

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

Научно-практический журнал

Основан в 2005 году

Главный редактор

Р.Г. Василов

Редакционная коллегия

В.С. Воробьев, Т.Н. Гаева, С.И. Матаев, О.Я. Мезенова

Редакционный совет

В.А. Быков (Москва), В.Г. Дебабов (Москва), С.Х. Дегтярев (Новосибирск),
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), Н. Раевский (Берлин, Германия),
А.Н. Решетиллов (Пушино), К.Г. Скрябин (Москва), Р.М. Хаитов (Москва),
В.И. Швец (Москва), Н.К. Янковский (Москва)

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

Зав. редакцией О.В. Воробьева

Адрес: 119071 Москва, Ленинский пр-т, 33

Тел.: +7 (495) 648-09-13

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

Учредитель и издатель:

АНО «Информационно-аналитический центр
медико-социальных проблем»

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

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: raifvasilov@mail.ru

Издается при поддержке

Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

К читателям. *Р.Г. Василев* 4

Оригинальные статьи

Микоциногенения у метилотрофных дрожжей.
В.И. Голубев 5

Влияние глутарового альдегида на субстратную специфичность бактерий *Glucanobacter oxydans* subsp. *industrius* ВКМ В-1280.

С.С. Каманин, С.Б. Чарыева, В.А. Арляпов, А.Г. Быков, А.Н. Решетилев 10
Биотехнологическая конверсия отходов от разделки краба *Paralithodes camtschaticus* при получении кормовой добавки с хитином.

Т.А. Игнатова, Т.В. Родина, А.В. Подкорытова 20
Получение метана в процессе биотрансформации биомассы иммобилизованных клеток мицелиального гриба *Rhizopus oryzae*, использованных для получения молочной кислоты.

Ф.Т. Мамедова, О.В. Сенько, О.В. Маслова, Т.А. Махлис, Е.Н. Ефременко 28
Оптимизация депирогенизирующей фильтрации раствора гетерологичного антирабического иммуноглобулина.

Е.Г. Абрамова, А.К. Никифоров, И.М. Жулидов, А.Г. Селезнева, Л.В. Савицкая,
О.А. Лобовикова, С.В. Генералов 34

Страницы истории

К 95-летию открытия Н.И. Вавиловым закона гомологических рядов в наследственной изменчивости.
В.С. Воробьев 39

Юбилейные и знаменательные даты 2015 года 44

Хроника

События первой половины 2015 года 58

Информация

Предстоящие мероприятия 2015 года 60

Правила для авторов 62

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. *R.G. Vasilov* 4

Original articles

Mycocinogeny in methylotrophic yeast.
V.I. Golubev 5

Effect of glutaraldehyde on the substrate specificity of bacteria *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* VKM B-1280.
S.S. Kamanin, S.B. Charyeva, V.A. Arlyapov, A.G. Bykov, A.N. Reshetilov 10

Biotechnological conversion of waste from cutting crab *Paralithodes camtschaticus* in obtaining the feed additive with chitin.
T.A. Ignatova, T.V. Rodina, A.V. Podkorytova 20

Methane production within biotransformation of biomass of filamentous immobilized fungus cells *Rhizopus oryzae*, used to produce lactic acid.
F.T. Mamedova, O.V. Senko, O.V. Maslova, T.A. Makhlis, E.N. Efremenko 28

Optimization filtering for depyrogenation solution of heterologous anti-rabies immunoglobulin.
E.G. Abramova, A.K. Nikiforov, I.M. Zhulidov, A.G. Selezneva, L.V. Savitskaya, O.A. Lobovikova, S.V. Generalov 34

Pages of history

On the 95th anniversary of the discovery of N.I. Vavilov's law of homologous series in variation.
V.S. Vorobyev 39

Anniversary and significant dates 2015 44

The chronicle

Events of the first half-year 2015 58

The information

Forthcoming actions 2015 60

Rules for authors 62

К читателям

В первом номере журнала за 2015 год помещен ряд статей разнопланового характера.

