и концентрации кортизола при развитии стресс-реакции у крыс и на фоне патологического процесса у больных. Установлено, что выраженность изменения ЭФПЭ соответствует изменению активности коры надпочечников.

Ключевые слова: электрофоретическая подвижность эритроцитов, стресс, кора надпочечников.

Введение

В процессе жизнедеятельности человек систематически подвергается воздействию неблагоприятных факторов среды, что вызывает напряжение функций организма и в дальнейшем может стать причиной развития патологии. Одним из основных факторов, определяющих ответную реакцию организма на экстремальное внешнее воздействие или возникший патологический процесс, является функциональное состояние коры надпочечников. Поэтому своевременное диагностирование этого состояния может повысить эффективность проводимой терапии и реабилитации. В настоящее время известны и широко применяются способы оценки функции коры надпочечников, основанные на биохимическом анализе гормонального состояния организма [2]. Однако данные способы исследования характеризуются сложностью, необходимостью использования специального дорогостоящего оборудования и требуют длительного времени для определения концентрации гормонов. В связи с вышеизложенным актуальность проблемы определяется возможностью выявления функциональной активности коры надпочечников методами информативными и при этом достаточно легко реализуемыми в любой медицинской лаборатории.

Ранее нами было показано, что эффективным критерием выраженности адаптационных реакций организма на экстремальные воздействия является электрофоретическая подвижность эритроцитов [6, 7, 11]. Наличие закономерных изменений электрокинетических свойств эритроцитов в ответ на идущий в организме патологический процесс связано с развитием общего адаптационного синдрома и активацией ведущих гуморально-гормональных систем: симпатoadrenalовой и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой [8].

Целью работы ставилось исследование возможности использования ЭФПЭ в качестве критерия оценки функциональной активности коры надпочечников при стрессорных и патологических состояниях. При этом для верифицирования метода одновременно определяли состояние лейкоцитарной формулы крови и наиболее значимого стресс-реализующего гормона коры надпочечников — кортизола.

Материалы и методы

Экспериментальная часть работы была проведена на 80 белых крысах-самках массой 250–300 г. Основные правила содержания и ухода соответствовали нормативам, данным в Приказе Минздрава России № 267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации». Состояние стресса у животных моделировали воздействием экзотоксина — яда пчел, типичного стресс-агента [8]. Исследовали действие пчелиного яда (внутрибрюшинно, в дозе 0,5 мг/кг) на адреналэктомированных (двусторонняя адреналэктомия)

© 2013 г. Крылов В.Н., Дерюгина А.В., Антипенко Е.А.

* Автор для переписки:

Антипенко Елена Альбертовна

к.м.н., доцент кафедры неврологии, психиатрии и наркологии
Нижегородской государственной медицинской академии

603005 Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1

и интактных крысах. Контролем служили крысы после внутрибрюшинного введения 0,9% хлорида натрия.

Двустороннюю адреналэктомию животным проводили под нембуталовым наркозом (нембутал — внутрибрюшинное введение 35 мг/кг) по стандартной методике [9].

В клинической части работы было проведено обследование пациентов с бронхо-легочными заболеваниями, в частности, с пневмониями крупозной, очаговой, хронической форм (16 человек). Диагноз формулировался в соответствии с общепринятыми клиническими критериями на основании собранного анамнеза и клинических исследований. Лечение больных включало в себя проведение стандартных терапевтических мероприятий. Забор крови у пациентов осуществлялся до и после проведенного курса лечения. Все наблюдавшиеся пациенты получали традиционный курс терапии. Контролем служили 10 человек — здоровые доноры.

В процессе исследования изучали динамику изменения ЭФПЭ крови методом микроэлектрофореза, регистрируя время прохождения эритроцитами расстояния 10 мкм в трис-НСI буфере с рН 7,4 при силе тока 8 мА [5]. Уровень кортизола в плазме крови определяли иммуноферментным способом [10]. Анализ лейкоцитарной формулы проводили с использованием общепринятого метода окрашивания мазков по Романовскому — Гимзе [4].

Статистическая обработка материала проводилась в программе BIOSTAT с применением методов дисперсионного анализа. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Исследование зависимости изменения ЭФПЭ от уровня гормона коры надпочечников (кортизола) в плазме крови при внутрибрюшинном введении крысам экзотоксина (пчелиного яда) показало, что рост ЭФПЭ сочетался с увеличением концентрации кортизола (табл. 1). В частности, к 60–120 мин. эксперимента увеличение ЭФПЭ на 28–32% сопровождалось ростом концентрации кортизола в 2,5–3 раза.

Другим подтверждением связи ЭФПЭ с функцией коры надпочечников являются результаты экспериментов на адреналэктомированных крысах. Эксперименты показали отсутствие значимых изменений ЭФПЭ у крыс с удаленными надпочечниками в ответ на экстремальное воздействие, вызванное внутрибрюшинным введением пчелиного яда (табл. 2).

Таблица 1

Динамика изменения ЭФПЭ и уровня кортизола в крови крыс при внутрибрюшинном введении пчелиного яда

Время после воздействия, мин.	Изучаемые показатели	
	ЭФПЭ (мкм·см/В·с)	Концентрация кортизола (нмоль/л)
0	1,01±0,01	47,77±5,12
60	1,28±0,02*	122,20±8,28*
180	1,32±0,04*	140,40±8,37*

Примечание: * $p \leq 0,05$ по отношению к значениям до воздействия

Таблица 2

Динамика изменения ЭФПЭ (мкм·см/В·с) интактных и адреналэктомированных крыс при внутрибрюшинном введении пчелиного яда

Группа животных	До инъекции	Время после инъекции		
		1 час	1 сутки	1 неделя
Контрольная группа	1,12±0,03	1,13±0,03	1,11±0,03	1,12±0,03
Интактные + пчелиный яд	1,09±0,04	1,29±0,03*#	1,26±0,03*#	1,20±0,03#
Адреналэктомия + пчелиный яд	1,16±0,06	1,14±0,07	1,12±0,07	1,07±0,05

Примечание: * $p \leq 0,05$ по отношению к значениям интактных животных (до инъекции); # $p \leq 0,05$ по отношению к значениям контрольных животных

В соответствии с целью исследования способ оценки функции коры надпочечников был апробирован при исследовании крови больных.

Исследование крови больных выявило уменьшение ЭФПЭ при поступлении их в стационар относительно ЭФПЭ крови доноров (контроль). ЭФПЭ было снижено на 21%, что составило 1,04±0,08 мкм·см/В·с при 1,31±0,06 мкм·см/В·с в контроле. Измерения концентрации кортизола в крови пациентов в этот период показали, что она также находилась на низком уровне (120–280 нмоль/л при норме 150–660 нмоль/л).

В ходе проводимой терапии у пациентов регистрировалось восстановление ЭФПЭ практически до уровня контроля. Так, ЭФПЭ после курса терапии составила $1,29 \pm 0,08$ мкм·см/В·с; при этом концентрация кортизола увеличивалась ($410\text{--}590$ нмоль/л) — до среднего и высокого уровня показателей нормы.

При анализе лейкоцитарной формулы крови больных установлено, что увеличение ЭФПЭ после окончания курса терапии совпадало с изменением соотношения ее элементов, характерных для выздоравливающего организма и обеспеченных изменением уровня стресс-реализующих гормонов [1, 3].

Из таблицы 3 следует, что если до лечения регистрировалось снижение количества лимфоцитов (ниже 19,5%) и повышение числа сегментоядерных нейтрофилов (73,33%), то после лечения количество лимфоцитов увеличивалось до 28,35%, а сегментоядерных нейтрофилов — уменьшалось до 64%. Указанные изменения характеризуют развитие как стресс-реакции в организме, низкого уровня реактивности, напряжения, с элементами повреждения и десинхронизации в работе подсистем (до лечения), так и развитие адаптивного состояния активации с повышением общей резистентности организма (после лечения).

Таблица 3

Изменение клинических показателей крови больных с пульмонологическими заболеваниями

Показатели	До лечения	После лечения
Гемоглобин (г/л)	$131,00 \pm 4,12$	$123,00 \pm 6,73$
Эритроциты ($\times 10^{12}/\text{л}$)	$5,03 \pm 1,01$	$4,42 \pm 0,64$
СОЭ (мм/ч)	$41,33 \pm 2,71$	$33,00 \pm 4,51^*$
Лейкоциты ($\times 10^9/\text{л}$)	$11,20 \pm 0,64$	$9,67 \pm 0,50^*$
Палочкоядерные (%)	$3,34 \pm 0,84$	$1,98 \pm 0,73$
Сегментоядерные (%)	$73,33 \pm 2,62$	$64,00 \pm 3,23^*$
Моноциты (%)	$4,00 \pm 0,57$	$5,67 \pm 0,69^*$
Лимфоциты (%)	$19,33 \pm 7,42$	$28,35 \pm 5,04^*$

Примечание: * $p \leq 0,05$ по отношению к уровню показателей до лечения

Заключение

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об информативности исследования ЭФПЭ в качестве критерия оценки функциональной активности коры надпочечников в условиях стресса и патологии. Анализ ЭФПЭ позволяет выявить изменение функциональной активности надпочечниковой системы на субклиническом уровне и диагностировать направленность процессов, связанных с развитием или угнетением неспецифической резистентности организма.

Литература

1. Булгакова О.С., Баранцева В.И. Общий клинический анализ крови как метод определения постстрессорной реабилитации // Успехи соврем. естествознания. — 2009. — № 6. — С. 22–27.
2. Васильева Т.И., Подковкин В.Г., Чикина Е.Л. Биохимическая оценка функционального состояния кору надпочечников // Вестник СамГУ. — 2002. — № 4. — С. 137–143.
3. Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б. О критериях оценки неспецифической резистентности организма при действии различных биологически активных факторов с позиции теории адаптационных реакций // Миллиметровые волны в биологии и медицине. — 1995. — № 6. — С. 11–21.
4. Камышников В.Ф. Справочник по клинико-химической лабораторной диагностике. — Минск: Беларусь, 2002. — 463 с.
5. Козинец Г.И. Интерпретация анализов крови и мочи и их клиническое значение. — М.: Трида Х, 1998. — 104 с.
6. Крылов В.Н., Дерюгина А.В. Типовые изменения электрофоретической подвижности эритроцитов при стрессовых воздействиях // Бюлл. эксп. биол. и мед. — 2005. — Т. 139. — № 4. — С. 364–366.
7. Крылов В.Н., Дерюгина А.В., Антипенко Е.А. Типовые изменения электрофоретической подвижности эритроцитов и их фосфолипидный состав при разных заболеваниях // Клиническая лабораторная диагностика. — 2009. — № 9. — С. 37–40.
8. Крылов В.Н., Густов А.В., Дерюгина А.В. Электрофоретическая подвижность эритроцитов и стресс // Физиология человека. — 1998. — Т. 24. — № 6. — С. 108–111.
9. Лазарев Н.В. Воспроизведение заболеваний у животных для экспериментально-терапевтических исследований. — Л.: Медгиз, 1954. — 392 с.
10. Ткачева Г.А., Балаболкин М.И., Ларичева И.П. Радионуклеохимические методы исследования. — М.: Медицина, 1983. — 192 с.
11. Krylov V.N., Goustov A.V., Antipenko E.A., Derugina A.V. Erythrocytes functions parameters changing under apitherapy of neurological patients // Mellifera. — 2007. — Vol. 7. — No. 13–14. — P. 27–32.

THE ELECTROPHORETIC MOBILITY OF RED BLOOD CELLS AS A WAY TO ASSESS THE FUNCTION OF THE ADRENAL CORTEX IN STRESS AND PATHOLOGICAL STATES OF THE ORGANISM

V.N. KRYLOV¹, A.V. DERYUGINA¹, E.A. ANTIPENKO²

¹ *N.I. Lobachevsky Nizhny Novgorod State University,*

² *Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod*

A clinical and experimental study of the possibility of using the red blood cells electrophoretic mobility (RBC EPM) as a criterion for assessing the functional activity of the adrenal cortex was carried out. The dynamics of change RBC EPM and cortisol concentrations during the development of the stress response in rats and on the background of the pathological process in patients was investigated. It was found that the severity of the changes RBC EPM corresponds to the change of activity of the adrenal cortex.

Keywords: electrophoretic mobility of red blood cells, stress, the adrenal cortex.

СКРИНИНГ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ – ПРОДУЦЕНТОВ БИОВОДОРОДА

Э.Р. САДРАДДИНОВА¹, А.И. ШЕСТАКОВ^{2*}, С.М. АБРАМОВ¹,
Л.А. КОШКАРОВА¹, Т.И. МИТРОФАНОВА¹, Р.Г. ВАСИЛОВ², А.И. НЕТРУСОВ¹

¹ Биологический факультет, ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,

² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

В работе подобраны оптимальные условия и субстрат для скрининга и отбора наиболее продуктивных по водороду целлюлозолитических микробных сообществ. Выделено 6 наиболее активных целлюлозолитических сообществ, из которых 3 отличаются высокой водород-продуктивностью, которые в дальнейшем можно использовать для разработки технологии переработки целлюлозосодержащих органических отходов в водород и летучие жирные кислоты. Для отобранных микробных сообществ показана стабильность в продукции водорода в течение длительного периодического культивирования (>160 сут.), а также определен состав выделенных микробных сообществ методом денатурирующего градиентного гель-электрофореза с последующим секвенированием.

Ключевые слова: биоэнергетика, биоводород, микробные сообщества, скрининг.

Введение

По пессимистичным прогнозам организации стран-экспортеров нефти (ОПЕК), запасы нефти в промышленно развитых странах иссякнут уже в ближайшем будущем. В России разведанных запасов нефти хватит до 2025–2030 годов, а запасов газа — до 2085–2095 гг. Мировые цены на нефть практически непрерывно повышаются, и прогнозируется их дальнейший рост. В этих условиях использование в промышленности, на транспорте, в сельском хозяйстве, других секторах экономики России топлив ненефтяного происхождения (альтернативных топлив) становится не только необходимым, но и экономически оправданным.

В последние годы повышенный интерес проявляется к топливам, получаемым из возобновляемых энергетических ресурсов животного и растительного происхождения, сырьевые запасы которых практически не ограничены [1–4]. Цена этих топлив соизмерима с ценой топлив нефтяного происхождения, а в ряде случаев — даже ниже цен на традиционные моторные топлива.

Биоводород как топливо имеет важнейшее преимущество. В пользу этого можно привести тот факт, что использование водорода в качестве источника энергии исключает выделение в окружающую среду парниковых газов и других видов загрязнения. Кроме того, к его достоинствам можно отнести существенное снижение выброса CO₂ в атмосферу и независимость от углеводородного и иных видов сырья. Выбор водорода как энергоносителя определяется его исключительно высокой теплотой сгорания, а также практически неисчерпаемыми запасами сырья (сахара растительного происхождения, вода и др.) [5]. Проблемы получения водорода и утилизации отходов можно одновременно решить с помощью использования водород-образующих микроорганизмов. В случае переработки отходов в биоводород можно было бы провести обеззараживание исходного сырья, что позволяло бы в дальнейшем безопасно применять продукты конверсии в качестве удобрений и кормовых добавок.

Исходя из вышеизложенного, следует считать крайне актуальными и своевременными исследования, посвященные разработке системы получения водорода с помощью микроорганизмов из органических отходов, и использованию водорода в качестве топлива.

Материалы и методы

Скрининг и отбор образцов. Целлюлозолитические водород-образующие микробные сообщества выделяли из различных экологических ниш, в которых

© 2013 г. Садрадинова Э.Р., Шестаков А.И., Абрамов С.М., Кошкарлова Л.А., Митрофанова Т.И., Васильев Р.Г., Нетрусов А.И.

* Автор для переписки:

Шестаков Андрей Иннокентьевич

ведущий инженер Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»

Тел./факс: +7 (495)939-56-05

E-mail: b.ok.off@mail.ru

визуально происходил процесс разложения целлюлозы. Отобраны образцы: налета на растениях приболоченной части пресноводного водоема; ила закрытого пресного водоема; разложившиеся образцы камыша (прикорневая часть, корни); опада полуразложившейся листвы из лесного водоема; содержимого кишечника различных видов тараканов (американского, мадагаскарского, черного, туркестанского); содержимого кишечника термитов; дождевого червя (целиком, включая содержимое кишечника), а также образцы экскрементов антилопы гну, зебры, жирафа, черной антилопы, пони, слона, пулированные пробы экскрементов коров, образцы содержимого горячих гейзеров из Долины гейзеров на полуострове Камчатка и из горячих гейзеров на острове Исландия и т.д. Пробы отбирали из ниш, характеризующихся различными температурными условиями. Отбор проб проводили анаэробно в стерильные герметичные флаконы. Всего было отобрано 50 образцов.

Для выделения и культивирования сообществ анаэробных водород-производящих целлюлозолитических микроорганизмов были использованы питательные среды Имшенецкого и DSM, приготовленные по стандартной методике [7], и послеспиртовая барда в нативном виде (отход спиртопроизводящего завода в Тверской области). В качестве источника углерода и энергии использовали фильтровальную бумагу и хлопчатобумажную марлю в количестве 15 г/л. В случае культивирования на послеспиртовой барде последняя являлась одновременно и субстратом.

Температура культивирования образцов определялась задачей эксперимента. Всего было выбрано 4 температурных режима — 37, 55, 60 и 70 °С. Длительность культивирования культур — 7 суток.

За динамикой роста культур следили по степени деструкции субстрата, по динамике накопления продуктов культивирования (как жидких, так и газообразных) и снижению рН среды.

Анализ метаболитов проводили методом газовой хроматографии на хроматографе Кристалл 2000 М (Россия) с детектором — ДТП, колонкой 1000×3 мм, сорбентом — активированным углем и газом носителем — аргоном. Концентрацию газа измеряли при атмосферном давлении. Избыточное давление во флаконах, образовавшееся во время культивирования, измеряли манометром и учитывали при подсчете конечной концентрации продукта. Определение состава летучих жирных кислот (ЛЖК) в культуральной жидкости проводили на том же приборе, оснащенном микрокапиллярной колонкой ZB-FFAP (Zebron, США; 15 м × 0,32 мм). Газ-носитель — азот,

детектор — пламенно-ионизационный детектор (ПИД), температура испарителя — 200 °С. Измерения проводили в условиях температурного градиента в термостате колонок от 70 до 160 °С. Результаты хроматографии были обработаны при помощи программного обеспечения Chromatec Analytic 2.5 (Хроматэк, Россия).

Морфологию и разнообразие компонентов сообщества изучали с помощью методов световой и электронной микроскопии в световом микроскопе МЛ-2 и сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) Camscan S2 (Кембридж, Великобритания) с максимальным оптическим разрешением 10 нм и рабочим напряжением до 20 кВ. В качестве материала напыления использовали золото или платину.

Изучение состава сообществ проводили методом денатурирующего градиентного гель-электрофореза (ДГГЭ) по разработанной методике [6] с дальнейшим сиквенсом выделенной ДНК. Сиквенс ДНК проводили в компании «Евроген» (Москва). Полученные хроматограммы расшифровывали с помощью программы Chromas Lite (Technelysium Pty Ltd). Идентификацию осуществляли путем сравнения полученных последовательностей нуклеотидов с базой данных NCBI (National Center for Biotechnology Information — Национальный центр биотехнологической информации, Бетесда, США).

Результаты и обсуждение

Скрининг водород-производящих целлюлозолитических микробных сообществ. Скрининг сообществ проводили по двум параметрам — оптимальная температура культивирования и используемый субстрат.

Скрининг по температуре культивирования. В результате высева отобранных образцов на селективную среду Имшенецкого и культивировании их при температуре 37 и 60 °С были получены водород-производящие сообщества, использующие целлюлозосодержащий субстрат в качестве единственного источника углерода. В процессе культивирования и мониторинга выделившихся газовых метаболитов отбирали наиболее активные сообщества, максимально эффективно разлагающие целлюлозу с выделением максимального количества водорода. Таким образом было выделено 17 целлюлозолитических сообществ из следующих биотопов (рис. 1).

Из рисунка 1 видно, что при 60 °С процесс образования водорода идет более интенсивно, чем при 37 °С. Следовательно, температура оказывает критическое влияние на водород-продуцирующую активность целлюлозолитических сообществ.

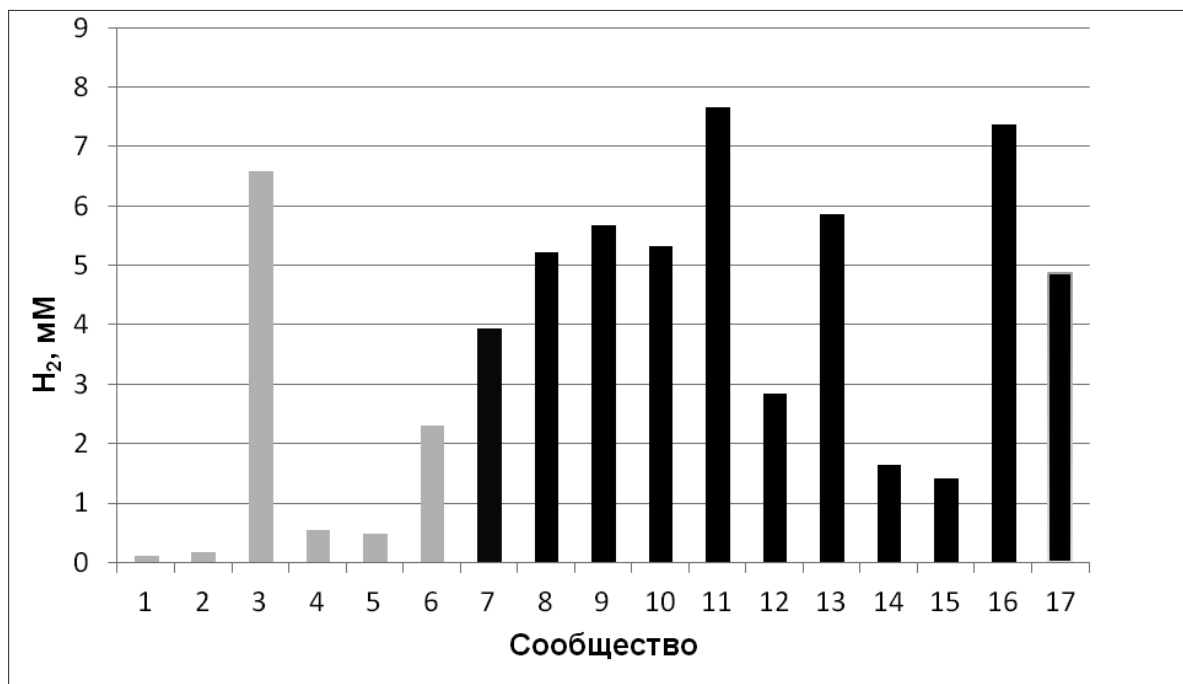


Рис. 1. Образование водорода выделенными целлюлозолитическими сообществами за 7 суток культивирования после 5-го пересева из образцов: 1 – рабочие особи *Macrothermitidae* sp. (37 °С); 2 – особи-солдаты *Macrothermitidae* sp. (37 °С); 3 – ЖКТ коровы (37 °С); 4 – зона разложения древесины 2 (37 °С); 5 – зона разложения древесины 3 (37 °С); 6 – взрослые особи *Tineola granella* (37 °С); 7–11 – ЖКТ коровы (60 °С); 12 – пресный водоем (60 °С); 13 – почва (60 °С); 14 – слепая кишка крысы (60 °С); 15 – куколки *Tineola granella* (60 °С); 16 – ЖКТ коровы (60 °С); 17 – экскременты коровы (60 °С). Среда Имшенецкого с фильтровальной бумагой

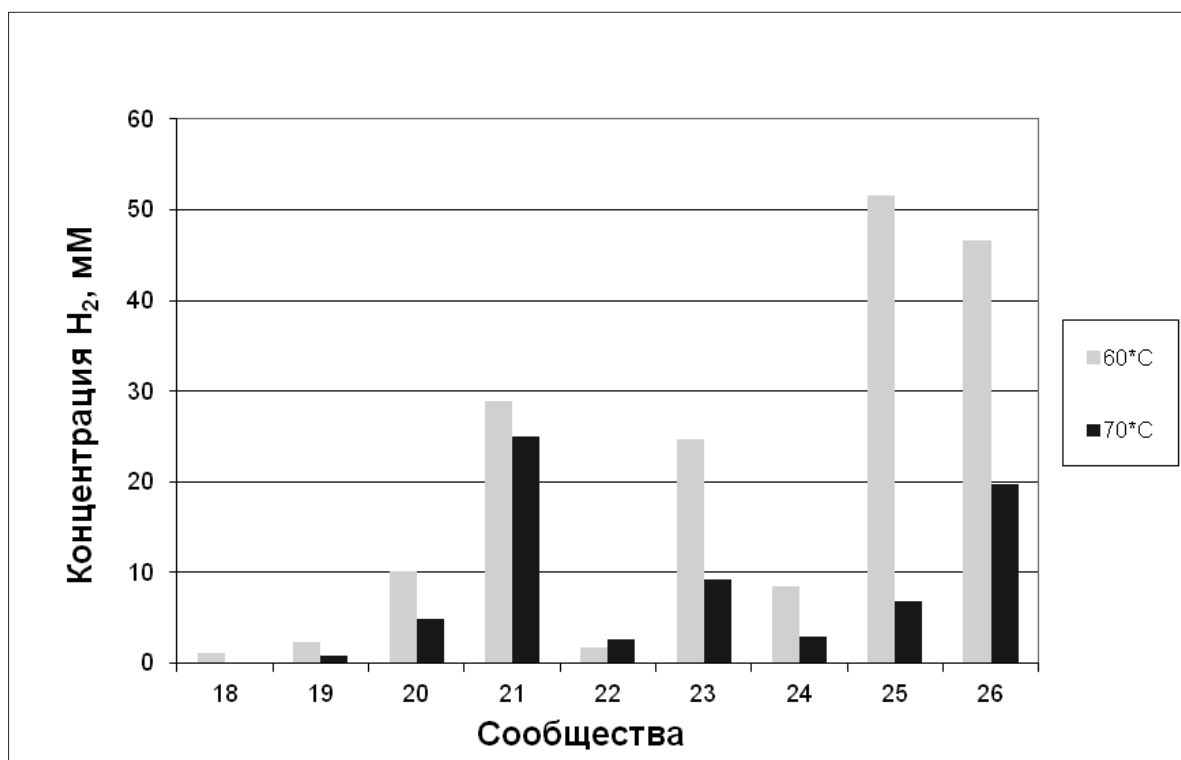


Рис. 2. Сводная диаграмма образования газов выделенными сообществами при 60 и 70 °С. Сообщества 18–20 – образцы целлюлозосодержащих органических отходов. Сообщества 21–25 – симбионтная микробиота пищеварительного тракта жвачных животных и насекомых. Сообщество 26 – донные осадки пресного водоема. Среда Имшенецкого с фильтровальной бумагой

В то же время некоторые сообщества микроорганизмов (например, выделенные из ЖКТ коровы) образуют примерно одинаковое количество водорода как при 37, так и при 60 °С.