В работе В.И. Голубева из Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина (Пушкино) обнаружен штамм *Ogataea rini*, секретирующий микоцин фунгицидного действия. Этот штамм проявляет наибольшую активность при рН 4,5 и повышенном осмотическом давлении среды. Изучена чувствительность штамма к базидиомицетным и метилотрофным дрожжам.

Группа сотрудников под руководством профессора А.Н. Решетилова исследовала субстратную специфичность бактерий *Glucanobacter oxidans subst. industrius* ВКМ D-1280. Полученные результаты могут быть использованы при разработке биосенсоров.

Сотрудниками ВНИРО (Москва) Т.В. Игнатовой, Т.В. Родиной, А.В. Подкорытовой представлена модификация метода ферментативного гидролиза и биотехнологической конверсии отходов от разделки краба *Paralithodeis camtschaticus* с целью получения кормовой добавки с хитином.

Коллективом авторов — Ф.Т. Мамедова и др. — из МГУ им. М.В. Ломоносова и Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля продемонстрирована возможность получения молочной кислоты из восстанавливающих сахаров, содержащихся в ферментолизатах биомассы микроводоросли *Chlorella vulgaris*.

Е.Г. Абрамова с коллегами из Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» (Саратов) разработали метод оптимизации депирогенизирующей фильтрации раствора гетерологичного антирабического иммуноглобулина.

В историческом разделе публикуется статья В.С. Воробьева, посвященная памятной дате, — 95-летию открытия Н.И. Вавиловым закона гомологических рядов в наследственной изменчивости. По традиции в первом номере журнала приводятся юбилейные и знаменательные даты текущего года. Есть среди них некоторые значимые круглые даты: 150-летие обнаружения Грегором Менделем результатов исследования о передаче по наследству признаков при скрещивании гороха, 100-летие со дня рождения лауреата Нобелевской премии, иммунолога Питера Медавара, 50-летие первого в мире определения Робертом Холли полной нуклеотидной последовательности тРНК, переносящей аланин в клетках дрожжей, и др.

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

МИКОЦИНОГЕНИЯ У МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖЕЙ

В.И. ГОЛУБЕВ*

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

Обнаружен штамм *Ogataea pini*, секретирующий микоцин фунгицидного действия. Наибольшую активность он проявляет при рН 4,5 и повышенном осмотическом давлении среды. Базидиомицетные дрожжи к нему нечувствительны. Среди метилотрофных дрожжей к этому микоцину чувствительны виды родов *Candida*, *Komagataella*, *Kuraishia*, *Nakazawaea* и *Ogataea*, а также отдельные представители семейств *Metschnikowiaceae*, *Pichiaceae*, *Saccharomycetaceae*, *Saccharomycopsidaceae* и *Wickerhamomycetaceae*.

Ключевые слова: фунгицид, микоцин, киллер-токсин, таксономия.

Введение

Способность некоторых видов дрожжей усваивать метанол выявлена сравнительно недавно, но вскоре стала предметом многочисленных фундаментальных и прикладных исследований [4]. В частности, метилотрофные дрожжи предлагалось использовать для получения фосфоманнанов, БВК [9], а в последние годы они интенсивно эксплуатируются для синтеза в промышленном масштабе целого спектра гомо- и гетерологичных белков [5, 7].

Несмотря на широкий охват изучения разных аспектов биологии этих организмов до настоящего времени для них отсутствуют сообщения о микоциногении (killer phenomenon), широко распространенной почти во всех таксономических группах дрожжевых грибов [1]. Лишь один из видов метилотрофных дрожжей, *Ogataea pini* (Holst) Yamada et al. (= *Pichia pini* (Holst) Rhaff) перечислен среди прочих штаммов-киллеров, но никаких данных о его антагонистической активности не приводится [3].

Нами микоциногенный штамм ВКМ У-899 найден при перекрестном тестировании поддерживаемых во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) культур указанного вида.

В настоящей работе представлены результаты изучения условий для экспрессии этим штаммом фунгицид-

ной активности, спектра действия и других характеристик секретируемого им микоцина (киллер-токсина).

Материалы и методы

Все использованные в работе штаммы дрожжей поддерживаются во Всероссийской коллекции микроорганизмов (<http://www.vkm.ru>), вследствие чего аббревиатура (ВКМ У) перед их номерами далее в тексте и таблицах не приводится.

Для тестирования на чувствительность к микоцину использован глюкозо-пептонный агар (глюкоза — 5, пептон — 2,5, дрожжевой экстракт — 2, агар — 20 г/л), на который наносили 0,05 мл суспензии (примерно 10^5 клеток/мл) обследуемых 2–3-суточных культур, выращенных на сусло-агаре, тщательно растирали шпателем и затем штрихом наносили обильный инокулюм 3–4-суточной культуры штамма 899. Засеянные чашки инкубировали при комнатной температуре до появления роста газона.

При формировании вокруг штриха зоны подавления роста шириной несколько миллиметров посеянный газон штамм регистрировался как чувствительный; если эта зона не превышала 1–2 мм, то его относили к слабо чувствительным; а при отсутствии ее — к нечувствительным.

Для наработки токсина штамм 899 выращивали в покое 6 сут. в той же, но неагаризованной глюкозо-пептонной среде. Клетки отделяли центрифугированием (5000 г, 10 мин.) и супернатант фильтровали через стеклянные фильтры GF/A («Sigma», США). Токсинсодержащую культуральную жидкость использовали для проверки устойчивости токсина к повы-

© 2015 г.

* Автор для переписки:

Голубев Владислав Иванович

д.б.н., вед. н. сотр. Института биохимии и

физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, Пущино

E-mail: wig@ibpm.pushchino.ru

шенной температуре и установления действия токсина на жизнеспособность чувствительных клеток, которую после их инкубации в ней определяли посевами на сусло-агар.

Для ориентировочной оценки молекулярной массы токсина штамм 899 выращивали на покрытой диализной мембраной («Spectrum», США) вышеуказанном агаре для тестирования чувствительности.

После 7 суток инкубации мембрану с агара вместе с выросшей на ней культурой удаляли и засеивали газоном чувствительного к токсину штамма *Nakazawaea peltata* 1482.

В целях элиминации антифунгальной активности суспензию (0,1 мл, 10^4 кл/мл) штамма 899 высевали на сусло-агар и инкубировали при максимальной для его роста температуре. Другие чашки 3–6 мин. облучали УФ (254 нм, ≈ 200 Дж/м²).

Результаты и обсуждение

Среди 12 штаммов *O. pini* чувствительными к агенту, секретируемому штаммом 899, оказались два: 886 (типовой штамм вида) и 2495, остальные были нейтрального фенотипа (табл. 1).

Таблица 1

Спектр действия микоцина *Ogataea pini* ВКМ У-899 среди метилотрофных дрожжей (подчеркнуты) и филогенетически близких им таксонов

<i>Ambrosiozyma angophorae</i> 2218Т	-	<i>N. holstii</i> 725, 1282, 1401, 1402, 2005,	
<i>A. llanquihuensis</i> 2646Т	+	2558Т	+
<i>A. monospora</i> 1383, 2202Т	-	<i>N. peltata</i> 1482Т	+
<i>A. philentoma</i> 2067Т	+	<i>N. wickerhamii</i> 1489Т, 2706	+
<i>A. platypodis</i> 2082Т	+	<i>Ogataea angusta</i> 1397Т	с
<i>Candida boidinii</i> 34, 2436, 2439,		<i>O. cecidiorum</i> 2982Т	с
2591Т	+	<i>O. glucozyma</i> 2079Т	+
1514, 1589, 2060, 2356, 2425	с	<i>O. henricii</i> 2080	-
<i>C. maris</i> 2107Т	+	<i>O. methanolica</i> 2621	-
<i>C. nemodendra</i> 2174Т	-	<i>O. methylovora</i> 2581Т	-
<i>C. nitratophila</i> 1300Т	с	<i>O. minuta</i> 172Т, 2085	-
<i>C. pini</i> 2175Т	+	<i>O. nonfermentans</i> 2081Т	+
<i>C. succiphila</i> 2584Т	с	2516	с
<i>Komagataella pastoris</i> 884Т	-	<i>O. naganishi</i> 2161Т	-
2544	с	<i>O. parapolyomorpha</i> 2518	-
<i>Kuraishia capsulata</i> 2077Т	-	<i>O. philodendra</i> 2168	-
2514	с	<i>O. pini</i> 886Т, 2495	+
<i>K. molishiana</i> 750Т, 2308	с	900, 2496-2503	-
<i>Nakazawaea anatomiae</i> 1522Т, 2709	-	<i>O. polymorpha</i> 2924, 2559Т, 2988, 2989	с
<i>N. ernobii</i> 725Т	+	<i>O. trehalophila</i> 1289Т	-
		<i>O. wickerhamii</i> 1404, 2629Т	+