Также проводили сравнение температурного оптимума продуктивности термофильных культур при росте на среде с целлюлозой при 60 и 70 °С. Результаты приведены на рисунке 2.

Как видно из представленных диаграмм (рис. 2), наиболее продуктивными оказались сообщества № 21, 25 и 26, то есть симбионтная микробиота пищеварительного тракта животных (корова и пони) и образцы донных осадков пресного водоема.

На рисунках 1 и 2 показано, что образование водорода сообществами при 60 °С, за некоторым исключением, превосходит в 2–3 раза таковое при других температурных режимах при одинаковой длительности культивирования сообществ. По этой причине дальнейшее культивирование вели при 60 °С.

Скрининг по субстрату культивирования. В случае высева образцов на среду Имшенецкого в качестве субстрата использовали вместо фильтровальной бумаги (как в предыдущем разделе) марлевую хлопчатобумажную ткань. Субстратом для отбора активных

сообществ на послеспиртовой барде являлась твердая фракция барды, стартовый рН среды в этом случае был равен 4,3. Соответственно целью в первую очередь стояло получение ацидофильных продуцентов, способных активно расти на таком комплексном субстрате, как послеспиртовая барда.

На рисунке 3 представлены результаты измерений концентрации водорода полученных сообществ, образованных за 7 суток культивирования после второго последовательного пересева.

Несмотря на заметно отличающуюся продуктивность по водороду сообществ № 28, 36 и 37 на момент второго пересева культур, с дальнейшими пересевами она резко снижалась, однако целлюлозолитическая активность сообществ при этом не уменьшалась. Следовательно, полученные сообщества можно в дальнейшем использовать как активные деструкторы реальных органических отходов заводов, но не в качестве продуцентов биоводорода. Целевыми продуктами переработки барды в таком случае могут быть органические кислоты, которые не репрессируют процесс брожения. Однако для этих сообществ необходимо провести анализ жидких продуктов разложения барды, прежде чем говорить об их эффективности в данном качестве.

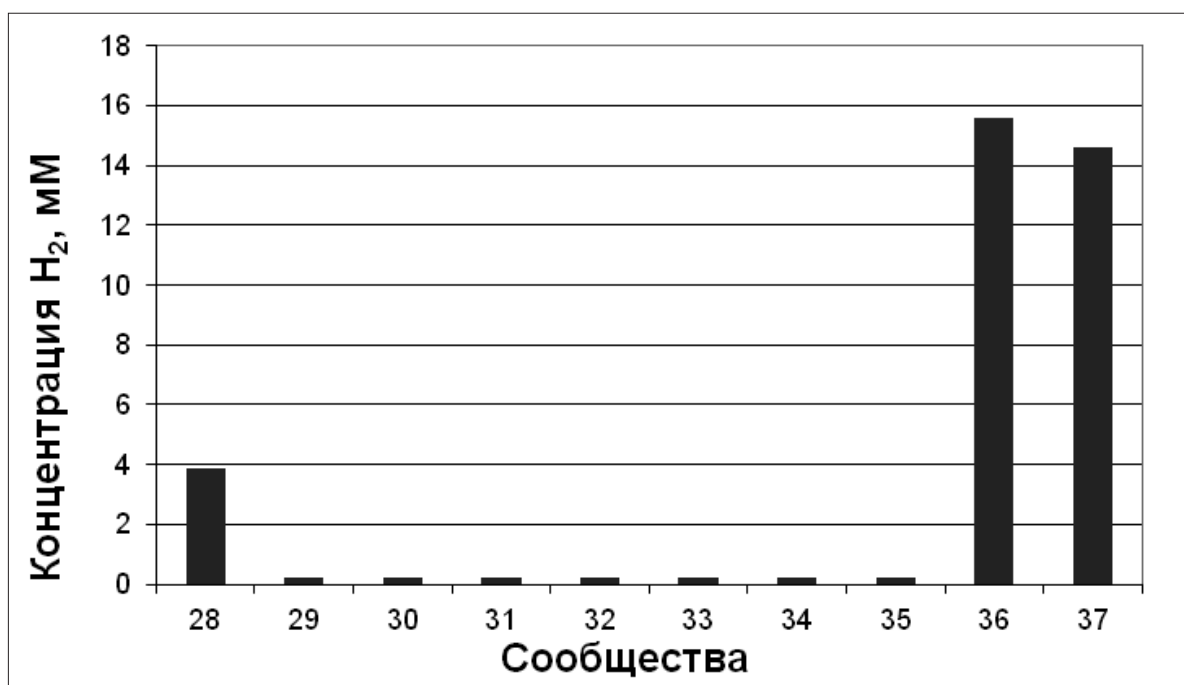


Рис. 3. Образование водорода выделенными целлюлозолитическими сообществами за 7 суток культивирования после 2-го пересева из образцов: 28 — сброженная послеспиртовая барда, полученная из пресного водоема, в который осуществляется сброс сточных вод спиртового завода; 29–32 — образцы компоста пищевых отходов различного возраста; 33 — образец экскрементов бобра; 34 — образец из термального источника в районе горы Машук (город Пятигорск); 35 — образец экскрементов черной антилопы из Московского зоопарка; 36 — образец налета на водных растениях (территория лесного массива «Серебряный бор»); 37 — образец куриного помета (птицеферма в Московской области)

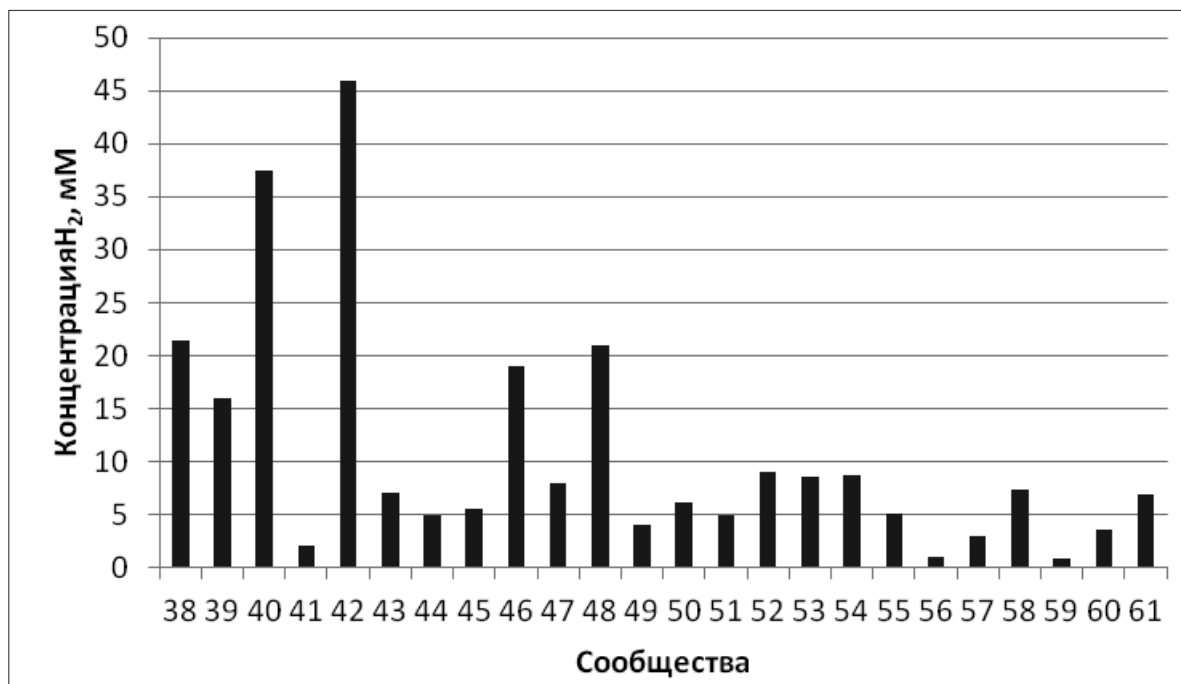


Рис. 4. Диаграмма продукции водорода полученными целлюлозолитическими сообществами при культивировании отобранных образцов в течение 7 суток при 55 °С на среде Имшенецкого с хлопчатобумажной марлевой тканью. Сообщества 38, 39, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55 — получены из образцов экскрементов травоядных животных; сообщества 40, 41, 44, 47 — получены из образцов останков древесных растений; сообщества 42, 43, 56, 58 — образцы из термальных источников и болот; сообщества 45, 46, 48, 57, 59, 60, 61 — образцы почв с органическими остатками

Параллельно проводили культивирование отобранных образцов на среде Имшенецкого с марлевой хлопчатобумажной тканью в качестве субстрата. На рисунке 4 представлены результаты измерений концентрации водорода полученных сообществ, образованных за 7 суток культивирования после второго последовательного посева.

Из данных, приведенных на рисунке 4, можно заключить, что наибольшее количество водорода образовано сообществами № 38, 40, 42, 48. Пробы № 41, 56, 57, 59, 60 были отбракованы из-за низкой целлюлозолитической активности — около 5%. Таким образом, имеются основания заключить, что скрининг водород-производящих целлюлозолитических сообществ прошел успешно на среде Имшенецкого с марлевой тканью в качестве субстрата.

Из проведенных опытов можно выделить два основных метода скрининга культур микроорганизмов для отбора наиболее водород-продуктивных сообществ — культивирование предпочтительнее проводить при 60 °С и на среде Имшенецкого с фильтровальной бумагой или хлопчатобумажной тканью в качестве единственного субстрата. В результате скрининга было отобрано три наиболее продуктивных по водороду микробных сообщества: сообщество 21 — образец коровьего навоза,

сообщество 25 — образец навоза пони, сообщество 26 — образец донных осадков пресного водоема.

Анализ жидких метаболитов наиболее активных выделенных сообществ. Для отобранных наиболее активных микробных сообществ был изучен состав ЛЖК в культуральной жидкости. Помимо этого, был исследован состав ЛЖК для наиболее активных целлюлозолитических сообществ, полученных на послеспиртовой барде. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

Продукты разложения целлюлозы полученными активными сообществами при культивировании на средах с фильтровальной бумагой (сообщества № 21, 25, 26) и на послеспиртовой барде (сообщества № 28, 36, 37)

Сообщество №	Ацетат (ммМ)	Пропионат (ммМ)	Бутират (ммМ)
21	48,054	21,024	26,868
25	45,747	20,049	28,897
26	14,725	6,964	7,709
28	117,293	15,266	0,217
36	150,279	14,093	0,126
37	148,46	7,62	0,07

Анализируя данные, представленные в таблице 1, можно сделать вывод, что выдвинутая ранее теория об использовании микробных сообществ, выделенных на послеспиртовой барде, в технологии переработки промышленных органических отходов в ЛЖК подтверждается количеством образованных кислот. Также, несмотря на то, что образцы, из которых получены сообщества 21 и 25, являются образцами симбионтной микробиоты различных животных, видно, что продукты брожения в этих сообществах сходны по составу и количеству. Это наводит на мысль о схожем компонентном составе данных сообществ.

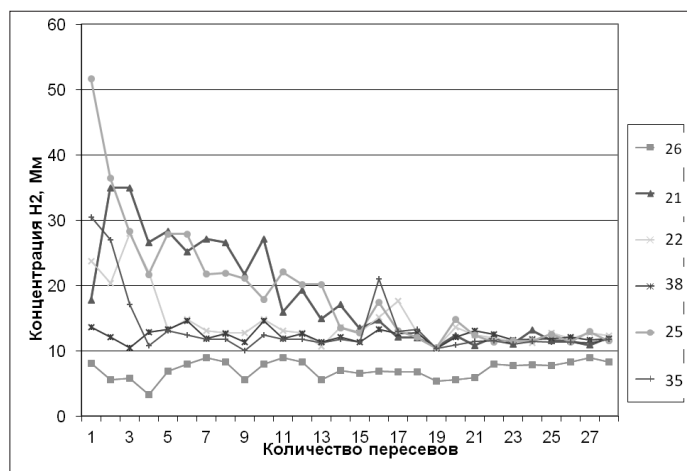


Рис. 5. Динамики образования водорода наиболее активными накопительными культурами на целлюлозе в течение длительного времени (более 4000 часов) при периодическом режиме культивирования на среде Имшенецкого с фильтровальной бумагой. Сообщество 21 — образец коровьего навоза. Сообщество 22 — образец коровьего навоза (другой экземпляр). Сообщество 25 — образец навоза пони. Сообщество 26 — образец донных осадков пресного водоема. Сообщество 35 — образец навоза черной антилопы. Сообщество 38 — образец слоновьего навоза

Исследование состава выделенных сообществ с помощью метода ДГГЭ. Одной из важных характеристик микробных сообществ является их стабильность при длительном культивировании. Для оценки этой характеристики у полученных консорциумов термофильных целлюлозолитиков, культуры вели длительное время (более 8 месяцев) с регулярными пересевами на свежую среду. Ниже на рисунке 5 представлены результаты данного эксперимента.

Из рисунка 5 следует, что уже после девяти пересевов сообщества показывают стабильность в росте и продукции водорода. Надо отметить, что на начальном этапе культивирования сообществ (около пяти пересевов)

большинство образцов симбионтной микрофлоры животных характеризовалось высокой степенью образования водорода (сообщества № 21, 22, 25, 38). Однако далее наблюдается снижение продуктивности сообществ от пересева к пересеву до постоянных величин. Это можно объяснить тем фактом, что при засеве исходных образцов, вместе с микроорганизмами в среду попадало большое количество питательных веществ, находящихся в инокуляте, которые микроорганизмы и использовали для роста и образования водорода в первую очередь. От пересева к пересеву количество легкодоступных питательных веществ сокращалось, и среда постепенно обеднялась. Таким образом, примерно к девятому пересеву все сообщества находились в равных условиях по составу среды.

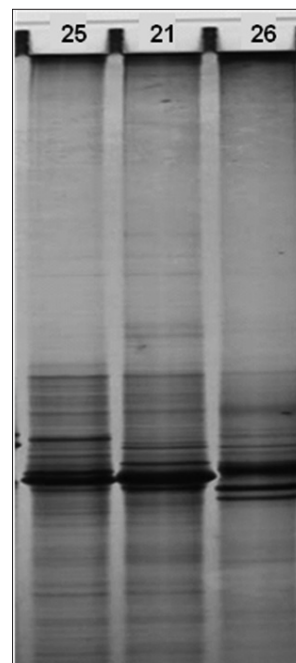


Рис. 6. Результаты анализа ДГГЭ на состав полученных консорциумов термофильных целлюлозолитических продуцентов водорода. Сообщество 21 — симбионтная микробиота пищеварительного тракта коровы, сообщество 25 — симбионтная микробиота пищеварительного тракта пони, сообщество 26 — донные осадки пресного водоема

Помимо продуктивности, крайне интересным является вопрос о составе полученных сообществ и определении групп микроорганизмов, образующих данные консорциумы. С этой целью был проведен анализ трех наиболее активных сообществ, отличающихся происхождением и средой обитания полученных консорциумов, используя метод ДГГЭ с последующим секвенированием наиболее выделяющихся групп микроорганизмов.

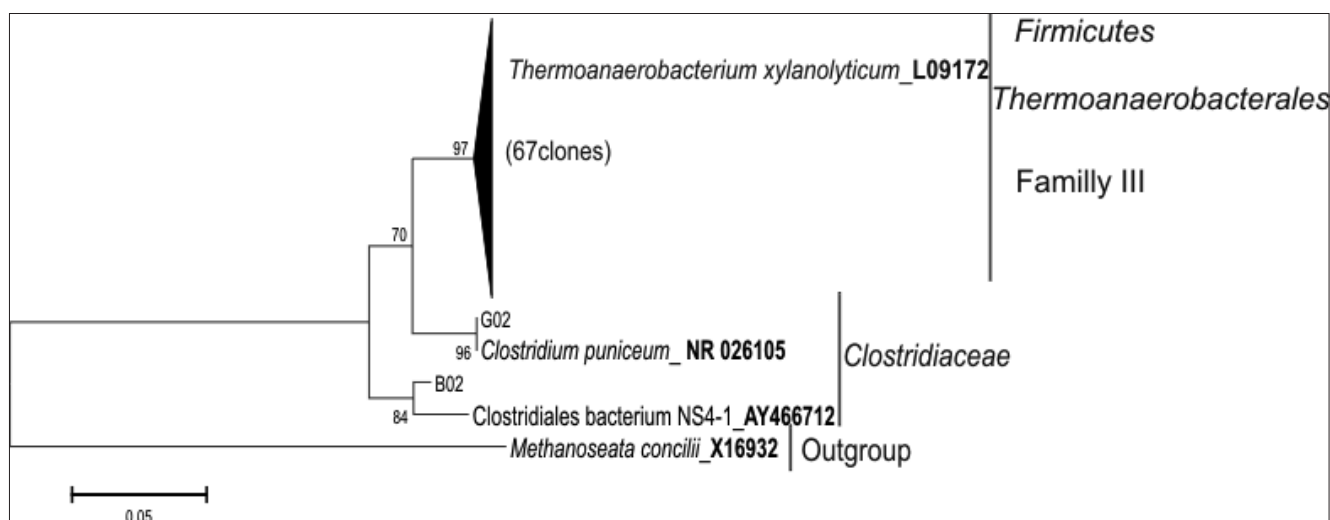


Рис. 7. Результат секвенирования наиболее выделяющихся групп микроорганизмов в полученных сообществах. Масштаб — 5 нуклеотидных замен на 100 оснований

Был использован метод ДГГЭ с последующим секвенированием вырезанных полосок. После обработки данных по сиквенсам были построены филогенетические деревья для выбранных образцов. Результаты анализа приведены на рисунках 6 и 7.

Как можно наблюдать, визуально сообщества 21 и 25 близки по группам входящих в них микроорганизмов. Это вполне объяснимо, учитывая происхождение образцов (оба сообщества являются симбионтной микробиотой животных в отличие от сообщества 26, которое является образцом донных осадков водоемов).

Результат расшифровки микроорганизмов для анализируемых образцов оказался неожиданным, так как большинство различных полос, соответствующих различным фрагментам ДНК, полученным на геле, было идентифицировано с таксоном *Thermoanaerobacterium*, который, как видно, является преобладающим в сообществах.

Данный метод не дает возможности производить видовую идентификацию микроорганизмов по причине коротких идентифицированных фрагментов ДНК. Точнее анализ может быть сделан с помощью клонирования, хотя его применение позволит лишь детализировать картину и получить некоторые уточнения. Очевидно, что преобладающим таксоном является *Thermoanaerobacterium*.

Помимо указанного рода, в сообществах значительное место занимали таксоны *Clostridium*, *Caldanaerovigra*, *Ferridicola* (см. рис. 7).

Изучение морфологии выделенных сообществ.

Выделенные активные сообщества были исследованы с помощью сканирующей электронной микроскопии

(СЭМ) с целью выявления наиболее типичных морфотипов культур. Полученные электронно-микроскопические фотографии приведены на рисунках 8–11.

Можно отметить, что члены сообщества образуют небольшие скопления клеток вокруг частиц целлюлозы. На рисунке 11 более всего заметно, что эти скопления погружены в своеобразный матрикс. Необходимо подчеркнуть, что клетки микроорганизмов находятся и на поверхности целлюлозных частиц.

Исследование сообществ при помощи методов световой микроскопии показало, что в сообществах имеются подвижные формы микроорганизмов. Также были обнаружены спорообразующие клетки.

В результате изучения препаратов было установлено, что в сообществах преобладают палочки разных размеров, которые условно можно разделить на длинные тонкие палочки и короткие толстые палочки. Также на некоторых препаратах можно было наблюдать кокковые формы. На концах некоторых палочек были споры (плектридиальный тип образования спор) (рис. 12, 13).

Заключение

В результате проведенной работы было отобрано 50 образцов из природных источников. Получено 61 сообщество микроорганизмов, из которых выделено 3 наиболее активных анаэробных целлюлозолитических сообщества термофильных микроорганизмов (№ 21, 25 — симбионтная микробиота пищеварительного тракта жвачных животных и № 26 — донные осадки пресного водоема). Наибольшая целлюлозолитическая активность

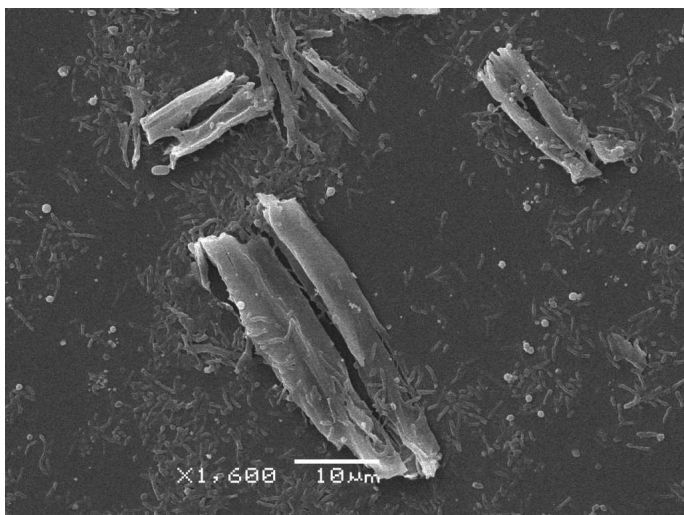


Рис. 8. Фотография в сканирующем электронном микроскопе ($\times 1600$) термофильного целлюлозолитического сообщества № 21 на среде с фильтровальной бумагой

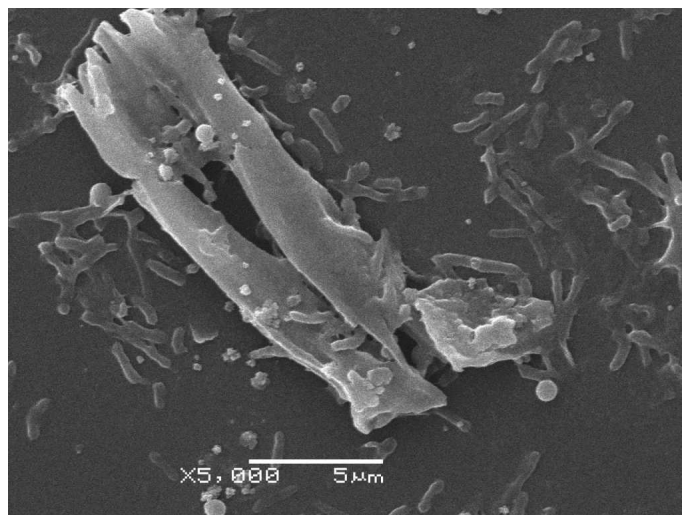


Рис. 9. Увеличенный фрагмент рисунка 8 (правый верхний угол). Фотография в СЭМ ($\times 5000$) термофильного целлюлозолитического сообщества № 21 на среде с фильтровальной бумагой

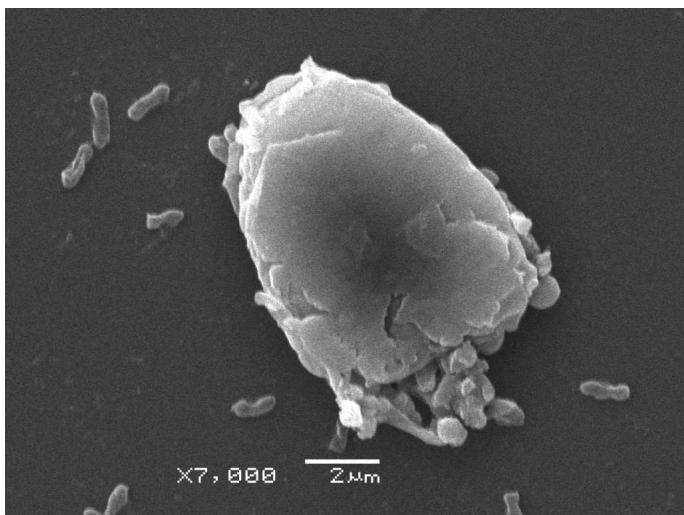


Рис. 10. Электронно-микроскопическая фотография (СЭМ — $\times 7000$) термофильного целлюлозолитического сообщества № 26 на среде с фильтровальной бумагой

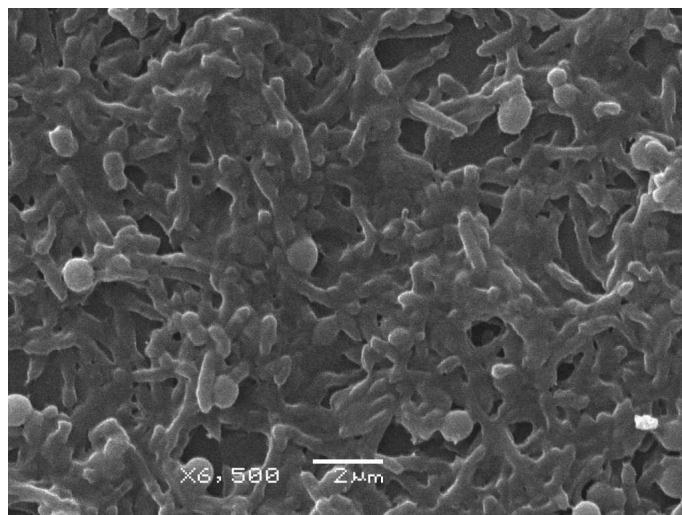


Рис. 11. СЭМ-фотография ($\times 6500$) термофильного целлюлозолитического сообщества № 26 на среде с фильтровальной бумагой

была зафиксирована у сообществ № 21, 25, 26, 28, 36 и 37.