+: штаммы, чувствительные к микоцину, с: слабо чувствительные, -: нечувствительные, Т: типовой штамм, НТ: неотиповой штамм

Антифунгальная активность у штамма 899 обнаруживалась в диапазоне значений рН среды от 3,5 до 5,0. При рН 5,5 и выше она отсутствовала. Наибольшие зоны подавления роста чувствительных культур формировались при рН 4,0–4,5. Ширина их значительно увеличивалась при введении в среду NaCl, вследствие чего при обследовании чувствительности дрожжей к агенту, продуцируемому *O. pini*, использован указанный выше

глюкозо-пептонный агар с цитрат-фосфатным буфером (рН 4,5) и 3% NaCl.

Секретируемый штаммом 899 токсин полностью инактивировался после 5-минутного прогревания при 100 °С. Он не диффундирует через диализную мембрану («Spectrum», США), не пропускающую соединения с молекулярной массой около 8 кДа и более. Данный агент обладает фунгицидным действием (рис. 1).

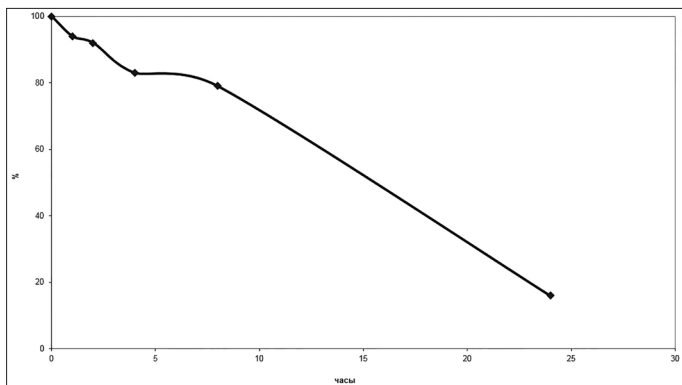


Рис. 1. Снижение численности (%) жизнеспособных клеток *Nakazawaea peltata* ВКМ У-1482 при инкубации в культуральной микоцинодержавной жидкости *Ogataea pini* ВКМ У-899.

Синтез антифунгального токсина у штамма 899 детерминирован, очевидно, хромосомными генами, поскольку воздействия, элиминирующие внехромосомные элементы, были для него неэффективны. После инкубации штамма на сусло-агаре при максимальной для его роста температуре (35 °С) и УФ-облучения среди свыше 50 случайно отобранных колоний не обнаружено ни одной утратившей активность.

Действие агента, секретируемого *O. pini*, обследовано на более чем 180 видах дрожжей из около 70 родов. Он не активен против базидиомицетов, представляющих 13 родов, принадлежащих к пяти классам (табл. 2), а также против *Schizosaccharomyces pombe* Lindner (класс *Schizosaccharomycetes*, подтип *Archiascomycotina*), проявляя активность лишь против аскомицетных дрожжей класса *Saccharomycetes* (подтип *Saccharomycotina*).

Совокупность таких характеристик продуцируемого *O. pini* антифунгального агента, как таксо-

номическая специфичность чувствительности к нему, термолабильность, значительная молекулярная масса и условия проявления активности, позволяет отнести его к микоцинам [1].