В качестве моделей целлюлозосодержащих отходов для разложения были апробированы следующие субстраты — фильтровальная бумага, хлопчатобумажная марлевая ткань, послеспиртовая барда. Наибольшая целлюлозолитическая и водород-производящая активность наблюдались на субстратах — фильтровальная бумага и хлопчатобумажная марлевая ткань. Наиболее оптимальная температура для отбора и культивирования сообществ — $60\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Выражаем благодарность за помощь в проведении исследований Центру коллективного пользования МГУ и лично к.б.н. Г.Н. Давидовичу, руководителю лаборатории электронной микрокопии МГУ имени М.В. Ломоносова.

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

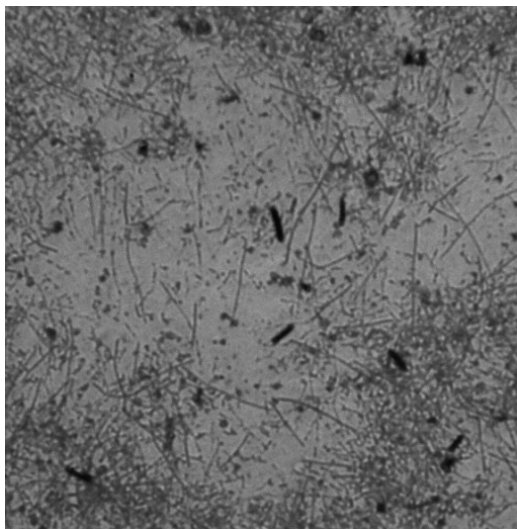


Рис. 12. Светооптическая морфология клеток целлюлолитического сообщества № 21 на среде с фильтровальной бумагой

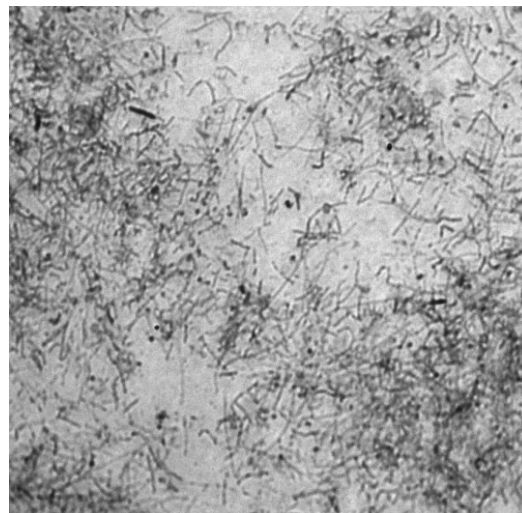


Рис. 13. Микроструктура клеток целлюлолитического сообщества № 26 на среде с фильтровальной бумагой, Световая микроскопия

Литература

1. Васильев Р.Г. Перспективы развития производства биотоплива в России. Сообщение 1: биодизель // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2007. – Т. 3. – № 1. – С. 47–54.
2. Васильев Р.Г. Перспективы развития производства биотоплива в России. Сообщение 2: биоэтанол // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2007. – Т. 3. – № 2. – С. 50–60.
3. Васильев Р.Г. Перспективы развития производства биотоплива в России. Сообщение 3: биогаз // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2007. – Т. 3. – № 3. – С. 54–61.
4. Васильев Р.Г. Перспективы развития производства биотоплива в России. Сообщение 4: биоводород // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2009. – Т. 5. – № 1. – С. 35–41.
5. Карякин А., Морозов С. Топливо XXI века // В мире науки. – 2006. – № 1. – С. 82–86.
6. Merkel A.Y., Huber J.A., Chernyh N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Lebedinsky A.V. Detection of putatively thermophilic anaerobic methanotrophs (ANMEs) in diffuse hydrothermal vent fluids // Appl. Environ. Microbiol. – 2013. – Vol. 79(3). – P. 915–923.
7. Netrusov A., Abramov S., Sadraddinova E., Shestakov A., Shalygin M., Teplyakov V. Membrane-assisted separation of microbial gaseous fuels from renewable sources // Desalination and Water Treatment. – 2010. – Vol. 14. – P. 252–258.

SCREENING OF MICROBIAL COMMUNITIES – PRODUCING BIOHYDROGEN

E.R. SADRADDINOVA¹, A.I. SHESTAKOV², S.M. ABRAMOV¹,
L.A. KOSHKAROVA¹, T.I. MITROFANOVA¹, R.G. VASILOV², A.I. NETRUSOV¹

¹ Faculty of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University,

² National Research Center «Kurchatov Institute», Moscow

In this paper select the optimal conditions and a substrate for screening and selection of the most productive in hydrogen cellulolytic microbial communities. Identified six of the most active cellulolytic community, three of which are highly hydrogen productivity, which can then be used to develop technologies for processing of cellulose-organic wastes into hydrogen and volatile fatty acids. For the selected microbial communities has shown stability in the production of hydrogen for a long batch culture (more than 160 days), and to determine the composition of microbial communities isolated by denaturing gradient gel electrophoresis, followed by sequencing.

Keywords: bio-energy, biohydrogen, microbial community screening.

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОЦЕССА ТЕРМОФИЛЬНОЙ МИКРОБНОЙ КОНВЕРСИИ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ В БИОВОДОРОД

Э.Р. САДРАДДИНОВА¹, А.И. ШЕСТАКОВ^{2*}, С.М. АБРАМОВ¹, В.И. ФЕДОСОВА¹,
Л.А. КОШКАРОВА¹, Т.И. МИТРОФАНОВА¹, Р.Г. ВАСИЛОВ², А.И. НЕТРУСОВ¹

¹ Биологический факультет, ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,

² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

В работе приведены данные по исследованию продукции водорода отобранными активными целлюлозолитическими водород-производящими микробными сообществами при использовании различных типов целлюлозосодержащих органических отходов. Показана возможность успешного применения в качестве субстратов макулатуры, хвои, пищевых продуктов и др. Также протестирована активность микробных сообществ при изменении концентрации буферных растворов и увеличении содержания различных солей в среде культивирования. Проведена оценка эффективности конверсии целлюлозосодержащих отходов в водород. Показано, что за время культивирования выделенные микробные сообщества потребляют в среднем около 30% (по массе) целлюлозы. Суммарная концентрация водорода, образованного сообществами при разложении целлюлозы, составляла около 2,1 М водорода в пересчете на 1 М глюкозы. В результате работы также создана коллекция анаэробных целлюлозолитических водород-производящих сообществ микроорганизмов, образцы в которой сохранены методом лиофильного высушивания для анаэробных сообществ микроорганизмов.

Ключевые слова: биоэнергетика, биоводород, органические отходы, термофильная микробная конверсия.

Введение

Рациональное использование топливно-энергетических ресурсов и защита экологии представляют сегодня одну из проблем любого государства, успешное решение которой, по-видимому, будет иметь определяющее значение не только для дальнейшего развития мирового сообщества, но и для сохранения среды его обитания. Одним из перспективных путей решения этой проблемы является микробная переработка органических отходов (в том числе твердых бытовых отходов — ТБО, отходов сельского и лесного хозяйства и т.д.) в биоводород. В нашей стране ежегодно накапливается до 270 млн. тонн (по сухому веществу) органических отходов, из них 230 млн. тонн в сельскохозяйственном производстве и 50 млн. тонн ТБО. Опыт стран, не обеспеченных природным

газом (например, КНР), показывает, что отдаленные сельские местности целесообразно газифицировать с помощью малых биоустановок, работающих на органических отходах. Данная технология предусматривает значительное уменьшение производственных затрат для фермерских хозяйств, для организации сельской кооперации в рамках собственного производства альтернативных источников энергии. Низкая цена и высокие характеристики по производительности, а также использование в качестве сырья отходов сельского хозяйства (жмых, лузга, солома и т.д.) положительно скажутся на отпускных ценах продукции сельского хозяйства [3]. В то же время биоводород как основной продукт процесса можно использовать в качестве перспективного топлива. Теплота сгорания водорода в несколько раз превышает теплоту сгорания бензина. Поэтому развитие технологий получения микробного водорода носит первостепенный характер в секторе биотопливной энергетики [1].

Материалы и методы

Объектом исследований являлись отобранные ранее в активные целлюлозолитические водород-производящие сообщества № 21, 25 и 26, выделенные из

© 2013 г. Садрадинова Э.Р., Шестаков А.И., Абрамов С.М., Федосова В.И., Кошкарлова Л.А., Митрофанова Т.И., Василев Р.Г., Нетрусов А.И.

* Автор для переписки:

Шестаков Андрей Иннокентьевич

ведущий инженер Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»

Тел./факс: +7 (495)939-56-05, E-mail: 6.ok.off@mail.ru

образцов симбионтной микробиоты пищеварительного тракта коровы и пони и донных осадков пресного водоема, соответственно.

Для культивирования сообществ анаэробных водород-производящих целлюлозолитических микроорганизмов были использованы питательные среды Имшенецкого и DSM, приготовленные по стандартной методике [7]. Температура культивирования образцов — 60 °С. Длительность культивирования культур — 7 суток.

За динамикой роста культур следили по степени деструкции субстрата, по динамике накопления продуктов культивирования (как жидких, так и газообразных) и снижению рН среды.

Анализ метаболитов проводили методом газовой хроматографии на хроматографе Кристалл 2000 М (Россия) с детектором — ДТП, колонкой 1000 × 3 мм, неподвижной фазой — активированным углем и газом-носителем — аргоном. Концентрацию газа измеряли при атмосферном давлении. Избыточное давление во флаконах, образовавшееся во время культивирования, измеряли манометром и учитывали при подсчете конечной концентрации продукта. Определение состава летучих жирных кислот (ЛЖК) в культуральной жидкости проводили на том же приборе, оснащенный микрокапиллярной колонкой ZB-FFAP (Zebron, США; 15 м × 0,32 мм). Газ-носитель — азот, расход газа — 15 мл/мин., детектор — ПИД, температура испарителя — 200 °С. Измерения проводили в условиях температурного градиента в термостате колонок от 70 до 160 °С. Результаты хроматографии были обработаны при помощи программного обеспечения Chromatec Analytic 2.5 (Хроматэк, Россия).

Для определения концентрации молочной кислоты в супернатанте использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Измерения проводили на приборе «Стайер» с УФ-детектором (Аквилон, Россия). В качестве подвижной фазы использовали бидистиллированную воду, рН которой доводили до значения 3,5 концентрированной серной кислотой (чда). Скорость потока элюента — 0,5 мл/мин. Разделение вели на колонке C18 (250 × 4,6 мм) Luna (PHENOMENEX, USA). Для каждого анализа объем вводимой пробы составил 10 мкл. Идентификацию молочной кислоты проводили по времени выхода стандартов (чистых веществ), расчет концентрации вели по площади под пиками стандартов. Отобранную пробу перед измерением центрифугировали 10 мин. при 13000 g.

Концентрацию глюкозы в среде оценивали глюкозооксидазным методом. Отобранные образцы разбавляли

фосфатным буфером (0,1 М КСl, 0,05 М КН₂РO₄, рН 7,0) сообразно их предполагаемой концентрации (от 2 до 200 раз). Анализ проводили в проточно-инжекционном режиме при потенциале рабочего электрода 0 мВ относительно хлорсеребряного электрода сравнения. Скорость потока составляла 0,65 мл/мин. В качестве отклика биосенсора на данное содержание глюкозы принимали среднее значение по результатам 2–3 измерений (в связи с дестабилизирующим действием веществ, содержащихся в образцах). Перекалибровку соответствующих участков кривой проводили после измерений 1–3 образцов. Концентрацию глюкозы в образцах определяли по предварительно построенному калибровочному графику. Построение калибровочного графика осуществляли по результатам детекции глюкозы в проточно-инжекционном режиме в фосфатном буфере. Среднюю величину отклика вычисляли по результатам 3 единичных измерений.

Эффективность переработки целлюлозосодержащего субстрата определяли взвешиванием осушенного остатка.

Сохранение сообществ проводили методом лиофилизации по модифицированной методике [6]. Лиофильное высушивание сообществ осуществляли на оборудовании Labconco (США) при глубине вакуума в 4,3 Па, температуре конденсора -52 °С в течение 1,5–2 суток, в зависимости от объема проб. По окончании высушивания газовую фазу в вакуумной камере восстанавливали осушенным инертным газом (азотом).

Затем ампулы запаивали под вакуумом — 1 бар — газово-кислородной горелкой. Готовые запаянные ампулы помещали на хранение при температуре 4 °С. В качестве защитных сред для сравнения использовали [1] — «Идеальную среду» с глюкозой или сахарозой следующего состава: 10%-ный раствор декстрана Т-20 и 1% мясо-пептонный бульон (МПБ) в соотношении 3:1, глюкоза или сахароза — 7,5 г/л; сухое обезжиренное молоко (СОМ) с глюкозой или сахарозой, состава: СОМ — 10 г/л; глюкоза или сахароза — 7,5 г/л.

Успешность сохранения и выживаемость образцов оценивали по продуктивности водорода сообществами после восстановления в течение трех пересевов.

Результаты и обсуждение

Влияние рН среды культивирования на активность культур. Культивирование отобранных микроорганизмов в режиме рН-статирования. Основными продуктами переработки целлюлозосодержащего суб-

страта водород-производящими сообществами являются газообразные (H_2 и CO_2), а также жидкие метаболиты (короткоцепочечные ЛЖК – уксусная и масляная кислоты). Кислоты обычно активно образуются уже на 2-е сутки культивирования сообществ, а при культивировании на таком более доступном субстрате, как глюкоза, – уже к 12 часам культивирования (рис. 1).

Как видно на рисунке 1, культура достигла стационарной фазы роста на 14-м часу культивирования. В это же время прекратилось дальнейшее активное накопление жидких продуктов культивирования (ЛЖК), однако образование водорода и CO_2 происходило еще в течение дальнейших десяти часов культивирования. По данным

концентрации глюкозы, представленным на рисунке 1, можно сделать вывод, что накопление газообразных продуктов продолжается за счет разложения глюкозы, однако с заметно меньшей скоростью. Дальнейшее накопление кислот в среде ферментации и снижение pH приводили к ингибированию роста культуры в периодическом режиме культивирования. Максимальная концентрация основных продуцируемых ЛЖК в эксперименте достигла следующих значений: ацетат – 6,102 мМ, бутират – 5,040 мМ, пропионат – 2,348 мМ, лактат – 2,052 мМ. Во избежание ингибирования процесса продуктами культивирования использовали режим pH-статирования с помощью 4 М раствора NaOH (рис. 2).

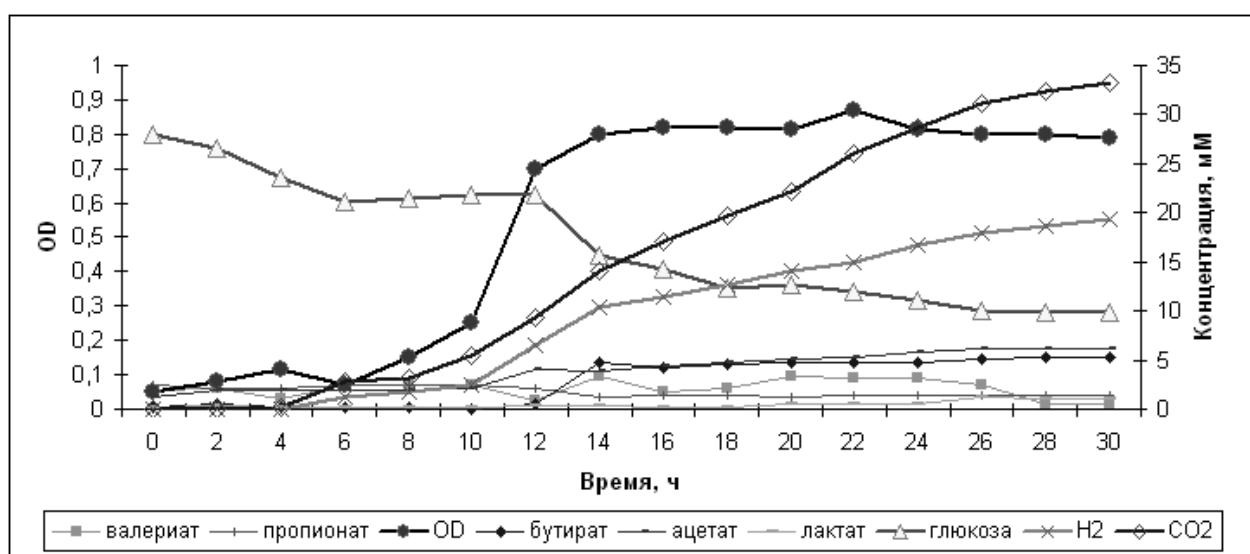


Рис. 1. Динамика накопления продуктов метаболизма сообществом № 21 (субстрат – глюкоза, температура – 60 °С)

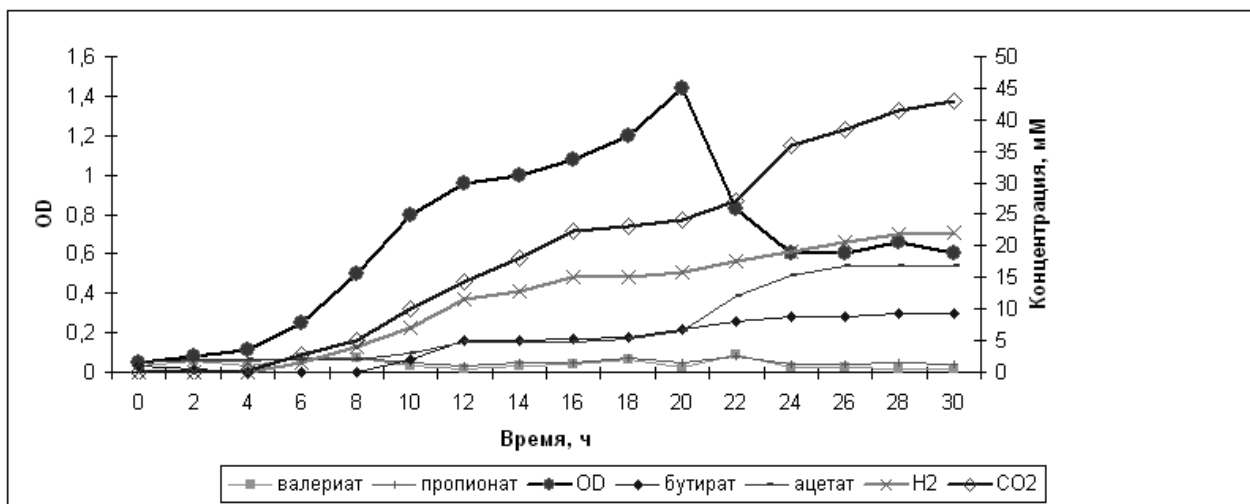


Рис. 2. Динамика накопления продуктов метаболизма сообществом № 21 в режиме pH-статирования (субстрат – глюкоза, температура – 60 °С)

Анализируя полученные результаты, можно заключить, что динамика роста сообщества на глюкозе в режиме рН-статирования отличается от предыдущего эксперимента. Стационарной фазы роста культура достигает уже на 12-й час культивирования, однако на 16-м часу начинается короткая вторая фаза роста, которая заканчивается лизисом клеток культуры к 22-му часу культивирования. Количество образованных в результате культивирования ацетата и бутирата также отличается от предыдущего эксперимента. К 12 часам культивирования оно составляет для уксусной кислоты – 10,028 мМ, для масляной кислоты – 9,998 мМ. К концу эксперимента количество уксусной кислоты продолжает увеличиваться, что можно объяснить лизисом культуры. Этот факт подтверждает и резкое увеличение концентрации CO_2 к концу эксперимента. Максимальная концентрация основных продуцируемых ЛЖК в эксперименте достигла следующих значений: ацетат – 17,725 мМ, бутират – 9,709 мМ, пропионат – 2,964 мМ.

Далее исследовали продукты метаболизма в биореакторе, используя в качестве субстрата фильтровальную бумагу (рис 3).

При стабилизации рН на уровне значения 6,5 средняя скорость разложения целлюлозы составила 1,5 г/сутки·л среды (0,2 мМ/ч·л среды) и уже через 5 суток в ферментере не наблюдалось оформленного субстрата (нерастворимой целлюлозы), а скорость образования водорода и других продуктов метаболизма резко пада-

ла. Максимальная скорость образования водорода для сообщества № 21 на фильтровальной бумаге в режиме рН-статирования достигала 1 мМ H_2 /ч·л среды. При аналогичных условиях разложения целлюлозы (фильтровальной бумаги) в работе [5] была зафиксирована скорость, равная 1,139 г/сутки·л среды (0,15 мМ/ч·л среды).

Таким образом, рН-статирование позволяет значительно уменьшить время переработки субстрата, а также увеличить количество образованных в результате процесса ЛЖК (в основном ацетат), являющихся не менее ценным продуктом ферментации. Еще больше сократить это время можно в случае использования предобработанного сырья, например, раствором H_2SO_4 .

Исследование продукции водорода при использовании различных типов буферных растворов для увеличения стабильности системы. Одной из сред для культивирования, использованных в работе, была среда DSM Stand, часто применяемая для выделения сообществ активных водород-продуцентов, растущих на глюкозе. Это удобно для сравнения результатов. Однако на данной среде рост и образование водорода культурами сопровождалось значительным закислением среды культивирования основными продуктами метаболизма (ЛЖК и другие органические кислоты) из-за слабой буферной емкости среды. Это значительно снижало эффективность разложения субстрата и продуктивность по водороду культурами.