Метилотрофные дрожжи представляют собой таксономически гетерогенную группу, виды которых разбросаны в отдаленно родственных родах. Последние (*Candida*, *Komagataella*, *Kuraishia*, *Ogataea*) включают в себя как чувствительные, так и нечувствительные к микоцину *O. pini* виды (см. табл. 1). Более того, чувствительность к нему проявляют также неассимилирующие метанол, но филогенетически близкие организмы родов *Ambrosiozyma* и *Nakazawaea*, свидетельствуя, что таксономическая ценность способности ассимилировать метанол, очевидно, невысока. Следует подчеркнуть, что все указанные в таблице 1 роды составляют группу таксонов, принадлежность которых к очерченным в настоящее время семействам внутри класса *Saccharomycetes* остается пока неясной [6]. В эту группу входят также *Babjeviella inositovora* (Golubev et Blagodatskaya) Kurtzman et Suzuki и *Sporopachydermia lactativora* Rodrigues de Miranda, чувствительные к данному микоцину.

Спектр действия микоцина *O. pini* 899 сравнительно узок. Среди дрожжевых грибов порядка *Saccharomycetales*, помимо метилотрофных и филогенетически родственных им дрожжей (см. табл. 1), он активен против отдельных представителей семейств *Metschnikowiaceae*, *Pichiaceae*, *Saccharomycetaceae*, *Saccharomycopsidaceae* и *Wickerhamomycetaceae*. За исключением *Wickerhamomyces*, чувствительны к нему, часто слабо, лишь единичные виды некоторых родов из этих семейств (табл. 3).

Таблица 2

Перечень родов дрожжей, представители которых нечувствительны к микоцину *Ogataea pini* ВКМ У-899 (количество обследованных видов, штаммов)

<i>Bulleromyces</i> (1, 1)	<i>Kloeckera</i> (1, 1)	<i>Saccharomyces</i> (1, 1)
<i>Candida</i> (2, 5)	<i>Kodamaea</i> (1, 1)	<i>Saccharomycodes</i> (1, 1)
<i>Citeromyces</i> (1, 5)	<i>Kwoniella</i> (1, 1)	<i>Sakaguchia</i> (1, 1)
<i>Curvibasidium</i> (1, 1)	<i>Lachancea</i> (1, 1)	<i>Saturnispora</i> (1, 1)
<i>Cystofilobasidium</i> (1, 1)	<i>Leucosporidium</i> (2, 2)	<i>Scheffersomyces</i> (1, 1)
<i>Debaryomyces</i> (7, 7)	<i>Lipomyces</i> (4, 4)	<i>Schizosaccharomyces</i> (1, 1)
<i>Dekkera</i> (2, 2)	<i>Meyerozyma</i> (1, 1)	<i>Schwanniomyces</i> (6, 7)
<i>Eremothecium</i> (1, 1)	<i>Millerozyza</i> (2, 2)	<i>Sirobasidium</i> (1, 1)
<i>Fibulobasidium</i> (1, 1)	<i>Nadsonia</i> (1, 1)	<i>Sporidiobolus</i> (1, 1)
<i>Filobasidiella</i> (1, 1)	<i>Naumovozyma</i> (1, 1)	<i>Torulasporea</i> (4, 4)
<i>Filobasidium</i> (1, 1)	<i>Pachysolen</i> (1, 1)	<i>Wickerhamia</i> (1, 1)
<i>Hanseniaspora</i> (4, 4)*	<i>Peterozyza</i> (1, 1)	<i>Zygoascus</i> (1, 1)
<i>Holtermannia</i> (1, 1)	<i>Pichia</i> (1, 1)	<i>Zygosaccharomyces</i> (1, 1)
<i>Hyphopichia</i> (1, 1)	<i>Priceomyces</i> (1, 1)	<i>Yamadazyma</i> (1, 1)
<i>Kazachstania</i> (8, 8)*	<i>Rhodosporeidium</i> (1, 1)	<i>Yarrowia</i> (1, 1)

* Слабо чувствительны *H. guilliermondii* (1), *H. valbyensis* (1), *K. africana* (1), *K. bovina* (1). Эти виды и штаммы не входят в количества, указанные в таблице.