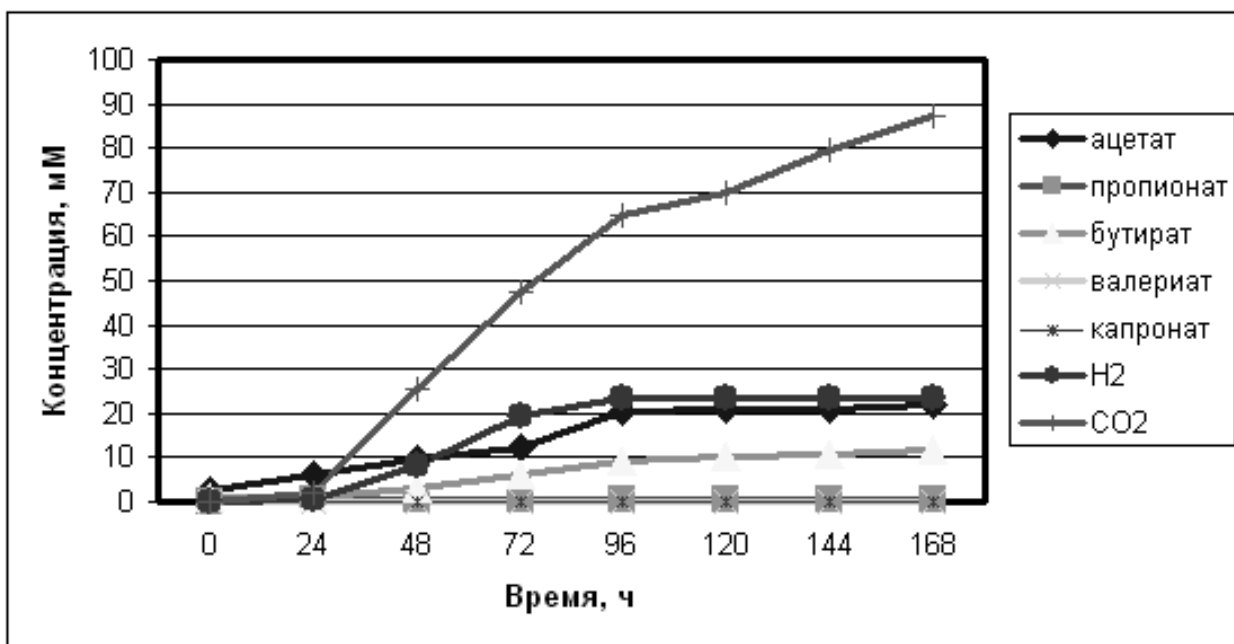


Рис. 3. Динамика накопления продуктов метаболизма сообщества № 21 в режиме рН-статирования (субстрат – фильтровальная бумага, температура – 60 °С)

В связи с этим был проведен опыт по сравнению различных сред культивирования микроорганизмов с различной буферной емкостью, а точнее: модифицированной среды Имшенецкого с добавлением глюкозы в качестве источника углерода и увеличением концентрации соли $MgCl_2$ (наличие ионов Mg^{2+} в среде необходимо для работы выделяющих гидрогеназ) и среды DSM Stand. Предложенная модифицированная среда Имшенецкого обладает большей буферной емкостью по сравнению с DSM Stand. Также в опыте была использована среда DSM Stand с добавлением $MgCl_2$, но без изменения буферной емкости для определения, насколько ее увеличение влияет на рост и развитие сообществ микроорганизмов.

В качестве опытного сообщества было выбрано сообщество 21, которое предварительно культивировали в течение пяти пересевов на среде DSM Stand. В рамках опыта было проведено три посева на исследуемых средах, измерена концентрация выделившихся газовых метаболитов и построены диаграммы сравнения продукции водорода на трех типах сред (рис. 4).

Из представленных на рисунке 4 данных можно сделать вывод, что сообщество 21 более чем в 2 раза активнее образует водород на модифицированной среде Имшенецкого, чем на ранее использовавшейся среде DSM Stand. На среде DSM Stand с добавлением соли $MgCl_2$ продукция водорода сообществом увеличивалась незначительно по сравнению с продукцией на этой среде без добавления $MgCl_2$. Из этого можно сделать вывод, что лимитирующим фактором для роста и выделения

водорода микроорганизмами является низкая буферная емкость среды.

Оценка скорости разложения целлюлозы и выделения водорода на единицу массы субстрата. Для измерения скорости разложения целлюлозы были выбраны сообщества № 26 и 21 как одни из наиболее активно разрушающих целлюлозу. После заданного времени культивирования (7 дней) оставшийся субстрат (фильтровальная бумага) был обработан муравьиной кислотой для лизиса бактериальных клеток, отфильтрован, высушен и взвешен. По результатам взвешивания, в процессе первых семи суток культивирования потребляется 1/3 всего субстрата (5 г/л). Однако в течение первых семи суток могли преимущественно разлагаться аморфные участки целлюлозы, что означало бы замедление скорости разложения остального субстрата ввиду концентрирования в его составе кристаллических участков. Учитывая это, оставшийся субстрат вносили в свежую среду.

Всего было проведено три посева сообществ в опытные флаконы. На последнем этапе опыта во флаконах не наблюдалось оформленного субстрата, культуральная жидкость была однородной. Избыточное давление газов и концентрация образовавшегося водорода были низкими. Масса остаточной целлюлозы составила для сообщества № 21 – 0,062 г, для сообщества № 26 – 0,027 г. Таким образом, сообщество № 21 потребило 95,86% всего субстрата, а сообщество № 26 – 98,20% субстрата в течение трех пересевов (21 день). Средняя скорость разложения субстрата составила 0,72 г/л среды в сутки.

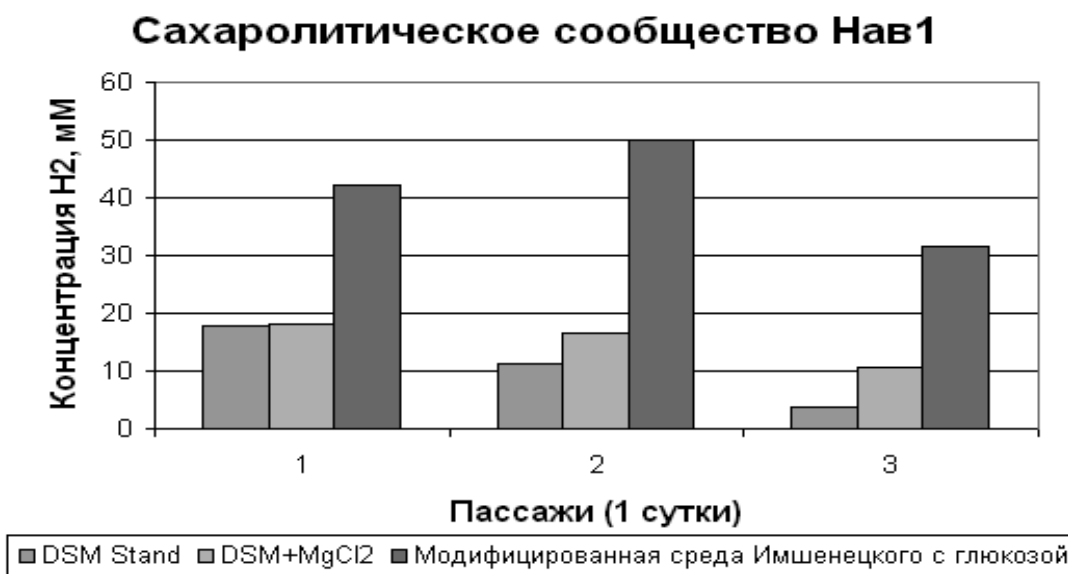


Рис. 4. Сравнение продукции водорода сообществом № 21 на трех типах сред

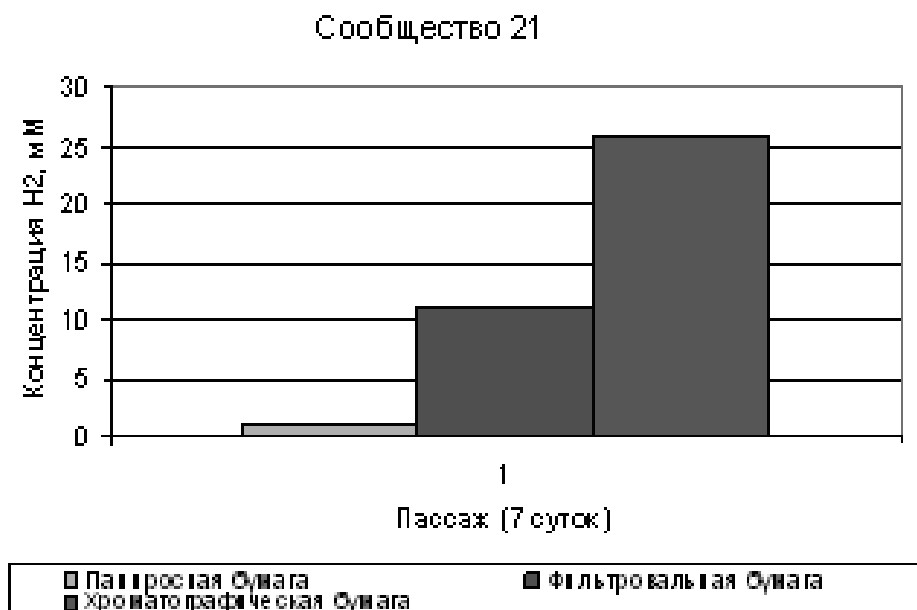


Рис. 5. Оценка продукции водорода сообществом № 21 на разных типах бумаги при 60 °С

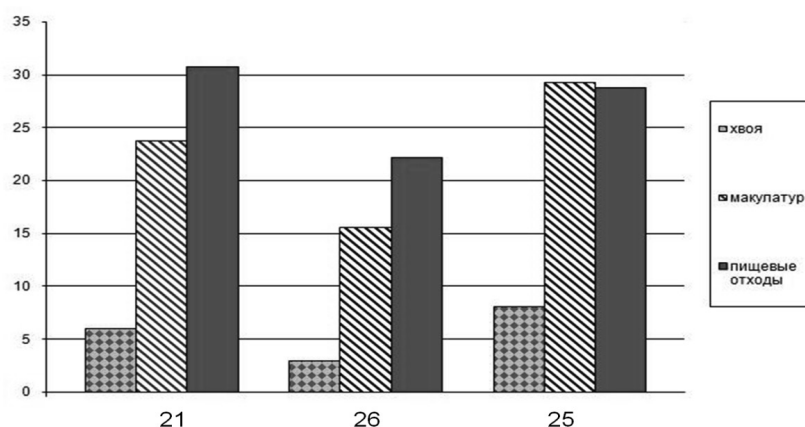


Рис. 6. Диаграмма продукции водорода полученными целлюлозолитическими сообществами при культивировании отобранных образцов в течение 7 суток при 60 °С на макулатуре, хвое и пищевых отходах (культивирование 48 часов)

Изучение эффективности продукции водорода в зависимости от вида целлюлозосодержащих отходов (пищевые отходы, отходы сельского и лесного хозяйства, бумажные отходы). Для сравнения роста и продукции водорода целлюлозолитическими сообществами при использовании разных видов бумаги был поставлен эксперимент по культивированию сообщества № 21 с использованием нарезанной фильтровальной, папиросной или хроматографической бумаги в качестве источника углерода. Данные типы субстрата отличаются различными видами клея и добавок, входящих в их состав. Культивирование велось в течение семи суток в стандартных условиях при температуре 60 °С. На

рисунке 5 представлены результаты измерения концентрации выделившегося водорода методом газовой хроматографии.

Исходя из приведенных данных, следует, что сообщество № 21 лучше гидролизует целлюлозу с выделением водорода на фильтровальной бумаге. Разница в продукции водорода, возможно, связана с составом бумаги или степенью обработки целлюлозных волокон у разного типа бумаги.

Также был проведен опыт с использованием в качестве субстрата хвои (как модель отходов лесной промышленности), макулатуры. В качестве модели пищевых отходов был использован коммерчески доступ-

ный продукт — «гамбургер» (МакДоналдс, Москва), который содержал в своем составе компоненты растительного и животного происхождения. Перед использованием «гамбургер» гомогенизировали, высушивали в лиофильной сушке и добавляли в среды в различных концентрациях. В опыте использовали сообщества № 21, 25 и 26. Результаты эксперимента представлены на рисунке 6.

Из данных, приведенных на рисунке 6, можно заключить, что наибольшее количество водорода образовывалось при культивировании сообществ на таком субстрате, как пищевые отходы. Вероятно, это связано с тем, что в данном продукте содержится большое количество разнообразных легкодоступных для потребления компонентов, что способствует быстрому гидролизу. При этом и рН успевает снизиться настолько, чтобы остановить процесс активного потребления субстрата и выделения водорода — этим объясняется краткосрочность эксперимента (культивирование 48 ч). Наименьшее количество водорода обнаружено в образце с таким целлюлозосодержащим отходом, как хвоя.

Это можно объяснить тем, что хвоя является трудно разлагаемым субстратом из-за содержащихся в ней эфирных масел, обладающих антимикробным действием. Высокая целлюлозолитическая активность зафиксирована в образцах, содержащих макулатуру (субстрат был разложен на 100% за 7 суток культивирования), что, возможно, происходит благодаря тому, что макулатура содержит некоторые микроэлементы

в составе бумаги или полимерной краски, необходимые микроорганизмам. Продукция водорода на этом субстрате также была высокой, однако по сравнению с пищевыми отходами накопление водорода длилось медленнее — 7 суток.

Большую проблему для производителей пива представляют отходы пивоваренного производства, среди которых: дробина, кизельгур (силикагель с остатками дрожжевой биомассы) и дрожжи. Для переработки этих отходов использовали сообщество № 21 (рис. 7).

Дрожжи были добавлены в среду в количестве 40 г/л, кизельгур — в количестве 100 г/л (основная масса кизельгура представлена минеральным компонентом) и дробина — в количестве 8 г/л. Во всех случаях сообщество № 21 перерабатывало субстрат и образовывало водород. Следует отметить, что соотношение CO_2 и H_2 в опытных и контрольных флаконах отличалось. Вероятно, это связано с тем, что опытные субстраты более разнообразны по своему компонентному составу.

Также была показана возможность роста сообщества № 21 на сене, скошенном за 6 месяцев до проведения эксперимента (рис. 8).

По количеству образовавшегося водорода этот субстрат заметно проигрывал фильтровальной бумаге. По-видимому, это происходило, как и в случае с древесными опилками, из-за содержания бактерицидных веществ (смолы, эфирные масла и др.) в составе стеблей и листьев сена.

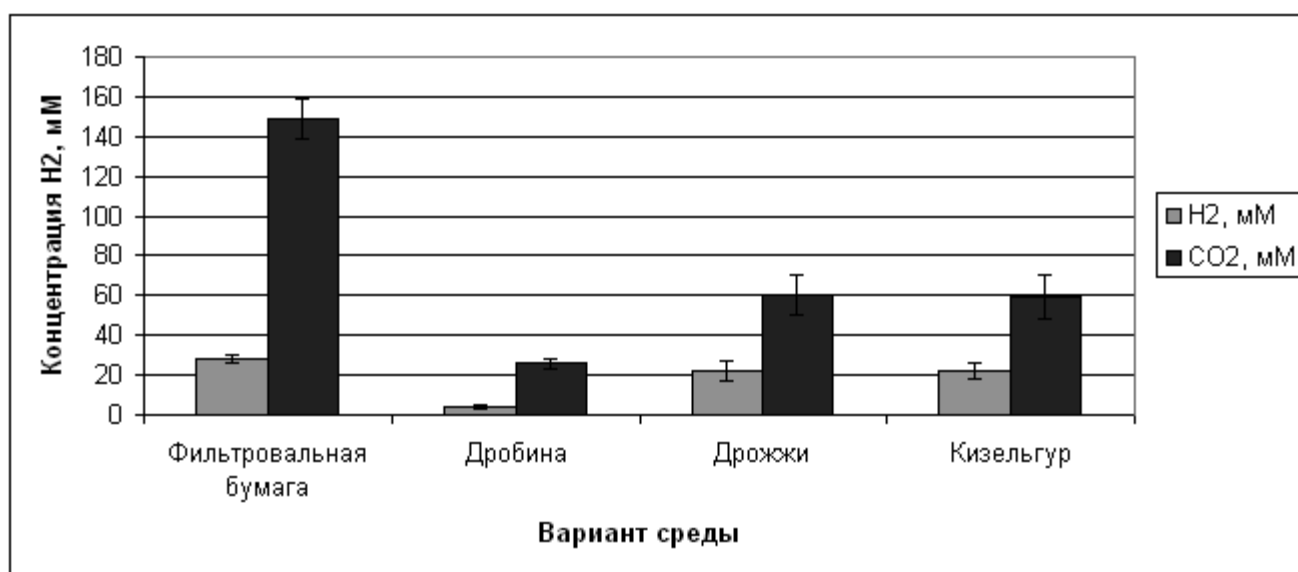


Рис. 7. Образование газообразных продуктов сообществом № 21 при росте на отходах пивоваренного предприятия («Очаково», г. Москва) при 60 °C в течение 168 часов

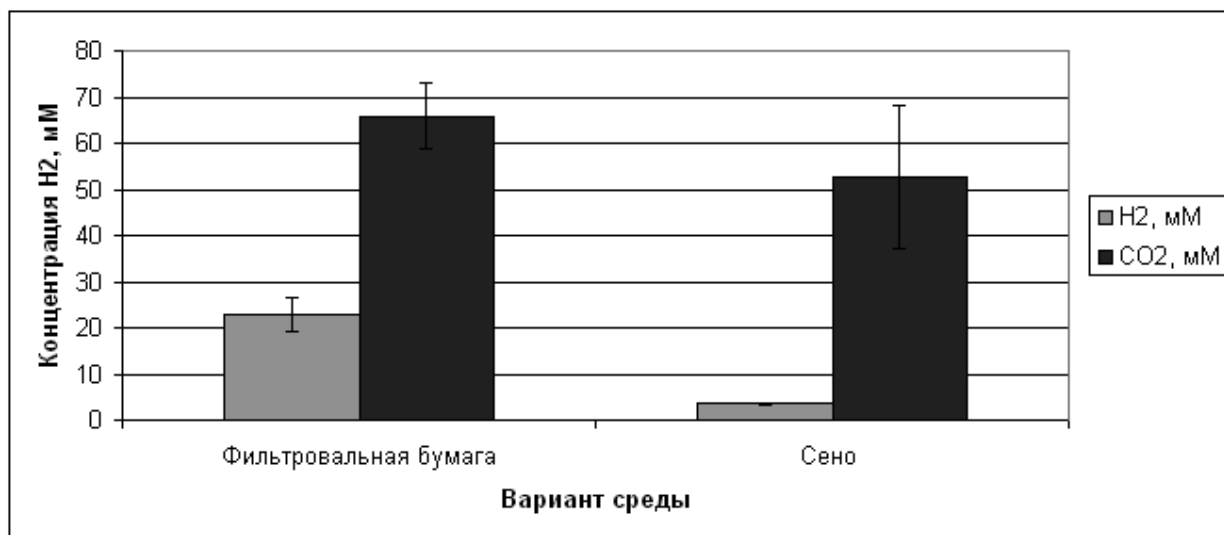


Рис. 8. Продуктивность сообщества № 21 при росте на отходах сельского хозяйства, при температуре 60 °С в течение 168 часов

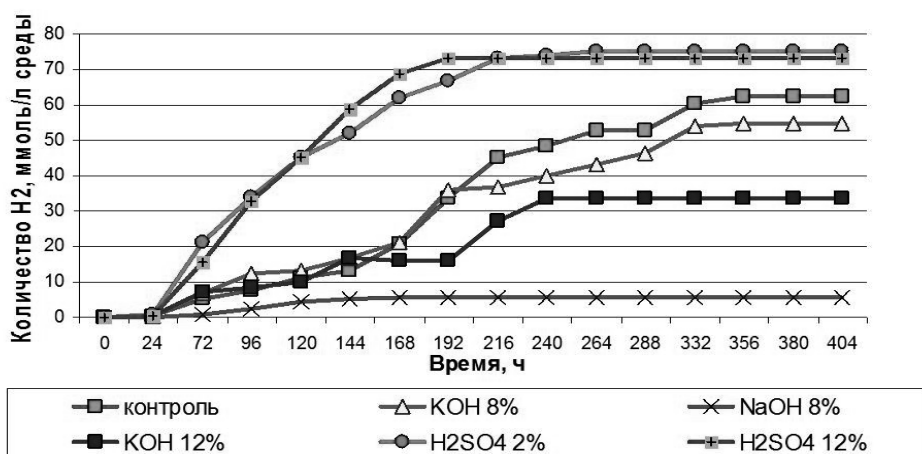


Рис. 9. Динамика накопления водорода целлюлозолитическим сообществом № 21 при росте на фильтровальной бумаге, предобработанной различными способами (кислотный и щелочной гидролиз, mM H₂/1 л среды)

Предобработка целлюлозы. Узким местом любого процесса переработки целлюлозы, очевидно, является время ее разложения сообществом целлюлозолитических микроорганизмов. Современная практика работы с целлюлозосодержащими материалами, как правило, предусматривает предварительную обработку сырья. В частности, популярен гидролиз сырья различными агентами (ферменты, кислоты, щелочи). Используют также предобработку паром, механическое измельчение и др. Особенно эффективен и экономичен в этом отношении процесс гидролиза слабыми растворами кислот и щело-

чей. Однако целлюлозное сырье, обработанное кислотой или щелочью, может быть токсично для целлюлозолитических микроорганизмов. Чтобы изучить возможность эффективного гидролиза предобработанного сырья целлюлозолитическими микроорганизмами, был проведен мягкий кислотный и щелочной гидролиз фильтровальной бумаги. После этого гидролизаты были промыты в воде, высушены и взвешены. Потери по массе во всех случаях составили менее 7%. Фильтровальная бумага, гидролизованная растворами серной кислоты, принимала порошкообразную форму, аналогичную микрокристаллической

целлюлозе (МКЦ). Значит, гидролиз серной кислотой способствовал в основном разрыву аморфных участков целлюлозных волокон без высвобождения значительного количества глюкозы. Фильтровальная бумага, гидролизованная растворами щелочей, отчасти сохраняла свою форму. Затем гидролизаты были использованы в качестве субстрата для сообщества микроорганизмов № 21.

Как следует из рисунка 9, было показано, что при использовании кислотного гидролизата в качестве субстрата микроорганизмы образовывали максимальное количество водорода за меньшее время культивирования. В этом случае стационарная фаза роста начиналась к 192 часам культивирования (8 суток). После этого времени в культивационных флаконах не наблюдали оформленного субстрата, культуральная жидкость была однородной. Избыточное давление газов и концентрация образовавшегося водорода были низкими. Важно также подчеркнуть, что различия в продуктивности при культивировании сообщества на фильтровальной бумаге, обработанной 2%- и 12%-ным растворами H_2SO_4 , были незначительными.

В контрольных флаконах с негидролизованной фильтровальной бумагой количество водорода было в два раза меньше, чем в опытных, с кислотным гидролизатом фильтровальной бумаги. Тестируемое сообщество № 21 обнаружило значительно более низкую продуктивность при росте на субстратах, предобработанных растворами щелочей. Таким образом, предобработка целлюлозного субстрата 2%-ным раствором H_2SO_4 — это перспективный способ уменьшения времени, затрачиваемого на процесс гидролиза целлюлозы и получения водорода. Выход водорода составил 45 и 73 мМ H_2 /л за 200 часов культивирования в контроле и при использовании 2% H_2SO_4 , соответственно. Следует, однако, подчеркнуть, что в крупномасштабных процессах неизбежно возникновение проблем, связанных с утилизацией сульфатных солей (гипса — в случае использования мела для нейтрализации кислоты перед культивированием).

Использование для процесса микробного получения водорода необработанной фильтровальной бумаги в сравнении с гидролизованной фильтровальной бумагой в присутствии 2% H_2SO_4 не намного снижает потенциал образования H_2 испытанным сообществом (62 мМ по сравнению с 75 мМ за 300 часов). Кроме того, применение кислотного гидролиза для обработки целлюлозы ведет к ощутимым экологическим проблемам, перед которыми увеличение выхода продукта (H_2) на 20% теряет свою выгоду.

Таким образом, в результате описанной серии экспериментов была показана возможность роста получен-

ных активных сообществ микроорганизмов при разных условиях культивирования на различных трудно разлагаемых целлюлозосодержащих органических отходах. Несмотря на ряд факторов, препятствующих разложению перечисленных субстратов полученными сообществами, была продемонстрирована возможность использования этих субстратов в качестве источника углерода, а также возможность активного образования водорода.

Сохранение выделенных активных сообществ методом лиофильного высушивания. Процесс длительного сохранения исследуемых образцов включал в себя все основные стандартные этапы лиофилизации: 1) подготовка биологического препарата; 2) замораживание образцов; 3) процесс сублимации; 4) упаковка и помещение на хранение лиофилизованного образца.

Модификация метода заключалась в том, что все стадии подготовки культуры к сохранению, а также запечатывание образцов и их хранение осуществляли в анаэробных условиях. Для оценки эффективности метода лиофильного высушивания анаэробных целлюлозолитических сообществ микроорганизмов предварительно были проведены исследования по выживаемости клеток на всех перечисленных этапах процесса с положительным результатом.

В таблице 1 представлены результаты измерений водород-производящей активности образцов сообщества № 21, восстановленных через 17 месяцев хранения при температуре $+4^\circ C$.

Из таблицы 1 видно, что сообщество № 21 успешно переживает процесс лиофилизации и хранение в течение 17 месяцев при $+4^\circ C$, не теряя своей водород-производящей активности. По результатам эксперимента можно заключить, что использование «защитных» сред необходимо для сохранения данного образца. Наиболее выраженными протекторными свойствами обладают среды СОМ + сахароза и СОМ + глюкоза; кроме того, эффективность сохранения повышается при использовании носителя для закрепления клеток типа фильтровальной или хроматографической бумаги.

В таблицах 2 и 3 представлены результаты измерений водород-производящей активности сообществ № 25 и 26, восстановленных через 4 месяца хранения при $+4^\circ C$.

Из данных таблиц 2 и 3, так же, как и в предыдущем случае, видно, что сообщества № 25 и 26 успешно переживают процесс лиофилизации и хранение в течение 4 месяцев при $+4^\circ C$, не теряя своей водород-производящей активности.