**Спектр действия микоцина *Ogataea pini* ВКМ У-899
среди представителей семейств порядка Saccharomycetales**

<i>Metschnikowiaceae</i>			
<i>S. synnaedendra</i> 2673, 2674Т	--		
<i>Clavispora lusitaniae</i> 1022, 1588	с	<i>S. vini</i> 2089Т	-
<i>Lodderomyces elongisporus</i> 426Т	+	<i>Wickerhamomycetaceae</i>	
<i>Metschnikowia agaves</i> 2840Т	-	<i>Barnettozyma californica</i> 838Т	+
<i>M. australis</i> 2670Т	+	<i>B. pratensis</i> 2136Т	с
<i>M. bicuspidate</i> 2628HT	+	<i>B. salictaria</i> 1288Т	с
<i>M. gruessii</i> 2	-	<i>Cyberlindnera americana</i> 1409Т	-
<i>M. krissii</i> 220Т	-	<i>C. bimundalis</i> 1407Т	+
<i>M. lunata</i> 1651Т	-	<i>C. fabianii</i> 1450Т	с
<i>M. pulcherrima</i> 64Т	-	<i>C. jadinii</i> 768	-
<i>M. reukaufii</i> 1466	-	<i>C. mrakii</i> 173Т	-
<i>M. zobellii</i> 221Т	-	<i>C. petersonii</i> 1410	-
<i>Pichiaceae</i>		<i>C. rhodanensis</i> 277	+
<i>Kregervanrija delftensis</i> 1393Т	+	<i>C. sargentensis</i> 2087Т	-
<i>K. fluxuum</i> 1285Т	+	<i>C. saturnus</i> 2551Т	-
<i>Saccharomycetaceae</i>		<i>C. suaveolens</i> 2990Т	-
<i>Kluyveromyces aestuarii</i> 1528Т	с	<i>C. subsufficiens</i> 2220Т	-
<i>K. dobzhanskii</i> 1293Т	-	<i>C. veronae</i> 2163	-
<i>K. lactis</i> 868HT	-	<i>Starmera amethionina</i> 2614Т	-
762	с	<i>S. dryadoides</i> 2148Т	-
<i>K. lactis var. drosophilaram</i> 1302Т	+	<i>S. pachycereana</i> 2616Т, 2617	+
<i>K. wickerhamii</i> 1297Т	+	<i>S. quercuum</i> 313, 1287Т	+
<i>K. marxianus</i> 257, 876Т	с	<i>Wickerhamomyces alni</i> 2509Т	+
<i>Nakaseomyces delphensis</i> 1529Т	с	<i>W. anomalus</i> 1086Т	-
<i>Tetrapisispora blattae</i> 2216Т	+	<i>W. bisporus</i> 1065Т	+
<i>Vanderwaltozyma polyspora</i> 1524Т	с	<i>W. bovis</i> 1106Т	с
<i>Zygotorulasporea mrakii</i> 2198Т	+	<i>W. canadensis</i> 1395Т	+
<i>Z. florentina</i> 863Т	-	<i>W. chambardii</i> 276	+
<i>Saccharomycopsidaceae</i>		<i>W. ciferrii</i> 169Т	-
<i>Saccharomycopsis capsularis</i> 1066	-	<i>W. lynferdii</i> 2205Т	+
<i>S. fermentans</i> 2853Т	+	<i>W. mucosus</i> 2086Т	+
<i>S. fibuligera</i> 1067Т	-	<i>W. pijperi</i> 310	-
<i>S. crataegensis</i> 2210Т	-	<i>W. rabaulensis</i> 2197Т	+
<i>S. javanensis</i> 1069Т	-	<i>W. silvicola</i> 178Т	-
<i>S. malanga</i> 2212Т	-	<i>W. strasburgensis</i> 278	+
<i>S. schoenii</i> 1073Т	с	<i>W. subpelliculosis</i> 180Т	-
<i>S. selenospora</i> 131Т	с	<i>W. sydowiorum</i> 2192Т	+

Как правило, штаммы одного вида однотипны по реакции к микоцину. Кроме культур *O. pini*, различие в этом отношении между штаммами можно отметить у *Komagataella pastoris*, *Kuraishia capsulata* (см. табл. 1) и *Kluyveromyces lactis* (см. табл. 3). Неотиповой штамм 868 последнего вида нечувствителен не только к микоцину *O. pini*, но и к продуцируемым самими клэйверомицетами, а также к микоцинам штаммов-киллеров, принадлежащих к 80 видам 18 родов [2]. Поскольку чувствительность обусловлена наличием микоцин-связывающих рецепторов на клеточной стенке [1], можно предположить значительную ее модификацию у неотипового штамма.