Таблица 1

Оценка активности продукции водорода сообществом № 21 через 17 месяцев хранения при +4 °С в лиофилизированном виде

Варианты защитных сред*	Концентрация H ₂ , мМ			
	I пересев	II пересев	III пересев	Контроль**
«Идеальная среда» с глюкозой	25,4	22,7	16,4	28,5
«Идеальная среда» с глюкозой + бумага	27,6	30,0	29,1	
«Идеальная среда» с сахарозой	24,0	20,6	20,8	
«Идеальная среда» с сахарозой + бумага	31,5	27,4	29,0	
СОМ с глюкозой	30,1	22,2	26,6	
СОМ с глюкозой + бумага	36,3	27,6	25,3	
СОМ с сахарозой	35,7	22,6	28,4	
СОМ с сахарозой + бумага	37,8	26,6	30,5	
Среда Имшенецкого	16,3	14,8	13,6	
Среда Имшенецкого + бумага	14,7	15,4	10,9	

Примечания: *Графа «Варианты защитных сред» отражает способы сохранения бактериальной суспензии клеток: 1) с использованием различных защитных сред или стерильной среды культивирования (5 исследуемых вариантов); 2) с добавлением к средам носителя для прикрепления клеток (фильтровальная бумага, нарезанная на полоски 0,2 см × 3,5 см, общей площадью 24,5 см² – см. Материалы и методы). **Контролем в данной таблице является среднее значение по трем последним пересевам количества водорода, образуемого сохраняемым сообществом, культивируемым периодически параллельно эксперименту

Таблица 2

Оценка активности продукции водорода сообществом № 25 через 4 месяца хранения при +4 °С в лиофилизированном виде

Варианты защитных сред*	Концентрация H ₂ , мМ			
	I пересев	II пересев	III пересев	Контроль**
СОМ с сахарозой	22,5	28,3	24,2	29,1
СОМ с сахарозой + бумага	23,8	21,7	22,5	

Примечание: см. табл. 1

Таблица 3

Оценка активности продукции водорода сообществом № 26 через 4 месяца хранения при +4 °С в лиофилизированном виде

Варианты защитных сред*	Концентрация H ₂ , мМ			
	I пересев	II пересев	III пересев	Контроль**
СОМ с сахарозой	21,0	21,9	27,0	24,6
СОМ с сахарозой + бумага	21,2	23,7	22,0	

Примечание: см. табл. 1

Заключение

В результате настоящей работы, которая является дальнейшим продолжением общего исследования по скринингу различных микробных сообществ [4], была создана коллекция анаэробных целлюлозолитических водород-производящих сообществ микроорганизмов в количестве 25 анаэробных сообществ, которые сохранены модифицированным методом лиофильного высушивания для анаэробных сообществ микроорганизмов.

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

Литература

1. *Василов Р.Г.* Перспективы развития производства биотоплива в России. Сообщение 4: биоводород // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2009. — Т. 5. — № 1. — С. 35–41.
2. *Никитин Е.Е., Звягин И.В.* Замораживание и высушивание биологических препаратов. — М.: Колос, 1971. — 342 с.
3. *Панцхава Е.С., Шипилов М.М.* Биоэнергетика в агропромышленном комплексе России // Энергия: экономика, техника, экология. — 2007. — № 8. — С. 30–34.
4. *Садраддинова Э.Р., Шестаков А.И., Абрамов С.М., Кошкарлова Л.А., Митрофанова Т.И., Василов Р.Г., Нетрусов А.И.* Скрининг микробных сообществ — продуцентов биоводорода // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2013. — Т. 9. — № 2. — С. 43–51.
5. *Desvaux M., Guedon E., Petitdemange H.* Cellulose catabolism by *Clostridium cellulolyticum* growing in batch culture on defined medium // Appl. Inv. Microbiology. — 2000. — Vol. 66. — No. 6. — P. 2461–2470.
6. *Malik K.A.* Preservation of biotechnologically important microorganisms in culture collectons / In: Progr. Biotechnol (Blazej A., Zemek J., Eds.). — Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1988. — Vol. 4. — P. 145–186.
7. *Netrusov A., Abramov S., Sadraddinova E., Shestakov A., Shalygin M., Teplyakov V.* Membrane-assisted separation of microbial gaseous fuels from renewable sources // Desalination and Water Treatment. — 2010. — Vol. 14. — P. 252–258.

THE EFFECT OF DIFFERENT FACTORS ON THE EFFICIENCY OF THERMOPHILIC MICROBIAL CONVERSION OF ORGANIC WASTE INTO BIOHYDROGEN

E.R. SADRADDINOVA¹, A.I. SHESTAKOV², S.M. ABRAMOV¹, V.I. FEDOSOVA¹, L.A. KOSHKAROVA¹, T.I. MITROFANOVA¹, R.G. VASILOV², A.I. NETRUSOV¹

¹ *Department of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University,*

² *National Research Center «Kurchatov Institute», Moscow*

The paper presents data on the study of hydrogen production by selected cellulolytic active hydrogen-producing microbial communities using different types of cellulose-containing organic waste. The possibility of successful use as substrates of paper, pine needles, food, etc. was shown. Also, the activity of microbial communities when the concentration of buffer solutions and increasing the content of various salts in the culture medium was tested. The efficiency of conversion of cellulosic waste into hydrogen was evaluated. It is shown that during the culturing isolated microbial communities consume an average of about 30% (by weight) of the cellulose. The total concentration of hydrogen formed during the decomposition of cellulose communities was about 2.1 M hydrogen based on 1 M glucose. As a result, work has also created a collection of cellulolytic anaerobic hydrogen-producing microbial communities, examples of which are kept by the lyophilic drying for anaerobic microbial communities.

Keywords: bio-energy, biohydrogen, organic waste, thermophilic microbial conversion.

ПРЕДПОСЫЛКИ ФОРМИРОВАНИЯ КИРОВСКОЙ ОБЛАСТНОЙ ПРОГРАММЫ РАЗВИТИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ КАК ИНСТРУМЕНТА ФОРМИРОВАНИЯ РЕГИОНАЛЬНОЙ МОДЕЛИ БИОЭКОНОМИКИ

Р.Г. ВАСИЛОВ*, Т.Н. ГАЕВА

*Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова,
Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва*

В обзоре проведен анализ потенциальных возможностей биоресурсной, промышленной и кадровой базы Кировской области в перспективе создания с помощью программно-целевого подхода региона с развитой биоэкономикой.

Ключевые слова: биотехнология, биоэкономика, региональные программы.

В 2013 году исполняется 10 лет со времени основания Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова. По своей сути это была формальная акция, поскольку речь шла о воссоздании в новой политической и экономической ситуации прежней профессиональной общественной структуры, хорошо функционировавшей в СССР. Мотором этого дела стал академик РАН, генерал-майор медицинской службы Анатолий Андреевич Воробьев, избранный президентом Общества и собравший вокруг себя активных профессионалов в данной области, объединенных идеей возрождения отечественной биотехнологии.

С первых шагов деятельности Общества биотехнологов встал вопрос о формировании долгосрочной программы развития биотехнологии в Российской Федерации. Такая программа вскоре была разработана и принята под названием «Национальная программа «Развитие биотехнологии в Российской Федерации на 2006–2015 гг.» [3]. Она была построена по принципу государственно-частного партнерства и содержала в себе перечень мероприятий, классифицированных по рубрикам: национальные приоритетные проекты; федеральные проекты; региональные проекты (программы); целевые проекты. Таким образом, изначально региональная составляющая Программы была базовой,

ей уделялось постоянное внимание со стороны Центрального правления Общества биотехнологов России.

С исторической точки зрения важно подчеркнуть, что Кировская область оказалась в числе первых регионов, стартовавших в направлении создания собственных программ [4]. Однако по различным объективным и субъективным причинам первоначальная инициатива была утрачена и в число лидеров в данной сфере вышли Республика Татарстан и Чувашская Республика, которые после тщательной предварительной работы приняли соответствующие программы: Целевая программа «Развитие биотехнологии в Республике Татарстан на 2010–2020 годы» [6] и Стратегия «Чувашия – биорегион» до 2020 года [5].

Тем не менее в Кировской области все эти годы постоянно сохранялась атмосфера повышенного внимания к вопросам биотехнологии как со стороны государственных и общественных структур, так и представителей бизнеса, промышленных предприятий, компаний. Результатом стали появление корпоративных объединений типа Некоммерческого партнерства «Биотехнологический кластер Кировской области», Биофармацевтический кластер «Вятка-Биополис Кировской области», Биотехнологический кластер НП «БиоФарм», переориентация ряда местных производств на биотехнологическую продукцию, активизация научного сообщества в отношении биотехнологической тематики и т.д. Так, например, ООО «Восток» выпускает ферментные препараты и аминокислоты для производства животных кормов, ООО «БиоХимЗавод» производит гидролизную продукцию, ОАО «Омутнинская научно-промышленная база» осуществляет производство субстанций противоопухолевых препаратов. В целом научно-образовательный потенциал

© 2013 г. Василев Р.Г., Гаева Т.Н.

* Автор для переписки:

Василев Раиф Гаянович

доктор биологических наук, профессор,

президент Общества биотехнологов России

им. Ю.А. Овчинникова

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: raifvasilov@mail.ru

Кировской области очень высок: несколько НИИ, 9 вузов, выпускающих ежегодно 9 тыс. специалистов, в том числе биотехнологического профиля.

Проводимый настоящий форум «БиоКиров-2013» является также звеном в цепи событий, произошедших в Кировской области за истекшее десятилетие в связи с биотехнологией.

Кировская область с населением 1,3 млн. человек и площадью 140,4 тыс. кв. км относится к числу богатейших российских регионов. Общий запас древесины в ней составляет 1,2 млрд. м³, в том числе эксплуатационный – 1,1 млрд. м³ (это 19-е место по запасам в Российской Федерации). В области имеются крупнейшие в Европе залежи фосфоритов: 2 млрд. т – 45% всех запасов России. Насчитывается 1734 месторождения торфа: общий объем запасов равен 1,1 млрд. т (промышленные запасы – 378,8 млн. т). В области существуют запасы полезных ископаемых для производства строительных материалов – известняков, стекольных песков, сырья для изготовления керамзита, керамического кирпича, песчано-гравийные смеси, глины, камень строительный, цементное сырье.

В структуре земельного фонда Кировской области преобладают две категории земель – земли лесного фонда и земли сельскохозяйственного назначения, составляющие в сумме 93,3% от общей площади области (рис. 1). Лес в общем покрывает 60% территории области.

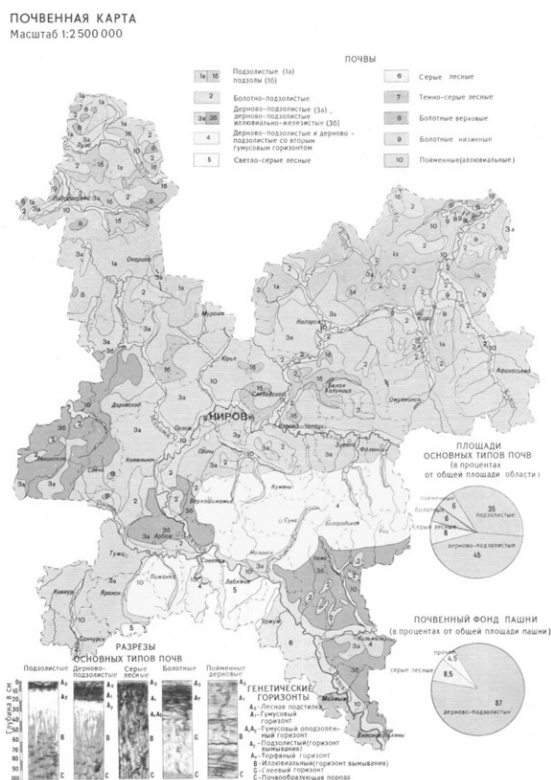


Рис. 1. Почвенная карта Кировской области

Главную долю земель сельскохозяйственного назначения общей площадью 4894,3 тыс. га (по состоянию на 01.01.2008 г.) составляют сельскохозяйственные угодья – 59,6%, из них на пашню приходится 47,0%. Лесные площади составляют 34,6% земель сельскохозяйственного назначения.

Основные выращиваемые сельскохозяйственные культуры: зерновые, картофель, лен и овощи. В структуре зерновых преобладают озимая рожь и фуражные культуры.

Увеличение добавленной стоимости, созданной в сельском хозяйстве, за счет более глубокой переработки сельскохозяйственной продукции является ключевым фактором развития сельского хозяйства в Кировской области.

Большая часть произведенной сельскохозяйственной продукции используется для внутреннего потребления области и в целом сельскохозяйственное производство обеспечивает продовольственную безопасность области.

Очень важно проследить динамику валового регионального продукта (ВРП) в Кировской области за последние годы (рис. 2).

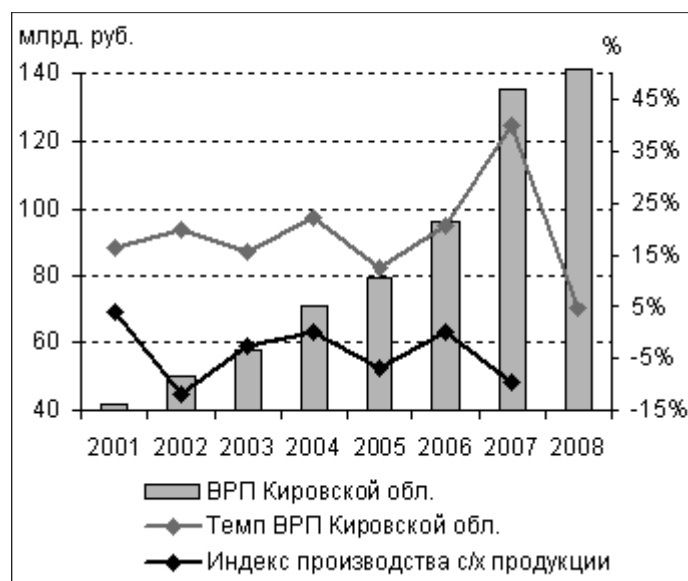


Рис. 2. ВРП Кировской области за период 2001–2008 годы

Констатируется, что рост ВРП в области был достаточно интенсивным, в то время как выпуск сельскохозяйственной продукции в регионе снижался. Сельское и лесное хозяйство производит 13% валового регионального продукта Кировской области и обеспечивает занятость 12% работающего населения. В настоящее время спад производства в сельском и лесном хозяйстве

является причиной низкого уровня благосостояния сельского населения Кировской области. Поэтому внедрение современных агробиотехнологических подходов поможет решить эту проблему.

Животноводство (преимущественно молочно-мясного направления) является ведущей товарной отраслью в сельскохозяйственном производстве Кировской области. До 20% продукции животноводства вывозится за пределы области, в основном в северные регионы страны.

В настоящее время Кировская область представляет собой энергодефицитный регион. В дальнейшем потребности в электроэнергии будут расти по мере развития экономики. Зависимость Кировской области от природного газа довольно высока, а рост цен на газ может привести к росту расходов на электроэнергию для промышленности и частного сектора Кировской области. В связи с этим для Кировской области актуально расширение использования альтернативных видов топлива.

Важным макроэкономическим обстоятельством, ограничивающим экономический рост Кировской области, является слабое развитие производств, нацеленных на экспорт, и энергозависимость региона. Это снижает потенциал роста за счет инерционного развития существующих отраслей.

Анализ показал, что основной потенциал биоресурсной базы для Кировской области составляют:

- отходы лесной и деревообрабатывающей промышленности;
- отходы переработки сельскохозяйственного и пищевого сырья, животноводства;
- производство биомассы (лен, рапс и др.);
- лекарственные растения в экологически чистых районах.

Если рассматривать возможности Кировского региона в плане ускоренного развития биотехнологии и в последующем формировании биоэкономики, то перечень перспективных направлений по биотехнологии выглядит следующим образом:

- медицина и фармацевтика,
- сельское хозяйство,
- пищевая промышленность,
- лесное хозяйство,
- природоохранная деятельность,
- биоиндустрия,
- биоэнергетика.

Это в общих чертах соответствует стратегическим направлениям Комплексной программы развития

биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года («БИО-2020»), принятой Правительством Российской Федерации 24 апреля 2012 года [2].

В случае создания в Кировской области соответствующего документа (типа программы, стратегии, дорожной карты и т.д.), направленного на целенаправленную поддержку развития биоиндустрии в регионе, придется использовать ряд механизмов, достаточно хорошо апробированных в других субъектах Российской Федерации:

- Формирование областной целевой программы (ОЦП); включение разделов по биотехнологии в программы отраслевых министерств.
- Использование государственно-частного партнерства.
- Обеспечение нормативно-правовой базы (областной закон о биомассе и др.).
- Создание особых экономических зон, биокластеров; включение проектов по биотехнологии в планы развития районов.
- Развитие межрегиональной кооперации.
- Разработка целевых инновационных и инвестиционных проектов.
- Осуществление целевых международных проектов.
- Подготовка кадров биотехнологов, включая управленцев.
- Проработка вопросов финансирования, подготовки бизнес-планов, анализ рисков.
- Изучение и прогноз биотехнологического рынка России и мира.

В настоящее время в Кировской области реализуются действия в рамках общей позитивной тенденции к поддержке биотехнологического направления и перспективных планов в соответствии со стратегическими установками на разработку Концепции развития биоэкономики в области, разработку и реализацию региональной кластерной политики в сфере биотехнологии, создание центра кластерного развития, сотрудничество с поддержанными на федеральном уровне технологическими платформами, интеграцию вузов в единую систему развития кластеров биотехнологического и фармацевтического направлений.

Однако факт проведения Форума под девизом «БиоКиров-2013» свидетельствует о более далеко идущих планах руководящих органов, государственных и общественных организаций, а также бизнес-структур, заинтересованных в развитии биотехнологии и биоэкономики в Кировском регионе [1].

Литература

1. *Василов Р.Г.* Биотехнология как основа инновационной экономики // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2012. — Т. 8. — № 1. — С. 63–67.
2. *Василов Р.Г., Трубников В.И.* О Комплексной программе развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года («БИО-2020») // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2012. — Т. 8. — № 3. — С. 46–52.
3. *Воробьев А.А., Василов Р.Г.* Концепция, структура и механизмы реализации Национальной программы «Развитие биотехнологии в Российской Федерации на 2006–2015 гг.» // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2005. — Т. 1. — № 1. — С. 56–58.
4. Законодательное обеспечение развития биотехнологической отрасли промышленности: Материалы круглого стола в Государственной Думе РФ. 8 февраля 2005 г. — М.: «Русская панорама», 2005. — 144 с.
5. Стратегия «Чувашия — биорегион» до 2020 года. — Чебоксары, 2010. — 165 с.
6. Целевая программа «Развитие биотехнологии в Республике Татарстан на 2010–2020 годы». — Казань, 2009. — 184 с.

Материалы доклада на Международном экономическом форуме «БиоКиров-2013» (Киров, 27–28 июня 2013 г.).

PREREQUISITES FOR THE FORMATION OF THE KIROV REGIONAL PROGRAM OF DEVELOPMENT OF BIOTECHNOLOGY AS A TOOL FOR DEVELOPMENT OF A REGIONAL MODEL OF THE BIOECONOMY

R.G. VASILOV, T.N. GAEVA

*Yu.A. Ovchinnikov Russian Biotechnology Society,
National Research Center «Kurchatov Institute», Moscow*

The review analyzes the potential bioresource, industrial and human resource base of the Kirov region in the long term by creating a program-oriented approach with a developed region of the bioeconomy.

Keywords: biotechnology, bioeconomy, regional programs.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИНУЛИНАЗ

В.Г. АРТЮХОВ, М.Г. ХОЛЯВКА*, Т.А. КОВАЛЕВА

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Представленный обзор посвящен анализу физико-химических и кинетических свойств инулиназ из продуцентов, нашедших широкое применение в биотехнологических исследованиях. Главное внимание уделено описанию функциональных особенностей этих ферментов в условиях различного микроокружения (варьирование значений температуры, рН среды, концентрации субстрата), выявлению оптимальных для их функционирования параметров системы, характеристике их стабильности, устойчивости к температурным воздействиям и экстремальным значениям рН среды. Для расширения горизонтов эффективного практического применения промышленных микроорганизмов в данном исследовании систематизированы физико-химические свойства инулиназ различного происхождения, сконцентрировано внимание на их кинетических свойствах и субстратной специфичности. Подчеркивается практическая значимость микроорганизмов, развивающихся в экстремальных условиях и продуцирующих уникальные биокатализаторы (в том числе инулиназы), обладающие перспективными для промышленных процессов особенностями: устойчивы к действию высоких температур, химических денатурантов и кислых сред и могут служить инструментом для осуществления уникальных реакций при создании новых технологических разработок, проектировании биореакторов и биокатализаторов.

Ключевые слова: инулиназа, физико-химические свойства, кинетические свойства, различное микроокружение, стабильность, оптимальные условия функционирования.

Введение

Инулиназы (инулазы, 2,1- β -D-фруктан-фруктаногидролазы, КФ 3.2.1.7) расщепляют инулин и фруктоолигосахариды до фруктозы, участвуют в углеводном метаболизме высших растений и микроорганизмов, являются важнейшими компонентами сигнальных путей, играют ключевую роль в контроле процессов клеточной дифференцировки и развития. В связи с этим исследования физико-химических и кинетических свойств данных ферментов востребованы и актуальны. Однако в настоящее время в литературе встречается небольшое количество обобщающих работ, посвященных названной теме.

Каталитическая активность ферментов определяется степенью мобильности белковой молекулы, даже при небольших изменениях конформации полипептидной цепи у энзимов способность к катализу резко изменяется.

Описание функциональных особенностей инулиназ в условиях различного микроокружения имеет не только теоретическое, но и прикладное значение.

Целью нашей работы был анализ исследований ряда авторов относительно физико-химических и кинетических свойств инулиназ, выделенных из различных продуцентов, описание функциональных особенностей этих ферментов в условиях различного микроокружения, выявление оптимальных для их функционирования параметров системы, характеристика их стабильности, устойчивости к температурным воздействиям и экстремальным значениям рН среды.

Физико-химические свойства инулиназ

Общеизвестно, что высокие температуры и низкие значения рН предотвращают риск заражения нежелательной микрофлорой фруктозных сиропов и растворов фруктоолигосахаридов, улучшают растворимость некоторых субстратов, включая инулин, и могут нивелировать цвет некоторых продуктов.

Вместе с тем повышение температуры не только интенсифицирует скорость реакции образования фермент-субстратного комплекса, но также может приводить к денатурации энзима и снижению его каталитической функции.

© 2013 г. Артюхов В.Г., Холявка М.Г., Ковалева Т.А.

* **Автор для переписки:**

Холявка Марина Геннадьевна

кандидат биологических наук

Воронежский государственный университет

394006 Воронеж, Университетская площадь, 1

Тел.: +7 (473) 220-85-86

E-mail: holyavka@rambler.ru

Оптимальные значения температуры и рН среды для функционирования инулиназы

Продуцент	t, °C	рН	Источник литературы
<i>Cryptococcus aureus</i> G7a	50	5,0	[27, 80]
<i>Debaryomyces cantarellii</i>	50	4,0	[36]
<i>Debaryomyces phaffii</i>	50	4,0	[20]
<i>Debaryomyces hansenii</i> G7a1	50	5,0	[26]
<i>Kluyveromyces species</i> Y-85			[93]
EI	52	4,6	
EII	52	4,5	
Eexo	55	4,6	
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	55	4,75	[40, 73]
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	49–55	4,7–5,2	[90]
<i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 52466	50	5,0	[74]
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556	50; 70	4,5–5,0; 3,52	[79]
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	55	5,0	[57]
<i>Kluyveromyces marxianus</i> Y-303	50	4,7	[наши данные: 2, 6–8]
<i>Kluyveromyces marxianus</i> YS-1	50	5,5	[81]
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>	55	4,4	[52]
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>	60	3,5	[14]
<i>Pichia guilliermondii</i> OUC1	60	6,0	[26, 34]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1	55	5,0	[47]
<i>Yarrowia lipolytica</i> OUC2	60	5,0	[26]
<i>Alternaria alternate</i>	55	4,5	[41]
<i>Aspergillus awamori</i> -2250	60	4,0	[9]
<i>Aspergillus ficuum</i>	50	5,4	[55]
<i>Aspergillus fumigatus</i> isoform I	60	5,5	[29–32]
isoform II	60	6,0	
<i>Aspergillus niger</i> 319	60	5,0	[15]
<i>Aspergillus niger</i> A42	50	5,0–6,0	[72]
<i>Aspergillus niger</i> M89 (EI, EII, EIII и EIV)	55–60	4,0–5,0	[44]
<i>Aspergillus niger</i> n402	60	<4,0	[35]
<i>Chaetomium species</i> C34	55	6,0	[98]
<i>Chrysosporium species</i>	50	6,0–7,0	[84]
<i>Fusarium oxysporum</i> внеклеточная	37	6,2	[38, 39]
внутриклеточная	30	5,8	
<i>Penicillium species</i> TN-88	50; 55	5,2; 4,0	[58, 66]
<i>Penicillium janczewskii</i>	55	5,0	[76, 77]
<i>Rhizopus species</i> strain TN-96	40	5,5	[71]
<i>Streptomyces species</i> GNDU 1	60	5,5	[33]
<i>Arthrobacter species</i> H65-7	60	5,5	[97]
<i>Arthrobacter species</i> S37	50	7,5	[45]
<i>Arthrobacter globiformis</i> C11-1	55	5,5	[42]
<i>Arthrobacter ilicis</i> OKU17B	60	5,5	[46]
<i>Bacillus species</i> 11	>65	5,5–7,5	[88]
<i>Bacillus polymyxa</i> 722	40	7,0	[4, 5]
<i>Bacillus polymyxa</i> MGL21	35	7,0	[53]
<i>Bacillus smithii</i> T7	70	4,5	[28]
<i>Bifidobacterium infantis</i> ATCC 15697	37	6,0	[92]
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	47	5,5	[21, 56]
<i>Clostridium thermosuccinogenes</i>	58	6,8	[21]
<i>Escherichia coli</i> /pMSiftOptR1	60	5,25	[55]
<i>Escherichia coli</i> /pMSiftOptWT1	60	5,25	[55]
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> KP 1289	60	6,0	[86]
<i>Pseudomonas mucidolens</i>	55	6,0	[54]
<i>Cichorium intybus</i> L. 1-FEH IIa 1-FEH IIb	30–40	4,5–5,5	[89]

Примечания: ¹ в данный организм инулиназа была экспрессирована; ² при использовании сахарозы в качестве субстрата

К тому же с учетом того, что инулин обладает хорошей растворимостью только при температурах около 50 °С и выше, для промышленного получения фруктозы из инулинсодержащего растительного сырья целесообразно использовать термотолерантные микроорганизмы и их ферменты.

Исследование физико-химических свойств инулиназ различного происхождения необходимо для расширения горизонтов их эффективного практического применения. Оптимальные значения температуры и рН для инулиназ из различных продуцентов представлены в таблице 1. Большинство микроорганизмов синтезируют фермент с температурным оптимумом, находящимся в пределах 45–55 °С. Приводятся и более низкие значения: 35 °С – у энзимов из *Bacillus polymyxa* MGL21, 37 °С – из *Bifidobacterium infantis*, 40 °С – из *Rhizopus species* и *Bacillus polymyxa* 722 [4, 5, 53, 71, 92].

Температуры, применяемые в производственных циклах, не всегда совпадают с максимумами активности ферментов, часто приходится использовать более низкие значения, при которых энзим является стабильным в течение длительного времени; поэтому целесообразно выбирать те инулиназы, оптимум функционирования которых превышает предполагаемую температуру в био-реакторе. Наиболее перспективными для промышленного применения представляются такие термофильные микроорганизмы-продуценты, как *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia guilliermondii*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Streptomyces species*, *Arthrobacter species*, *Arthrobacter ilicis*, *Cladosporium cladosporioides*, которые продуцируют инулиназы с оптимумом функционирования до 60 °С. Существуют данные и о более высоких температурных оптимумах, в частности, для инулиназы из *Bacillus species* он находится в области выше 65 °С, а для энзимов, выделенных из *Arthrobacter ureafaciens* и *Bacillus smithii*, составляет 70 °С [9, 14, 15, 25–35, 46, 86, 88, 97].

Температурный и рН оптимумы для инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 отличались при использовании сахарозы (70 °С и рН 3,5) и инулина (50 °С и рН 4,5–5,0) в качестве субстратов. Этот феномен был также характерен и для β-фруктозидаз из других штаммов рода *Kluyveromyces* и прочих дрожжей [13, 79, 83, 95].

Инулиназы содержат большое количество ионизирующихся групп, поэтому они могут находиться в виде целого ряда ионных форм. Однако их каталитическая активность, как правило, проявляется в узком интервале значений рН. Распределение молекул энзима между

этим ионными формами зависит от констант ионизации (рК) отдельных групп и значения изоэлектрической точки (рI) самого белка. Изоэлектрические точки большинства инулиназ находятся в диапазоне рН 3,8–5,4 (табл. 2). Исключение составляет фермент, выделенный из *Aspergillus fumigatus* (isoform I), значение рI которого равно 8,8 [29].

Инулиназы, выделенные из различных продуцентов, отличаются по рН-оптимуму. Грибные и дрожжевые ферменты проявляют максимальную активность в кислой среде (рН 4,0–5,5), бактериальные – в более нейтральной (рН 5,5–7,0). Кислотоустойчивость бактериальных инулиназ значительно ниже дрожжевых и грибных. Энзимы бактерий устойчивы в диапазоне рН 4,5–7,5, грибные – в диапазоне рН 3,0–8,0, дрожжевые – при рН 3,0–6,5. Известно, что величина рН сильно влияет на соотношение моно- и олигосахаридов в растворе: при более кислой среде (рН 4,0) содержание фруктозы и инулобиозы увеличивается, тогда как при рН 6,0 – заметно снижается. Для промышленных процессов более целесообразно выбирать те инулиназы, у которых оптимум функционирования находится в интервале рН 4,0–5,0, совпадающем с зоной наибольшей стабильности фруктозы.

Таблица 2

Значения изоэлектрических точек (рI) для некоторых инулиназ

Продуцент	рI	Источник литературы
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	3,9–4,3	[75]
<i>Aspergillus awamori</i>	4,4	[11]
<i>Aspergillus fumigatus</i> isoform I	8,8	[29–32]
isoform II	4,5	
<i>Aspergillus niger</i>	5,0	[59]
<i>Aspergillus niger</i> 319	5,4	[15]
<i>Aspergillus niger</i> M89	4,15	[44]
	4,24	
	4,48	
	4,15	
<i>Chrysosporium pannorum</i>	3,8	[96]
<i>Bifidobacterium infantis</i> ATCC 15697	4,3	[92]
<i>Cichorium intybus</i> 1-FEH w1 1-FEH w2 1-FEH I	4,79	[89]
	4,78	
	6,5	
<i>Cichorium intybus</i> L. (1-FEH IIa, 1-FEH IIb)	5,24	[18, 19]

Кинетические свойства и субстратная специфичность инулиназы

В настоящее время принято считать, что инулиназы расщепляют главным образом инулин. Сахароза, инулоолигосахариды, раффиноза, мелицитоза, стахиоза, леван и леваноолигосахариды также гидролизуются, но с меньшей скоростью [1].

G. Claessens et al. (1990) показали, что инулиназа из *Cichorium intibus* обладает высокой специфичностью по отношению к инулину и неактивна с другими фруктозосодержащими олигосахаридами. Из *Aspergillus niger* 12 был получен фермент, который не гидролизует сахарозу. В работе А.К. Gupta et al. (1990) отмечена каталитическая способность фермента из *Fusarium oxysporum* по отношению к сахарозе и раффинозе [16, 39].

Экзоинулиназа из *Aspergillus awamori* гидролизует как β -2,1-, так и β -2,6-фруктозидные связи в олигофруктозидах. Способность расщеплять леван также отмечена и для эндоинулиназы, выделенной из штамма рода *Penicillium*. Однако высокомолекулярный ей фермент из *Aspergillus niger* не проявлял леван-гидролизующей способности. Очищенный фермент из *Bacillus polymyxa* MGL21, кроме инулина, гидролизует сахарозу, леван и раффинозу [11, 53, 90].

Показано, что препарат инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* YS-1 является активным с 2% инулином, сахарозой и раффинозой, тогда как он был не способен к гидролизу мальтозы, лактозы и крахмала. Фермент проявлял максимальную активность с сахарозой (177,6%) и раффинозой (69,0%) относительно его каталитической способности с инулином, которая была принята за 100%. Фермент из *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 был активен по отношению к сахарозе, раффинозе, стахиозе и инулину [78, 81].

M. Warchol et al. (2002) вывели из *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697 препарат, проявляющий β -фруктофуранозидазную и инвертазную активности, причем β -фруктофуранозидазная была выше, чем инвертазная [92].

Инулиназа из *Rhizopus species* strain TN-96 гидролизует раффинозу (с активностью 0,5% от активности по отношению к инулину), но не расщепляла леван [71]. G.Q. Zhang et al. (2004) вывели из *Chaetomium species* C34 эндоинулиназу, которая гидролизует инулин до инулоолигосахаридов, но была неактивна по отношению к раффинозе [98].

Установлено, что в присутствии высоких концентраций сахарозы и различных фруктоолигосахаридов

инулиназы из *Penicillium palitans* и *Penicillium cyclopium* способны катализировать фруктозилтрансферазную реакцию с образованием новых фруктанов. Значение k_{cat} для инулиназы из *Aspergillus niger* при гидролизе сахарозы и трансфруктозилровании равны соответственно $328,9 \pm 30,7$ и $627,3 \pm 62,2$ с⁻¹. Фермент частично расщеплял леван до фруктозы и раффинозу с образованием фруктозы и мелибиозы (α -D-галактоза-(1,6)- α -D-глюкоза) [3, 35].

Было также продемонстрировано, что сравнительная активность фермента из *Aspergillus awamori* в отношении инулина, инулопентозы, инулотетрозы, инулотриозы, инулобиозы соответствует 370:16:8:3:1; основным продуктом гидролиза всех субстратов является фруктоза. Для инулиназ из *Kluyveromyces marxianus* и *Bacillus licheniformis* выявлено, что их активность по отношению к инулоолигосахаридам зависит от длины цепи, а сродство к субстрату повышается с увеличением степени полимеризации [1, 9, 10].

Исследование гидролизатов инулоолигосахаридов показало, что эндоинулиназа из *Aspergillus ficuum* гидролизует инулогексозу (DP6) до DP3, инулогептозу (DP7) — до DP4 и DP3 и инулооктозу (DP8) — до DP3 и DP5. Это означает, что фермент практически количественно гидролизует олигосахарид между 3 и 4 остатками со стороны его восстановленного конца, что можно ожидать в том случае, если в молекуле фермента существует, по крайней мере, 8 сахаридсвязывающих центров и расщепление связанного субстрата происходит между 3 и 4 центрами [10].

Примечательно, что кинетические свойства инулиназ зависят от образования ими надмолекулярной структуры. В частности, мономер инулиназы из *Arthrobacter species* S37 обладал k_{cat} ($2,79 \pm 0,57$) $\times 10^4$ мин⁻¹ и K_m $0,55 \pm 0,11$ мМ, а для димера были характерны k_{cat} ($3,44 \pm 0,08$) $\times 10^4$ мин⁻¹ и K_m $0,29 \pm 0,05$ мМ [49].

Так как свойства инулиназы и инвертазы сходны, для того чтобы четко их различать, применяют так называемое I/S отношение, то есть отношение активностей при использовании инулина (I) и сахарозы (S) в качестве субстратов. Инулиназой считают фермент, имеющий коэффициент I/S больше 10^{-2} , а инвертазой — меньше 10^{-4} . Ряд авторов использует S/I отношение. E.J. Vandamme и D.G. Deruyck (1983) показали, что отношение активности к сахарозе и инулину обычно значительно выше для инвертаз (≥ 1500) и ниже для инулиназ (≤ 10) [90]. Установлено, что S/I отношение зависит от pH, температуры и метода определения ферментативной активности [3, 83, 94]. Значения I/S и S/I для некоторых инулиназ представлены в таблице 3.

S/I и I/S отношения для некоторых инулиназ

Продуцент	Отношение		Источник Литературы
	S/I	I/S	
<i>Candida kefyr</i>		0,02	[68–70]
<i>Candida salmenticensis</i>		0,05	[37]
<i>Debaryomyces cantarellii</i>		0,125 0,11	[13, 36]
<i>Debaryomyces phaffii</i>		0,13	[20]
<i>Kluyveromyces fragilis</i>		0,04	[67, 95]
<i>Kluyveromyces fragilis</i>		0,29	[61]
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>	8,2		[52]
<i>Pichia pastoris</i>		0,19	[59]
<i>Alternaria alternate</i>		0,5	[41]
<i>Aspergillus ficuum</i> Exo I; II; III; IV; V Endo I; II; III		0,16-0,36 0,86-2,92	[24]
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,22		[29]
<i>Aspergillus niger</i>	2,3	0,8	[35, 63, 64]
<i>Aspergillus niger</i> 319		0,348	[15]
<i>Chaetomium species</i> C34		20	[98]
<i>Cladosporium cladosporioides</i>		0,31-0,36	[25]
<i>Penicillium species</i> P I P II P III		1,95 0,65 1,06	[65]
<i>Rhizopus species</i> strain TN-96		53	[71]
<i>Bacillus polymyxa</i> MGL21	2		[53]
<i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>phaseoli</i>		2,6	[62]

Из клубней *Helianthus tuberosus* был выделен ряд микроорганизмов, синтезировавших инулиназу. Среди них был плесневый гриб, дрожжи, актиномицет и бактерия (KU-F1, KU-Y1, KU-A1 и KU-B3). Для штаммов KU-F1, KU-Y1, KU-A1 I/S отношение составляло соответственно 0,19, 0,11 и 0,3. Бактериальный штамм KU-B3 не проявлял инвертазной активности [82].

Возможно, инулиназа содержит различные центры связывания инулина и сахарозы, перекрывающие друг друга или близко расположенные. При совместном присутствии сахарозы и инулина оба субстрата конкурируют друг с другом, что приводит к снижению ферментативной активности энзима.

М. Ettalibi и J.C. Varatti (1990) для того, чтобы отличить инулиназу от инвертазы, предложили использовать другой критерий — отношение констант k_{cat}/K_m : если деление значения k_{cat}/K_m при гидролизе ферментом инулина на значение k_{cat}/K_m при расщеплении сахарозы

дает число меньше 1, то фермент считается инвертазой, если больше 1 — инулиназой [23].

Такие важнейшие кинетические параметры, как K_m и V_{max} , при гидролизе инулина и других субстратов для инулиназ из различных продуцентов, представлены и собраны в таблице 4. Значение K_m для инулиназы по отношению к инулину располагается в диапазоне от 0,003 мМ до 86,9 мМ. Для большинства промышленных ферментов K_m составляет 0,01–100 мМ, что дает основание считать некоторые инулиназы перспективными для использования в современных технологических линиях [11, 52].

Мы не сделали сравнительный анализ значений максимальных скоростей реакции гидролиза инулина (V_{max}) для энзимов, выделенных из различных продуцентов, так как в литературных источниках данный параметр представлен в несопоставимых друг с другом единицах измерения.

Значения K_m и V_{max} для инулиназ из различных продуцентов

Продуцент	K_m , мМ	V_{max}	Источник литературы
<i>Candida salmenticensis</i>	17		[90]
<i>Cryptococcus aureus</i> G7a	20,06 ⁽⁸⁾	8,5 мкг/мин.	[80]
<i>Debaryomyces cantarellii</i>	15 ⁽⁴⁾ 55 ^(4,5) 18 ^(4,7)		[36]
<i>Debaryomyces phaffii</i>	12		[20]
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	7,7–10		[50]
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	13,3		[12]
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	0,31		[90]
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556	11,9 15,7 ⁽³⁾ 8,2 ⁽⁵⁾ 9,7 ⁽⁷⁾	122 ед./мл ⁽³⁾ 38 ед./мл ⁽⁵⁾ 32 ед./мл ⁽⁷⁾	[79, 78]
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CDBB-L-278	3,04		[17]
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-1196	3,92 11,9 ⁽⁵⁾		[51]
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	7,1 13 ⁽³⁾	17,79 М/мин. 10,72 М/мин. ⁽³⁾	[57, 85]
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>	86,9 4,58 ⁽³⁾ 7,41 ⁽⁵⁾	53,7 ед./мг 441 ед./мг ⁽³⁾ 240 ед./мг ⁽⁵⁾	[52]
<i>Kluyveromyces marxianus</i> Y-303	0,22	102 мкмоль/(мг·мин.)	[наши данные: 8]
<i>Kluyveromyces marxianus</i> YS-1	3,4 25,3 ⁽⁵⁾ 27 ⁽⁷⁾	7,6 мкМ/мин. 16,6 мкМ/мин. ⁽⁵⁾ 2 мкМ/мин. ⁽⁷⁾	[81]
<i>Pichia guilliermondii</i>		100 мкг/мин.	[34]
<i>Alternaria alternata</i>	66		[41]
<i>Aspergillus awamori</i>	0,15	172 мкМ/(мг·мин.)	[9]
<i>Aspergillus awamori</i> var. 2250	0,003 8 ⁽⁵⁾ 2,08 ⁽⁶⁾ 10,1 ⁽⁷⁾	175 мкМ/(мг·мин.) 120 мкМ/(мг·мин.) ⁽⁵⁾ 1,2 мкМ/(мг·мин.) ⁽⁶⁾ 80 мкМ/(мг·мин.) ⁽⁷⁾	[11]
<i>Aspergillus ficuum</i>	8,1	773 ед./мг	[87]
<i>Aspergillus ficuum</i>	4,75	833,3 мкМ/(мл·мин.)	[60]
<i>Aspergillus fumigatus</i> isoform I	0,25 0,85 ⁽³⁾ 0,71 ⁽⁵⁾ 0,66 ⁽⁷⁾	333,3 ед./мг 105 ед./мг ⁽³⁾ 52 ед./мг ⁽⁵⁾ 108 ед./мг ⁽⁷⁾	[29–32]
isoform II	1,25		
<i>Aspergillus niger</i>	31,7 ⁽³⁾ 344 ⁽⁴⁾	973,2 мкМ/(мг·мин.) ⁽³⁾ 657 мкМ/(мг·мин.) ⁽⁴⁾	[35]
<i>Aspergillus niger</i>	2,57		[99]
<i>Aspergillus niger</i> 319	6,25	67,11 мкМ/(мг·мин.)	[15]
<i>Chaetomium species</i> C34	0,199	115 мкМ/(мг·мин.)	[98]
<i>Penicillium species</i>	0,2		[66]
<i>Penicillium janczemskii</i> I (48 кДа)	0,43 18,7 ⁽⁵⁾		[77, 76]
II (66 кДа)	0,87 18,5 ⁽⁵⁾		
<i>Rhizopus species</i> strain TN-96	0,9		[71]
<i>Arthrobacter species</i> Bu0141	2,3 ⁽²⁾		[43]
<i>Arthrobacter species</i> H65-7	0,8 ⁽⁴⁾		[97]
<i>Arthrobacter species</i> S37 мономер димер	0,55 0,29		[49]

<i>Bacillus species</i> SNU-7	2,28		[48]
<i>Bacillus polymyxa</i> MGL21	0,7	2500 мкМ/(мг·мин.)	[53]
<i>Bacillus smithii</i> T7	4,17	833 ед./мг	[28]
<i>Bacillus subtilis</i>	8 56 ⁽⁵⁾		[91]
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	0,012		[22]
<i>Clostridium acetobutylicum</i> внеклеточная внутриклеточная	6; 32 ⁽⁵⁾ 7; 44 ⁽⁵⁾		[21]
<i>Escherichia coli</i> /ρMSiftOptWT ⁽¹⁾	5,1 ⁽²⁾	130 мкМ/(л·мин.)	[55]
<i>Escherichia coli</i> /ρMSiftOptR ⁽¹⁾	4,5 ⁽²⁾	140 мкМ/(л·мин.)	[55]
<i>Pseudomonas mucidolens</i>	11,5		[54]

Примечания: ⁽¹⁾ в данный организм инулиназа была экспрессирована; ⁽²⁾ для инулина с массой 1539 г/моль; ⁽³⁾ по отношению к сахарозе; ⁽⁴⁾ для трансфруктозилирующей активности; ⁽⁵⁾ по отношению к раффинозе; ⁽⁶⁾ по отношению к левану; ⁽⁷⁾ по отношению к стахиозе; ⁽⁸⁾ мг/мл

Заключение

Анализ данных литературы позволяет сделать вывод, что в настоящее время хорошо исследованы только инулиназы, выделенные из мезофильных микроорганизмов, тогда как наши знания о продуцентах, развивающихся в экстремальных условиях, до сих пор слишком ограничены. Экстремофильные микроорганизмы, которые способны жить при высоких температурах, экстремальных значениях рН или высоких концентрациях соли, могут быть очень полезными для получения ферментов, необходимых для переработки инулинсодержащего растительного сырья. Они продуцируют биокатализаторы (амилазы, пуллулазазы, целлюлазы, ксиланазы, инулиназы), которые обладают перспективными для промышленных процессов особенностями: обычно устойчивы к действию высоких температур, химических денатурантов и кислых сред и поэтому могут служить инструментом для осуществления уникальных биотехнологических процессов.

Вопросы, касающиеся кинетики ферментативного катализа и субстратной специфичности инулиназ и родственных им энзимов, в последние годы выступают на передний план, так как моделирование технологических процессов и создание новых биокатализаторов невозможно без решения задач подобного рода. Однако известные работы о кинетических характеристиках реакций гидролиза инулиназами различных субстратов немногочисленны. Окончательно не решен вопрос об их специфичности, максимальной каталитической способности и степени сродства к ряду поли-, олиго- и дисахаридов.

В представленном обзоре с позиций физико-химической биологии и кинетики биологических процессов обсуждены перспективы применения инулиназ различного происхождения в биотехнологии ферментных про-

цессов при создании новых технологических разработок, конструировании биореакторов и проектировании более эффективных биокатализаторов для промышленности и аналитических целей.

Литература

1. Абелян В.А., Манукян Л.С. Характеристика экзоинулаз *Kluveromyces marxianus* и *Bacillus licheniformis* // Биохимия. — 1996. — Т. 61. — № 6. — С. 1028–1036.
2. Артюхов В.Г., Ковалева Т.А., Холявка М.Г. и др. Термическая инактивация свободной и иммобилизованной инулиназы // Прикладная биохимия и микробиология. — 2010. — Т. 46. — № 4. — С. 422–427.
3. Балаян А.М., Пивазян Л.А., Хачатурян Р.Н. и др. Инулиназы *Penicillium palitans* и *Penicillium cycloporium* // Биохимия. — 1996. — Т. 61. — № 5. — С. 895–902.
4. Жеребцов Н.А., Абрамова Н.И., Шеламова С.А. Выделение экстрацеллюлярной бактериальной инулиназы и изучение ее физико-химических свойств // Биотехнология. — 2002. — № 3. — С. 13–20.
5. Жеребцов Н.А., Шеламова С.А., Абрамова И.Н. Биосинтез инулиназ бактериями рода *Bacillus* // Прикладная биохимия и микробиология. — 2002. — Т. 38. — № 6. — С. 634–638.
6. Ковалева Т.А. Кинетико-термодинамические аспекты катализа полисахаридов свободными и иммобилизованными амилазами // Биофизика. — 2000. — Т. 45. — № 3. — С. 439–444.
7. Ковалева Т.А., Холявка М.Г., Таха А.С. Исследование иммобилизации инулиназы на ионогенных и неионогенных носителях // Сорбционные и хроматографические процессы. — 2007. — Т. 7. — Вып. 5. — С. 804–810.
8. Ковалева Т.А., Холявка М.Г., Таха А.С. Разработка гетерогенного катализатора реакции гидролиза инулина на основе иммобилизованного препарата инулиназы из *Kluveromyces marxianus* // Биотехнология. — 2007. — № 3. — С. 80–87.

9. Корнеева О.С. Карбогидразы: препаративное получение, структура и механизм действия на олиго- и полисахариды. — Воронеж: Изд-во Воронежского государственного университета, 2001. — 184 с.
10. Парк С., Хен И., Ким Х. и др. Остатки Trp 17 и Glu 20 консервативной последовательности WMN(D/E)PN необходимы для активности эндоинулиназы из *Aspergillus ficuum* // Биохимия. — 2003. — Т. 68. — № 6. — С. 805–809.
11. Arand M., Golubev A.M., Neto J.R. et al. Purification, characterization, gene cloning and preliminary X-ray data of the exo-inulinase from *Aspergillus awamori* // Biochem. J. — 2002. — Vol. 362. — No. 1. — P. 131–135.
12. Bajpai P., Margaritis A. Characterization of molecular-sieve-bound inulinase // J. Ferment. Technol. — 1987. — Vol. 65. — No. 20. — P. 239–242.
13. Beluche I., Guiraud J.P., Galzy P. Inulinase activity of *Debaryomyces cantarellii* // Folia Microbiol. — 1980. — Vol. 25. — No. 1. — P. 32–39.
14. Cazetta M.L., Martins P.M., Monti R. et al. Yacon (*Polymnia sanchifolia*) extract as a substrate to produce inulinase by *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* // Journal of Food Engineering. — 2005. — Vol. 66. — P. 301–305.
15. Chen G., Sun Z., Wang Y. et al. Purification and properties of inulinase from *Aspergillus niger* // Wei Sheng Wu Xue Bao. — 1997. — Vol. 37. — No. 5. — P. 362–367.
16. Claessens G., Van Laere A., De Proft M. Purification and properties of an inulinase from chicory roots (*Cichorium intybus* L.) // J. Plant Physiol. — 1990. — Vol. 136. — No. 1. — P. 35–39.
17. Cruz-Guerrero A., GarciaPena I., Barzana E. et al. *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278: a wild inulinase hyperproducing strain // Journal of Fermentation and Bioengineering. — 1995. — Vol. 80. — No. 2. — P. 159–163.
18. De Roover J., De Winter M., Van Laere A. et al. Purification and properties of a second fructan exohydrolase from the roots of *Cichorium intybus* L. // Physiol. Plant. — 1999. — Vol. 106. — P. 28–34.
19. De Roover J., Van Laere A., Van den Ende W. Effect of defoliation on fructan pattern and fructan metabolizing enzymes in chicory roots (*Cichorium intybus*) // Physiol. Plant. — 1999. — Vol. 106. — P. 158–163.
20. Demeulle S., Guiraud J.P., Galzy P. Study of inulase from *Debaryomyces phaffii* Capriotti // Z. Allg. Mikrobiol. — 1981. — Vol. 21. — No. 3. — P. 181–189.
21. Drent W.J., Lahpor G.A., Wiegant W.M. et al. Fermentation of inulin by *Clostridium thermosuccinogenes* sp. nov., a thermophilic anaerobic bacterium isolated from various habitats // Applied and Environmental Microbiology. — 1991. — Vol. 57. — No. 2. — P. 455–462.
22. Efstathiou I., Reyssat G., Truffaut N. A study of inulinase activity in the *Clostridium acetobutylicum* strain ABKn8 // Appl Microbiol Biotechnol. — 1986. — Vol. 25. — No. 2 — P. 143–149.
23. Ettalibi M., Baratti J.C. Molecular and kinetic properties of *Aspergillus ficuum* inulinases // Agric. Biol. Chem. — 1990. — Vol. 54. — No. 1. — P. 61–68.
24. Ettalibi M., Baratti J.C. Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinases and endoinulinases of *Aspergillus ficuum* // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 1987. — Vol. 26. — P. 13–20.
25. Ferreira M.S. De Andrade A.V., Kennedy J.F. Properties of a thermostable nonspecific fructofuranosidase produced by *Cladosporium cladosporioides* cells for hydrolysis of Jerusalem artichoke extract // Applied Biochemistry and Biotechnology. — 1991. — Vol. 31. — P. 1–9.
26. Gao L., Chi Z., Sheng J. et al. Inulinase-producing marine yeasts: evaluation of their diversity and inulin hydrolysis by their crude enzymes // Microb. Ecol. — 2007. — Vol. 54. — No. 4. — P. 722–729.
27. Gao L., Chi Z., Sheng J. et al. Single-cell protein production from Jerusalem artichoke extract by a recently isolated marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and its nutritive analysis // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2007. — Vol. 77. — P. 825–832.
28. Gao W., Bao Y., Liu Y. et al. Characterization of thermostable endoinulinase from a new strain *Bacillus smithii* T7 // Appl. Biochem. Biotechnol. — 2009. — Vol. 157. — No. 3. — P. 498–506.
29. Gill P.K., Manhas R.K., Singh J. et al. Purification and characterization of an exoinulinase from *Aspergillus fumigatus* // Applied Biochemistry and Biotechnology. — 2004. — Vol. 117. — No. 1. — P. 19–32.
30. Gill P.K., Manhas R.K., Singh P. Comparative analysis of thermostability of extracellular inulinase activity from *Aspergillus fumigatus* with commercially available (Novozyme) inulinase // Bioresour. Technol. — 2006. — Vol. 97. — No. 2. — P. 355–358.
31. Gill P.K., Manhas R.K., Singh P. Hydrolysis of inulin by immobilized thermostable extracellular exoinulinase from *Aspergillus fumigatus* // J. Food Engineer. — 2006. — Vol. 76. — P. 369–375.
32. Gill P.K., Manhas R.K., Singh P. Purification and properties of a heat-stable exoinulinase isoform from *Aspergillus fumigatus* // Bioresource Technology. — 2006. — Vol. 97. — P. 894–902.
33. Gill P.K., Sharma A.D., Harchand R.K. et al. Effect of media supplements and culture conditions on inulinase production by an actinomycete strain // Bioresour. Technol. — 2003. — Vol. 87. — No. 3. — P. 359–362.
34. Gong F., Chi Z.M., Sheng J. et al. Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the purified inulinase // Biotechnol. Bioproc. Eng. — 2008. — Vol. 13. — P. 533–539.

35. Goosen C. Identification and characterization of glycoside hydrolase family 32 enzymes from *Aspergillus niger*, 2007 (<http://dissertations.ub.rug.nl/faculties/science/2007/c.goosen/>).
36. Guiraud J.P., Bernit C., Galzy P. Inulinase of *Debaryomyces cantarellii* // *Folia Microbiol.* – 1982. – Vol. 27. – No. 1. – P. 19–24.
37. Guiraud J.P., Viard-Gaudin C., Galzy P. Etude de l'Inulinase de *Candida salmencensis* Van Uden et Buckley // *Agric. Biol. Chem.* – 1980. – Vol. 44. – P. 1245–1252.
38. Gupta A.K., Nagpal B., Kaur N. et al. Mycelial and extracellular inulinases from *Fusarium oxysporum* grown on aqueous extract of *Cichorium intybus* roots // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* – 1988. – Vol. 42. – No. 1. – P. 69–76.
39. Gupta A.K., Rathore P., Kaur N. et al. Production, thermal stability and immobilisation of inulinase from *Fusarium oxysporum* // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* – 1990. – Vol. 47. – No. 3. – P. 245–257.
40. Gupta A.K., Singh D.P., Kaur N. et al. Production, purification and immobilization of inulinase from *Kluyveromyces fragilis* // *J. Chem. Tech. Biotechnol.* – 1994. – Vol. 59. – No. 4. – P. 377–385.
41. Hamdy H.S. Purification and some important characters of extracellular inulinase of *Alternaria alternata* (Fr.) // *Indian J. Exp. Biol.* – 2002. – Vol. 40. – No. 12. – P. 1393–1398.
42. Haraguchi K., Kishimoto M., Seki K. et al. Purification and properties of inulin fructotransferase (depolymerizing) from *Arthrobacter globiformis* C11-1 // *Agric. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 52. – P. 291–292.
43. Jahnz U. Screening-Automation auf Basis Hohlkugel verkapselter Zellen und enzymatische Bildung von Difruktoseanhydrid III aus Inulin unter Thermophilen Bedingungen (Screening, Charakterisierung, Immobilisierung), Dissertation Technische Universitaet Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig. – 2001. – (http://rzbl04.biblio.etc.tu-bs.de:8080/docportal/servlets/MCRFileNodeServlet/DocPortal_derivate_00001267/Document.pdf;jsessionid=56B12F6D1A4996AD12211CBD2CBE2083).
44. Ji Y., Zhao X. Purification and properties of inulinases from *Aspergillus niger* M89 // *Wei Sheng Wu Xue Bao.* – 1998. – Vol. 38. – No. 2. – P. 120–125.
45. Kang S.I., Chang Y.J., Oh S.J. et al. Purification and properties of an endo-inulinase from an *Arthrobacter* sp. // *Biotechnol. Lett.* – 1998. – Vol. 20. – P. 983–986.
46. Kawamura M., Takahashi S., Uchiyama T. Purification and same properties of inulin fructotransferase (depolymerizing) from *Arthrobacter ilicis* // *Agric. Biol. Chem.* – 1988. – Vol. 52. – P. 3209–3210.
47. Kim B., Kim H., Nam S. Continuous production of fructose-syrups from inulin by immobilized inulinase from recombinant *Saccharomyces cerevisiae* // *Biotechnol. Bioprocess Eng.* – 1997. – Vol. 2. – P. 90–93.
48. Kim K.Y., Koo B.S., Jo D. et al. Cloning, expression and purification of exo-inulinase from *Bacillus* sp. Snu-7 // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2004. – Vol. 14. – No. 2. – P. 344–349.
49. Kim K.Y., Rhee S., Kim S.I. Role of the N-terminal domain of endoinulinase from *Arthrobacter* sp. S37 in regulation of enzyme catalysis // *J. Biochem.* – 2005. – Vol. 138. – P. 27–33.
50. Kim W.Y., Byun M.S. Hydrolysis of inulin from Jerusalem artichoke by inulinase immobilized on aminoethylcellulose // *Enzyme Microb. Technol.* – 1982. – Vol. 4. – No. 2. – P. 239–244.
51. Ku M.A., Hang Y.D. Effect of inulin on yeast inulinase production in sauerkraut brine // *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* – 1994. – Vol. 10. – No. 3. – P. 354–355.
52. Kushi R.T., Monti R., Contiero J. Production, purification and characterization of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* // *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.* – 2000. – Vol. 25. – P. 63–69.
53. Kwon H.J., Jeon S.J., You D.J. et al. Cloning and characterization of an exoinulinase from *Bacillus polymyxa* // *Biotechnol. Lett.* – 2003. – Vol. 25. – No. 2. – P. 155–159.
54. Kwon Y.M., Kim H.Y., Choi Y.J. Cloning and characterization of *Pseudomonas mucidolens* exoinulinase // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2000. – Vol. 10. – No. 2. – P. 238–243.
55. Letca D. Production of di-D-Fructofuranose 1,2':2,3' Dianhydride (DFA III) using Recombinant Inulase II: dissertation. – Bukarest, 2004. – 175 c. – (http://deposit.dnb.de/cgi-bin/dokserv?idn=970064837&dok_var=d1&dok_ext=pdf&filename=970064837.pdf).
56. Looten P., Blanchet D., Vandecasteele J.P. The β -fructofuranosidase activities of a strain of *Clostridium acetobutylicum* grown on inulin // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1987. – Vol. 25. – P. 419–425.
57. Mazutti M., Ceni G., Di Luccio M. et al. Production of inulinase by solid-state fermentation: effect of process parameters on production and preliminary characterization of enzyme preparations // *Bioprocess. Biosyst. Eng.* – 2007. – Vol. 30. – No. 5. – P. 297–304.
58. Moriyama S., Akimoto H., Suetsugu N. et al. Purification and properties of an extracellular exoinulinase from *Penicillium* sp. strain TN-88 and sequence analysis of the encoding gene // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2002. – Vol. 66. – No. 9. – P. 1887–1896.
59. Moriyama S., Tanaka H., Uwataki M. et al. Molecular cloning and characterization of an exoinulinase gene from *Aspergillus niger* strain 12 and its expression in *Pichia pastoris* // *J. Biosci. Bioeng.* – 2003. – Vol. 96. – P. 324–331.
60. Mutanda T., Wilhelmi B., Whiteley C.G. Controlled production of fructose by an exoinulinase from *Aspergillus ficuum*

- // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2009. – Vol. 159. – No. 1. – P. 65–77.
61. *Nahm B.H., S.M. Byun* Purification and characterization of inulase from *Kluyveromyces fragilis* // Korean Biochem. J. – 1977. – Vol. 10. – P. 95–108.
 62. *Naidoo K., Ayyachamy M., Permaul K. et al.* Enhanced fructooligosaccharides and inulinase production by a *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* KM 24 mutant // Bioprocess Biosyst. Eng. – 2009. – Vol. 32. – No. 5. – P. 689–695.
 63. *Nakamura T., Hoashi S., Nakatsu S.* Culture conditions for inulase production by *Aspergillus* (P III) // Nippon Nogeikagaku Kaishi. – 1978. – Vol. 52. – P. 105–110.
 64. *Nakamura T., Kurokawa T., Nakatsu S. et al.* Crystallization and general properties of an extracellular inulase from *Aspergillus* sp. IV. Studies on microbial inulase // Nippon Nogeikagaku Kaishi. – 1978. – Vol. 52. – P. 159–166.
 65. *Nakamura T., Nakatsu S.* General properties of extracellular inulase from *Penicillium* (studies of microbial inulase, Part II) // J. Agr. Chem. Soc. Jap. – 1977. – Vol. 51. – No. 12. – P. 681–689.
 66. *Nakamura T., Shitara A., Matsuda S. et al.* Production, purification and properties of an endoinulinase of *Penicillium* sp. TN88 that liberates inulotriose // Journal of Fermentation and Bioengineering. – 1997. – Vol. 84. – No. 4. – P. 313–318.
 67. *Negoro H.* Purification and characterization of inulinase from *Kluyveromyces fragilis* // J. Ferment. Technol. – 1978. – Vol. 56. – P. 102–107.
 68. *Negoro H.* Purification and enzymatic properties of extracellular β -fructofuranosidase from *Candida Kefyr* // J. Ferm. Technol. – 1973. – Vol. 51. – P. 879–886.
 69. *Negoro H., Kito E.* Purification and enzymatic properties of intracellular β -fructofuranosidase from *Candida kefir* // J. Ferment. Technol. – 1973. – Vol. 51. – P. 103–110.
 70. *Negoro H., Kito E.* β -Fructofuranosidase from *Candida kefir* // J. Ferment. Technol. – 1973. – Vol. 51. – P. 96–102.
 71. *Ohta K., Suetsugu N., Nakamura T.* Purification and properties of an extracellular inulinase from *Rhizopus* sp. strain TN-96 // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2002. – Vol. 94. – No. 1. – P. 78–80.
 72. *Ongen-Baysal G., Sukan Suha S., Vassilev N.* Production and properties of inulinase from *Aspergillus niger* // Biotechnology Letters. – 1994. – Vol. 16. – No. 3. – P. 275–280.
 73. *Pandey A., Soccol C.R., Selvakumar P. et al.* Recent developments in microbial inulinases. Its production, properties, and industrial applications // Appl. Biochem. Biotechnol. – 1999. – Vol. 81. – No. 1. – P. 35–52.
 74. *Pessoa A., Vitolo M.* Inulinase from *Kluyveromyces marxianus*: culture medium composition and enzyme extraction // Braz. J. Chem. Eng. – 1999. – Vol. 16. – P. 237–245.
 75. *Pessoa A., Vitolo M.* Separation of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using reversed micellar extraction // Biotechnology Techniques. – 1997. – Vol. 11. – No. 6. – P. 421–422.
 76. *Pessoni R.A., Braga M.R., Figueiredo-Ribeiro R.C.* Purification and properties of exoinulinases from *Penicillium janczewskii* growing on distinct carbon sources // Mycologia. – 2007. – Vol. 99. – No. 4. – P. 493–503.
 77. *Pessoni R.A., Figueiredo-Ribeiro R.C., Braga M.R.* Extracellular inulinases from *Penicillium janczewskii*, a fungus isolated from the rhizosphere of *Vernonia herbacea* (Asteraceae) // J. Appl. Microbiol. – 1999. – Vol. 87. – No. 1. – P. 141–147.
 78. *Rouwenhorst R.J., Visser L.E., Van Der Baan A.A. et al.* Production, distribution and kinetic properties of inulinase in continuous cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 // Appl. Environ. Microbiol. – 1988. – Vol. 54. – No. 5. – P. 1131–1137.
 79. *Rouwenhorst R.J., Hensing M., Verbakel J. et al.* Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 // Appl. Environ. Microbiol. – 1990. – Vol. 56. – No. 11. – P. 3337–3345.
 80. *Sheng J., Chi Z., Gong F. et al.* Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by the purified inulinase // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2008. – Vol. 144. – No. 2. – P. 111–121.
 81. *Singh R.S., Dhaliwal R., Puri M.* Partial purification and characterization of exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS1 for preparation of high-fructose syrup // J. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – Vol. 17. – No. 5. – P. 733–738.
 82. *Sirisansaneeyakul S., Worawuthiyanan N., Vanichsriratana W. et al.* Production of fructose from inulin using mixed inulinases from *Aspergillus niger* and *Candida guilliermondii* // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – Vol. 23. – P. 543–552.
 83. *Snyder H.E., Phaff H.J.* Studies on a β -fructosidase (inulinase) produced by *Saccharomyces fragilis* // Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol. – 1960. – Vol. 26. – P. 433–452.
 84. *Thonart P., Artois C.* Inulin hydrolysis by an immobilized yeast cell reactor // Biotechnol. Bioeng. Symp. – 1985. – Vol. 15. – P. 409–418.
 85. *Treichel H., Mazutti M.A., Filho Maugeri F. et al.* Technical viability of the production, partial purification and characterisation of inulinase using pretreated agroindustrial residues // Bioprocess. Biosyst. Eng. – 2009. – Vol. 32. – No. 4. – P. 425–433.
 86. *Tsujimoto Y., Watanabe A., Nakano K. et al.* Gene cloning, expression, and crystallization of a thermostable exo-inulinase from *Geobacillus stearothermophilus* KP1289 // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2003. – Vol. 62. – No. 2. – P. 180–185.
 87. *Uhm T.B., Chung M.S., Lee S.H. et al.* Purification and characterization of *Aspergillus ficuum* endoinulinase // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 1999. – Vol. 63. – No. 1. – P. 146–151.

88. *Uzunova K., Vassileva A., Kambourova M. et al.* Production and properties of a bacterial thermostable exo-inulinase // *Z. Naturforsch.* – 2001. – Vol. 56. – No. 11. – P. 1022–1028.
89. *Van der Ende W., Clerens S., Vergauwen R. et al.* Fructan 1-exohydrolases. β -(2,1)-trimmers during graminan biosynthesis in stems of wheat? Purification, characterization, mass mapping and cloning of two fructan 1-exohydrolase isoforms // *Plant Physiology.* – 2003. – Vol. 131. – P. 621–631.
90. *Vandamme E.J., Derycke D.G.* Microbial inulinase: fermentation process, properties and applications // *Adv. Appl. Microbiol.* – 1983. – Vol. 29. – P. 139–176.
91. *Vullo D.L., Coto C.E., Sinerizz F.* Characteristics of an inulinase produced by *Bacillus subtilis* 430A, a strain isolated from the rhizosphere of *Vernonia herbacea* (Vell Rusby) // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1991. – Vol. 57. – No. 8. – P. 2392–2394.
92. *Warchol M., Perrin S., Grill J.P. et al.* Characterization of a purified beta-fructofuranosidase from *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697 // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2002. – Vol. 35. – No. 6. – P. 462–467.
93. *Wei W., Yu X., Dai Y. et al.* Purification and properties of inulinase from *Kluyveromyces* sp. Y-85 // *Wei Sheng Wu Xue Bao.* – 1997. – Vol. 37. – No. 6. – P. 443–448.
94. *Workman W.E., Day D.F.* Enzymatic hydrolysis of inulin to fructose by glutaraldehyde fixed yeast cells // *Biotechnology and Bioengineering.* – 1984. – Vol. 28. – No. 8. – P. 905–910.
95. *Workman W.E., Day D.F.* Purification and properties of the β -fructofuranosidase from *Kluyveromyces fragilis* // *FEBS Letters.* – 1983. – Vol. 160. – P. 16–20.
96. *Xiao R., Tanida M., Takao S.* Purification and characteristics of two exo-inulinase from *Chrysosporium pannorum* // *J. Ferment. Technol.* – 1989. – Vol. 67. – P. 331–334.
97. *Yokota A., Hirayama S., Enomoto K. et al.* Production of inulin fructotransferase (depolymerising) by *Arthrobacter* sp. H65-7 and preparation of DFAIII from inulin by the enzyme // *Journal of Fermentation and Bioengineering.* – 1991. – Vol. 72. – No. 4. – P. 258–261.
98. *Zhang G.Q., Cui F.M., Yang X.Q. et al.* Purification and properties of endoinulinase from *Chaetomium* sp. // *Wei Sheng Wu Xue Bao.* – 2004. – Vol. 44. – No. 6. – P. 785–788.
99. *Zhang L., Zhao C., Zhu D. et al.* Purification and characterization of inulinase from *Aspergillus niger* AF10 expressed in *Pichia pastoris* // *Protein Expr. Purif.* – 2004. – Vol. 35. – No. 2. – P. 272–275.

PHYSICO-CHEMICAL AND KINETIC PROPERTIES OF INULINASES

V.G. ARTUKHOV, M.G. KHOLYAVKA, T.A. KOVALEVA

Voronezh State University, Voronezh

The present review is devoted to the analysis of physico-chemical and kinetic properties of inulinase producers, which are widely used in biotechnology research. The main attention is paid to the description of the functional characteristics of these enzymes in different microenvironments (variation of temperature, pH, concentration of the substrate), the identification of the optimum parameters for them to operate the system, the characterization of their stability, stability to temperature and extreme pH values. To expand horizons effective practical use of industrial microorganisms in the systematic study of physical-chemical properties of the inulinase of different origin, attention is concentrated on the kinetic properties and their substrate specificity. Emphasizes the practical importance of microorganisms growing in extreme conditions and producing unique biocatalysts (including inulinase), which have promising industrial process features: resistant to high temperatures, chemical denaturants and acidic environments and can serve as a tool for the implementation of unique reactions to create new technology development, design of bioreactors and biocatalysts.

Keywords: inulinase, physico-chemical properties, kinetic properties, different microenvironment, stability, optimal functioning.

ЮБИЛЕЙНЫЕ ДАТЫ 2013 ГОДА В ГЕНЕТИКЕ*

К 110-летию со дня рождения
А.А. Прокофьевой-Бельговской
(1903–2013)



В 2013 году исполнилось 110 лет со дня рождения Александры Алексеевны Прокофьевой-Бельговской, известного генетика, члена-корреспондента АМН СССР, основателя отечественной школы цитогенетики человека.

А.А. Прокофьева родилась 26 марта (н. ст.) 1903 года в г. Александрове Владимирской губернии (ныне — Владимирская область). Семья переехала в родные места под Петербургом, где ее отец Алексей Иванович до и после революции служил кассиром на крупных заводах. Мать Елена Осиповна (девичья фамилия Смурова) была домохозяйкой, имела красивую внешность и была в достаточной степени образованной, чтобы благотворно влиять на детей. Дочь Александра после обучения в школе в 1923 году окончила Петроградский губернский институт народного образования и до 1930 года преподавала биологию в школах Ленинграда. Параллельно училась на естественном отделении физико-математического факультета Ленинградского государственного университета, на кафедре генетики (ее возглавлял профессор Ю.А. Филипченко).

В 1930 году она короткое время работала лаборантом в лаборатории цитологии Всесоюзного института растениеводства (ВИР) (Ленинград — Пушкин) — за-

ведовала лабораторией Г.А. Левитский. С 1930 по 1931 годы по приглашению академика С.Г. Навашина она работала научным сотрудником в Цитологической лаборатории АН СССР (Ленинград). В 1931–1933 годах А.А. Прокофьева состояла на должности младшего научного сотрудника в Лаборатории генетики АН СССР, возглавлявшейся Н.И. Вавиловым и преобразованной в 1933 году в Институт генетики АН СССР. До 1934 года этот институт находился в Ленинграде, а в 1934 году был переведен в Москву, в здание на Большой Калужской (ныне — Ленинский проспект, 33).

В Институте генетики АН СССР она работала старшим научным сотрудником с 1933 по 1946 годы. Это был период интенсивных творческих исканий, создавших ей мировое имя: сначала публикации выходили под фамилией «Прокофьева», а после выхода замуж за сотрудника Института генетики М.Л. Бельговского — под двойной, звучной, редкой фамилией «Прокофьева-Бельговская».

Научный дебют Александры Алексеевны был особенно успешным благодаря сотрудничеству с Германом Меллером, руководившим по приглашению Н.И. Вавилова лабораторией проблем гена и мутагенеза в Институте генетики. Г. Меллер к этому времени уже был автором открытия радиационного мутагенеза (1927), а через 10 лет станет лауреатом Нобелевской премии. Поэтому их цикл совместных исследований отличался новаторством и глубиной (особенно это касается изучения механизма точечных мутаций, определения размеров гена и др.). Существенным моментом было и то, что А.А. Прокофьева-Бельговская освоила метод получения препаратов политенных хромосом под руководством ближайшего ученика Т.Х. Моргана — Келвина Бриджеса, приехавшего в Ленинград на 4 месяца в 1934 году также по приглашению Н.И. Вавилова (это было после его поездки в 1932 году в США, Итаку, на VI Международный генетический конгресс).

Во время Великой Отечественной войны Институт генетики АН СССР в составе биологического отделения Академии был эвакуирован в г. Фрунзе (1941–1944). Директором института вместо репрессированного Н.И. Вавилова стал Т.Д. Лысенко, который, по странной собственной логике, не мешал проведению генетических исследований А.А. Прокофьевой-Бельговской (она сама называла этот период «самым счастливым в своей деятельности»).

После войны в 1946–1948 годах она работала в Институте цитологии, гистологии и эмбриологии АН СССР (реорганизованном бывшем кольцовском ин-

* Материал подготовлен В.С. Воробьевым, ведущим научным сотрудником Психологического института РАО

ституте — Институте экспериментальной биологии до 1938 г.). В начале 1948 года ею была представлена к защите докторская диссертация «Цикл клеточного ядра как фактор развития наследственности», однако после августовской сессии ВАСХНИЛ того же года Президиум ВАК отклонил защиту, а сама соискательница была уволена из института с формулировкой «в связи с реорганизацией». Началась эпоха лысенковщины.

В связи с указанным А.А. Прокофьева-Бельговская прекратила генетические исследования и в 1948 году поступила на работу во Всесоюзный научно-исследовательский институт по пенициллину и другим антибиотикам Министерства здравоохранения СССР, где трудилась до 1956 года на разных должностях: старшим научным сотрудником, заместителем начальника отдела и заведующим Музея штаммов. Здесь она выполнила серию работ по исследованию микроскопического строения актиномицетов, продуцирующих антибиотики.

Дальше в связи с актуальностью радиационной тематики власти допустили некоторое послабление в отношении запрета генетических работ. А.А. Прокофьеву-Бельговскую пригласили в недавно организованную членом-корреспондентом АН СССР Н.П. Дубининым лабораторию радиационной генетики Института биофизики АН СССР. Здесь она работала до 1962 года, переключившись от дрозophilной тематики на изучение хромосом человека.

Лидеры отечественной науки предпринимали в конце 1950-х — начале 1960-х годов настойчивые усилия по преодолению господства лженаучных воззрений Лысенко. В ряду таких мер было и создание Института радиационной и физико-химической биологии АН СССР (ныне — Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН). Директор нового института, выдающийся биохимик академик В.А. Энгельгардт пригласил в 1962 году А.А. Прокофьеву-Бельговскую возглавить лабораторию общей и космической кариологии. Обстановка этого института способствовала расцвету ее творческого и организационного таланта: здесь появилось много учеников и последователей.

Продолжая работу в большой Академии, Александра Алексеевна организовала лабораторию цитогенетики человека при Институте морфологии человека АМН СССР. Данная лаборатория в 1969 году была включена в состав Института медицинской генетики АМН СССР (ныне — Медико-генетический научный центр РАМН). Начиная с 1971 года и вплоть до своей кончины, А.А. Прокофьева-Бельговская руководила этой лабораторией на общественных началах. На основной своей работе она

в 1973 году оставила пост заведующей лабораторией, став старшим научным сотрудником-консультантом.

Скончалась Александра Алексеевна 16 февраля 1984 года, похоронена на Даниловском кладбище г. Москвы.

При анализе творчества крупного исследователя, прежде всего, акцент делается на преемственный вклад в науку. О серии работ А.А. Прокофьевой-Бельговской 1930-х годов, выполненных на дрозофиле, уже говорилось. Но важен также ее цикл работ по изучению хромосом человека. Они касались их тонкого строения, вопросов идентификации и репликации, полиморфизма, природы ассоциации акроцентрических хромосом и др. Ею написан ряд фундаментальных книг, среди них наиболее значима — «Гетерохроматические районы хромосом» (1986). Под ее руководством вышло руководство «Основы цитогенетики человека» (1969), сыгравшее важную роль в подготовке специалистов данного профиля в нашей стране, в которой после долгих лет процветания неоламаркизма и мичуринской биологии приходилось ликвидировать генетическую неграмотность. И именно на таких ученых, как А.А. Прокофьева-Бельговская, выпала нелегкая миссия выправлять последствия культивирования антинауки на большом научном и образовательном пространстве СССР. Этим же в свое время приходилось заниматься и Н.В. Тимофееву-Ресовскому и другим генетикам.

Огромен ее вклад в формирование отечественной школы цитогенетиков. Среди ее учеников — Н.П. Бочков, Ю.Ф. Богданов, А.Б. Иорданский, В.М. Гиндилис и др. Под ее руководством защитили кандидатские диссертации 23 человека, а ряд из них стал докторами наук.

Заслуги А.А. Прокофьевой-Бельговской были в достаточной степени оценены. В 1965 году она была избрана членом-корреспондентом АМН СССР, причем это был беспрецедентный случай, когда членом Академии стал кандидат наук да к тому же при участии в конкурсе таких крупных генетиков, как Н.В. Тимофеев-Ресовский, В.П. Эфроимсон. В 1983 году она в авторском коллективе вместе с Н.П. Бочковым, Е.Ф. Давиденковой, А.Ф. Захаровым, Е.Е. Погосянц была удостоена Государственной премии за вклад в изучение хромосом человека в норме и патологии. Имеются у нее и государственные награды (Орден Трудового Красного Знамени и медали).

Александра Алексеевна отличалась природной красотой, обладала редкостной внутренней чистотой, исходившей от всего ее облика. Ее все любили и обожали, и она отвечала той же преданностью и теплотой, особенно по отношению к ученикам. Она сильно выделялась в

любой среде благодаря особым, неуловимым, плохо поддающимся описанию качествам, которые академик РАМН Николай Павлович Бочков метко охарактеризовал как «поведение ленинградского интеллигента».

Необходимо в заключение отметить, что ученики, последователи и почитатели А.А. Прокофьевой-Бельговской выпустили к 100-летию со дня ее рождения замечательную книгу «А.А. Прокофьева-Бельговская: портрет на фоне хромосом» (М.: Научный мир, 2005. — 320 с.), которая содержит ценный научный и биографический материал. Особенно хотелось бы подчеркнуть значение перепечатки с воспроизведением по магнитофонной записи ее бесценных воспоминаний под названием «Моя жизнь и хромосомы» (было издание в журнале «Человек»): это — ее доклад на заседании Ученого совета Института молекулярной биологии АН СССР 26 марта 1983 года в день своего 80-летия. По сути эта автобиография представляет собой уникальный социальный срез, сделанный в исторической динамике человеком с удивительной наблюдательностью, точностью и объективностью.

Но есть у данной книги еще одно достоинство: в ней впервые опубликованы «Очерки истории цитогенетики в нашей стране», написанные Александрой Алексеевной в 1978 году для планировавшейся к выходу в свет монографии по истории генетики, приуроченному к XIV Международному съезду генетиков, состоявшемуся в Москве (публикация подготовлена Н.А. Ляпуновой). В этой публикации, помимо ее узкопрофессионального значения, имеются воспоминания современника о выдающихся событиях общебиологической важности, свидетелем которых была и А.А. Прокофьева-Бельговская. В частности, очень интересно для историков науки ее описание восприятия современниками и последующей оценки одного из величайших открытий XX века — предсказания в 1927 году Н.К. Кольцовым принципа самоудвоения «наследственных» молекул. Эта часть ее воспоминаний из раздела «Молекулярная организация, репродукция и функционирование хромосом» заслуживает цитирования в контексте концепции нашего журнала, уделяющего много внимания вопросам теории и истории молекулярной биологии: «Еще в 1927 г. Кольцов высказал гипотезу, что основная скелетная нить хромосомы — генома — есть не что иное, как огромная белковая молекула или пучок длинных одинаковых молекул (мицелл), а радикалы этой молекулы — локусы генов. Вначале эта гипотеза была встречена весьма сдержанно, она казалась парадоксальной. Дело в том, что химикам того времени не были известны молекулы столь гигантских размеров. Еще более

парадоксальным казалось предположение Кольцова о том, что сложные молекулы белковых соединений не могут создаваться в организме заново: всякая сложная органическая молекула возникает из окружающего раствора только при наличии уже готовой, служащей затравкой, молекулы-матрицы. По предположению Кольцова процесс репродукции хромосомы осуществляется по такому же принципу: автокаталитическое построение около исходной белковой геномы точно соответствующей ей копии. Гипотеза строения и репродукции хромосомы была опубликована Н.К. Кольцовым в 1928 году. ... Н.К. Кольцов ошибался, рассматривая в качестве основы молекулярной организации хромосомы длинную полипептидную молекулу. Сведения о нуклеиновых кислотах в тот период были крайне ограничены. Но сам принцип решения Кольцовым проблемы организации и репродукции хромосомы был правилен, и можно только удивляться широте научной эрудиции и интуиции этого замечательного ученого, который прозорливо, за 30 лет до возникновения молекулярной биологии, предугадал истинное решение одной из кардинальных проблем генетики». Такая характеристика многого стоит.

К 80-летию присуждения Нобелевской премии Т.Х. Моргану



В 2013 году исполняется 80 лет со времени награждения Нобелевской премией 1933 года по физиологии и медицине американского генетика Томаса Ханта Моргану (1866–1945). Формулировка Нобелевского комитета гласила: «За открытие функций хромосом как носителей наследственности».

1933 год характеризовался вручением Нобелевских премий целому созвездию выдающихся ученых. Премия по химии в этот год не присуждалась. Зато по физике награду получили сразу три исследователя, имена которых связаны с коренными преобразованиями в этой науке: Вернер Гейзенберг был удостоен премии за 1932 год (она не присуждалась тогда) за создание квантовой механики, а Эрвин Шредингер разделил с Полем Дираком премию 1933 года за разработку новых, перспективных форм атомной теории. В таком ряду Т.Х. Морган не потерялся, поскольку уровень его открытия в биологии несколько не уступал достижениям физиков. Для полноты следует упомянуть, что Нобелевская премия по литературе 1933 года была вручена впервые русскому писателю Ивану Бунину как одному из достойных наследников классической литературы России XIX века. Известно, что Альфред Нобель высказывал пожелание, чтобы первому из русских литераторов премия была присуждена его любимому писателю Льву Толстому, однако тот под разными предлогами уклонился от этой публичной акции.

Премия венчала четвертьвековой успешный труд Морганна на самом прорывном направлении биологии начала XX века: в области зарождавшейся новой науки — генетики. Ученый приступил к своим фундаментальным генетическим исследованиям в 1909 году в возрасте чуть более 40 лет, имея за плечами опыт экспериментальной работы главным образом в сфере эмбриологии в американских университетах и лучших европейских биостанциях и лабораториях. Для изучения хромосом и генов как носителей наследственности он выбрал очень удачный объект — плодную мушку (дрозофилу), имевшую короткий жизненный цикл (10 суток от яйца до мухи) и обладавшую ядрами клеток с четырьмя парами хромосом. Дальше для реализации программы исследований требовались ум и терпение, а этих качеств ему вместе с учениками и последователями было не занимать. В результате была выполнена серия ставших классическими исследований, приведших к созданию теории гена, в том числе линейного расположения генов в хромосомах, формированию представления о кроссинговере, картированию хромосом и т.д. Все это в целом привело к формулированию цельной хромосомной теории наследственности.

Именно об этом поведал в своей лекции новый Нобелевский лауреат. Он не смог прибыть на официальные нобелевские торжества в декабре 1933 года, а прочел свой доклад позднее, 4 июня 1934 года по прибытии в Стокгольм. На приеме в честь Нобелевских лауреатов в декабре 1933 г. была зачитана его телеграмма, в которой традиционно выражалась благодарность за признание.

В лекции Морган дает ретроспективный анализ состояния знаний о природе наследственности на начало XX столетия, опираясь на которые, он начал свои собственные исследования хромосом. Все изложенные факты, подробности и детали в авторском варианте воспринимаются убедительно и имеют несомненную историческую и научную ценность. Важно, что лауреат, получая премию по медицине, естественно, желал осветить и этот аспект. Он подчеркнул, что вклад генетики в медицину в то время носил главным образом чисто образовательный характер. Однако появление научных обоснований в генетике может изменить ситуацию. По этому поводу он заявил: «В прошлом сам предмет наследственности человека был настолько расплывчатым и засоренным всевозможными мифами и предрассудками, что обретение научного понимания сути предмета есть уже достижение первостепенной величины». В речи он также высказал предположение, что открытие факта сцепления с полом может в будущем послужить при диагностике генетических заболеваний.

Безусловно, сам прецедент вручения Нобелевской премии за работы в области генетики имел большой общественный отклик и сыграл существенную роль в становлении данной науки. Имело это значение и для приобретения еще большей всемирной известности и личной карьеры ученого. В его лабораторию в Калифорнийском технологическом институте потянулись стажеры со всего мира и, несмотря на сложную международную обстановку 1930—1940-х годов, в ней постоянно велись интенсивные исследования.

В России имя и работы Т.Х. Морганна были всегда известны специалистам. Огромную роль в этом сыграли личные контакты с ним в 1920- и 1930-е годы Н.И. Вавилова. Как практические следствия — приезд в 1920-е годы в СССР Германа Меллера (ученика Морганна, будущего Нобелевского лауреата), который привез и подарил коллекции дрозофил российским коллегам, в том числе и в Институт Н.К. Кольцова. Больше того, по приглашению Н.И. Вавилова Г. Меллер работал в Институте генетики АН СССР несколько лет (с 1933 по 1937 гг.). И еще факт — в 1934 году Келвин Бриджес, ученик Морганна, приезжал в СССР и в течение четырех месяцев обучал методам советских научных работников. Книги Морганна переводились на русский язык и были доступны всем заинтересованным лицам. По-видимому, эти обстоятельства создали достаточный иммунитет среди отечественных генетиков против антинаучных кампаний борьбы с «вейсманизмом-морганизмом», развязанных впоследствии Т.Д. Лысенко и его окружением при поддержке властей.

К 60-летию выхода в свет эпохальной работы Дж. Уотсона и Ф. Крика

В истории биологии можно пересчитать по пальцам наиболее значимые публикации. На память сразу приходят книга Дарвина «Происхождение видов» 1859 года, классическая статья Менделя 1865 года об опытах на горохе и первое повторение ее результатов через 100 лет (Х. де Фриз, Э. Чермак, К. Корренс), первые публикации Морганом 1910-х годов и т.д. К этому списку, бесспорно, принадлежит и статья Уотсона и Крика, напечатанная в журнале «Nature» в 1953 году. 60 лет — дата не круглая, всего лишь 10 лет назад широко отмечалось 50-летие выхода в свет этой статьи. Но небольшой комментарий к очередной дате все-таки следует сделать. Тем более жив и действует один из авторов этой работы — Джеймс Уотсон, отметивший в этом году свое 85-летие.

Наш журнал уже помещал материал на этот счет (Воробьев В. С. К 80-летию Джеймса Уотсона — первооткрывателя двойной спирали ДНК // Вестник биотехнологии ... — 2008. — Т. 4. — № 2. — С. 67–74). Важно еще раз подчеркнуть, что публикация 1953 года о расшифровке строения ДНК была коллективной, состояла из трех статей, объединенных общим названием, и отражала авторство всех участников исторического события: Уотсона, Крика, Уилкинса, Франклин и их коллег.

Так уж случилось, что цитируется, как правило, только статья Уотсона и Крика, причем индекс цитирования очень высок. Во многом это объясняется тем, что: во-первых, по сути они являются главными действующими лицами этой истории; во-вторых, они, как говорится, «не сошли с дистанции» после открытия, а остались функционировать в сфере молекулярной биологии (особенно Крик с его активным вхождением в проблему генетического кода); в-третьих, они были основными фигурами на Нобелевских торжествах 1962 г.

Но дело заключается не столько в доказательной базе авторства великого открытия XX века, сколько в его рубежности. Ведь 1953 год дал старт веренице открытий в химии жизни: Очоа, Корнберг, Ниренберг, Корана, Темин и еще многие один за другим за четверть столетия создали фундамент молекулярной биологии, на котором стоит сейчас наука XXI столетия.

К 40-летию создания первого рекомбинантного организма

1973 год является знаковым в молекулярной биологии. Именно тогда американским ученым Стэнли Коэну

и Герберту Мойеру удалось встроить модифицированную ДНК в бактерию. В литературе принято называть это началом эры геной инженерии.

Указанные исследователи успешно завершили эксперимент по переносу гена животного в плазмиду кишечной палочки и результаты напечатали в «Докладах Национальной академии наук США»: Cohen S., Chang A., Boyer H., Helling R. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. — 1973. — Vol. 70(11). — P. 3240–3244. Doi:10.1073/hnas.70.11.3240. База для проведения этого эксперимента была подготовлена всем прогрессом молекулярной биологии и особенно вышедшими к тому времени работами по рестриктазам (Х. Смит), лигазам и основополагающим исследованием Пола Берга 1972 года по синтезу молекулы рекомбинантной ДНК. После этого в научном сообществе возникла дискуссия о необходимости наложения моратория на рекомбинантные исследования, приведшая к принятию на конференции в Асиломаре (1975) согласованного решения по научным и этическим вопросам.

Дальше важной вехой является 1980 год, когда был лицензирован патент Коэна — Бойера (США) на генное клонирование, закрепивший их интеллектуальную собственность на производство рекомбинантных организмов. С этого времени компании «Генентек» было разрешено биотехнологическое производство генно-инженерного инсулина человека. В этом же году было осуществлено экспериментальное встраивание человеческого гена, кодирующего интерферон, в бактерию.

К 30-летию получения Нобелевской премии Барбарой Мак-Клинтон

В 2013 году исполняется 30 лет со дня вручения Нобелевской премии по физиологии и медицине в декабре 1983 года американскому генетику Барбаре Мак-Клинтон (1902—1992) «за открытие подвижных элементов генома».

Это было беспрецедентное событие в истории присуждения Нобелевских премий. Впервые премии удостоивалась старейшая женщина (ей был 81 год). Кроме того, она вручалась за открытие, сделанное 30 лет назад. Такие «рекорды» к тому времени уже были: самый первый из них — Фрэнсис Раус получил награду в 1966 году спустя 55 лет после открытия вируса саркомы (носит его имя). П.Л. Капица прибыл в 1978 году в Стокгольм за премией через 40 лет после выполнения его классических работ по физике низких температур.

Физик Ханс Бете ждал признания 28 лет. Сергей Иванович Вавилов, Теодор Эйвери, Розалинда Франклин и другие так и не дожили до триумфа, который достался их коллегам и соавторам по открытию. Все-таки как важно для ученых долгожительство!



Жизнь Барбары Мак-Клинток представляет собой пример редкого подвижничества в науке. В детстве получила хорошее воспитание в семье врача. Она не вышла замуж и 60 лет провела в одиноком общении с микроскопом и початками и листьями кукурузы. Это — внешняя канва, а за этим огромный труд после прохождения школы у сильных учителей (среди них — профессор Р.А. Эмерсон) и непрерывный поиск истины, за что она была вознаграждена радостью ее познания.

Со студенческих лет она занималась цитогенетикой, изучая хромосомы и их связи с фенотипическими признаками. За 10 лет сосредоточенной работы она стала высоким профессионалом в этой области, а ее цикл из 9 статей 1929—1931 гг. по морфологии хромосом кукурузы, опубликованных в биологических и генетических журналах, обратил внимание Томаса Ханга Моргана. Он при посещении лаборатории Корнельского университета предложил Барбаре напечататься в «Докладах Национальной академии наук США», и в 1931 году ее работа вышла в свет и обеспечила широкую известность.

В 1940-х годы она начала работать в биологической лаборатории Колд-Спринг-Харбора в штате Нью-Йорк. Именно здесь ей удалось в 1944 году установить факт миграции, или транспозиции, генов. При изучении

различного цвета зерен кукурузных початков Мак-Клинток выяснила, что в геноме кукурузы содержится подвижный ген, который после своего перемещения дает возможность подавленному гену, регулирующему окраску, проявить свое действие (при этом зерно окрашивается).

К 1950 году был накоплен определенный материал по подвижным, мигрирующим генам (или транспозонам), и Мак-Клинток выступила с докладом на эту тему на симпозиуме в Колд-Спринг-Харборе — одном из престижных собраний того времени по молекулярной биологии с участием таких авторитетов, как Макс Дельбрюк, Сальвадор Лурия, Алфред Херши, Лео Сцилард, Ренато Дульбекко и другие знаменитости. К ее разочарованию, адекватной оценки ее находки не получили. Тогда идея транспозирующих генов плохо воспринималась на фоне общепризнанной догмы о стабильной структуре хромосом. К тому же сказывался традиционный антифеминизм мужской научной корпорации (особенно характерный для интеллектуалов англосаксов), которая вряд ли внимательно слушала доклад женщины.

После этого случая Мак-Клинток временно перестала публиковаться и переключилась на преподавательскую работу, в том числе с 1965 по 1974 гг. состояла профессором Корнельского университета. Понадобилось время, чтобы факты, полученные ею на кукурузе, были восприняты должным образом. В тогдашней молекулярной биологии преобладала бактериальная генетика, и примерно через 15 лет после открытия Мак-Клинток феномена транспозиции генов выявили сходные регуляторные гены у микроорганизмов.

Нобелевская премия закрепила приоритет этой выдающейся исследовательницы, принесла ей мировую славу и признание в научной среде (особенно почетно было избрание в 1989 г. иностранным членом Лондонского королевского общества). Так что последние 8 лет ее жизни компенсировали годы недопонимания научного вклада ученого.

Работа выполнена в ходе исследований по гранту Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования, № 11.G34.31.0043.

КОНФЕРЕНЦИИ

Межрегиональный форум по биоэкономике «БиоКиров-2013» (Киров, 27–28 июня 2013 г.)

27–28 июня 2013 года в г. Кирове состоялся межрегиональный форум по биоэкономике «БиоКиров-2013». Организаторы Форума: Общество биотехнологов России имени Ю.А. Овчинникова, НП «Биотехнологический кластер Кировской области», Вятский государственный университет, Вятский государственный гуманитарный университет, Кировская государственная медицинская академия, Вятская государственная сельскохозяйственная академия, Зональный НИИ сельского хозяйства Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого. Мероприятие было поддержано Правительством Кировской области, Администрацией муниципального образования «Город Киров», Комитетом по экономическому развитию, промышленности, торговле и предпринимательству Законодательного собрания Кировской области, Общественной палатой Кировской области, Союзом предприятий биотехнологической отрасли и Технологической платформой «Биоэнергетика». В работе Форума приняли участие более 700 человек из 12 регионов Российской Федерации и 8 стран. К участникам Форума обратились с приветствием губернатор Кировской области Н.Ю. Белых и глава города Кирова В.В. Быков. В адрес Форума поступили приветственные обращения от министра регионального развития РФ И.Н. Слюняева и заместителя министра экономического развития О.В. Фомичева.

Центральной проблемой Форума стало обсуждение региональных возможностей внедрения нового перспективного направления — биоэкономики, основанной на широком использовании в различных отраслях экономики биотехнологии и связанных с ней высоких технологий. Рассмотрение этой темы было объединено в рамках Международной научно-практической конференции «Региональные аспекты развития биоэкономики». Было проведено два пленарных заседания, пять секций, три семинара, круглый стол, на которых были проанализированы специфические особенности биоэкономики агропромышленного комплекса, лесного комплекса, промышленности и энергетики, биофармацевтики и др. На пленарных заседаниях поднимались общие вопросы, связанные с теорией и методологией применения биотехнологии при решении макроэкономических задач, возможностям отдельных регионов в

поддержке биотехнологии как приоритетного направления и т.д.

Особое внимание было уделено региональным моделям биоэкономики и, в первую очередь, потенциалу Кировской области, которая располагает большими запасами биомассы в лесном и сельском хозяйстве, имеет традиции развития промышленной биотехнологии, обладает высоким научно-техническим потенциалом и квалифицированными кадрами в данной отрасли. В сфере биотехнологии работает более 40 производственных компаний, 4 НИИ, 4 государственных вуза, учреждения РАН.

Участники Форума пришли к выводу, что в Кировской области есть все условия для реализации пилотного проекта по формированию и реализации региональной модели биоэкономики. Исходной базой для этого могут служить существующий «Биотехнологический кластер Кировской области», формируемый биофармацевтический кластер на основе ООО «Нанолек», межрайонные аграрные и лесные кластеры, другие предприятия и организации области.

Участники Форума поделились также опытом формирования биотехнологических кластеров как прообразов региональных моделей биоэкономики в других субъектах Российской Федерации: Республика Татарстан, Республика Коми, Красноярский край и др.

В целом докладчики и выступавшие в прениях подчеркивали интегрирующую роль государственной «Комплексной программы развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года», технологических платформ «Биоэнергетика», «Биотех2030», «Медицина будущего» в деле развития биоэкономики на федеральном и региональном уровнях.

Всесторонне обсудив состояние и перспективы разработки региональных аспектов биоэкономики, участники Форума приняли РЕШЕНИЕ:

1. Считать создание региональных моделей биоэкономики актуальным научно-практическим направлением, формирующим новый технологический и цивилизационный уклад XXI столетия.

2. Поддержать инициативу Кировской области по разработке собственной региональной модели биоэкономики на базе существующих и формируемых биокластеров, в том числе как инструмент организации такой модели — подготовку областной целевой программы развития биотехнологии на период до 2030 года.

3. Рекомендовать субъектам Федерации активно использовать опыт Кировской области, Республики Татарстан, Чувашской Республики в сфере биотехно-

логии для организации аналогичных перспективных региональных моделей биоэкономики, включая создание соответствующих региональных программ, реализацию пилотных проектов, укрепление межрегионального сотрудничества.

4. Просить Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова совместно с Ассоциацией инновационных регионов России сформировать Межрегиональный координационный совет по биоэкономике с участием заинтересованных субъектов Федерации.

5. Поручить Оргкомитету Форума широко оповестить о результатах прошедшего мероприятия руководящие органы регионов Российской Федерации, профильные научные общества и специалистов, бизнес-структуры, СМИ».

5. Поручить Оргкомитету Форума широко оповестить о результатах прошедшего мероприятия руководящие органы регионов Российской Федерации, профильные научные общества и специалистов, бизнес-структуры, СМИ.

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 27.06.13
Формат 60/90^{1/8}. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 5,5. Тираж 1000 экз.

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

ОБЩЕСТВО БИОТЕХНОЛОГОВ РОССИИ ИМ. Ю.А. ОВЧИННИКОВА

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

Главными целями деятельности ОБР являются:

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

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

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

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

ОБР является членом Европейской федерации биотехнологии.

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

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

Членство в ОБР является бесплатным для физических лиц.

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

Тел.: +7 (495) 648-09-13

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