Заключение

У метилотрофных дрожжей метанол мощно индуцирует белковый синтез, благодаря чему промотор их гена алкогольоксидазы широко используют при получении чужеродных белков, накапливаемых внутриклеточно [5, 7]. Поскольку микоцины относятся к сугубо внеклеточным белкам, использование сигнальных секреторных последовательностей метилотрофных микоциногенных культур может обеспечить высокий уровень секреции гетерологичных белков в среду, избавляя от множества проблем, связанных с разрушением клеток, выделением и очисткой конечного продукта [8].

Литература

1. Голубев В.И. Микоцинотипирование // Микология и фитопатология. — 2012. — Т. 46. — С. 3–13.
2. Голубев В.И. Микоциночувствительность клюйверомицетов: *Kluyveromyces sensu lato* vs. *Kluyveromyces sensu stricto* // Изв. РАН, сер. биол. — 2012. — № 2. — С. 563–566.
3. Зехнов А.М., Соом Я.О., Нестерова Г.Ф. Новые тест-штаммы для выявления антагонистической активности дрожжей // Микробиология. — 1989. — Т. 58. — С. 807–811.
4. Троценко Ю.А., Торгонская М.Л. Метилотрофные дрожжи. — Москва: «ТР-Принт», 2011 — 313 с.
5. Boettner M., Steffens C., von Mering C., Bork P., Stahl U., Lang C. Sequence-based factors influencing the expression of heterologous genes in the *Pichia pastoris* — comparative view of 79 human genes // J. Biotechnol. — 2007. — Vol. 130. — P. 1–10.
6. Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. (eds.). The Yeasts. A Taxonomic Study. — Vol. 2. — Elsevier, Amsterdam e.a., 2011.
7. Macauleg-Patric S., Fazenda M.L., Harvey L.M. Heterologous protein production using *Pichia pastoris* expression system // Yeast. — 2005 — Vol. 22. — P. 249–270.
8. Schmitt M.J., Breinig F. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application // FEMS Microbiol. Rev. — 2002. — Vol. 26. — P. 257–276.
9. Sreekrishna K., Kropp K.E. *Pichia pastoris* / In: Wolf K. (ed.) Nonconventional Yeasts in Biotechnology. — Berlin: Springer, 1996. — P. 203–253.

MYCOCINOGENY IN METHYLOTROPHIC YEAST

V.I. GOLUBEV

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

The strain of *Ogataea pini* was revealed to secrete fungicidal mycocin. It had maximum activity at pH 4.5 and elevated osmotic pressure of medium. Basidiomycetous yeasts are insensitive to this mycocin. Among methylotrophic yeasts several species of the genera *Candida*, *Komagataella*, *Kuraishia*, *Nakazawaea*, *Ogataea* and, in addition, some representatives of the families *Metschnikowiaceae*, *Pichiaceae*, *Saccharomycetaceae*, *Saccharomycopsidaceae* and *Wickerhamomycetaceae* are sensitive to *O. pini* mycocin.

Keywords: fungicide, mycocin, killer toxin, taxonomy.

ВЛИЯНИЕ ГЛУТАРОВОГО АЛЬДЕГИДА НА СУБСТРАТНУЮ СПЕЦИФИЧНОСТЬ БАКТЕРИЙ *GLUCONOBACTER OXYDANS* SUBSP. *INDUSTRIUS* ВКМ В-1280

С.С. КАМАНИН¹, С.Б. ЧАРЫЕВА¹, В.А. АРЛЯПОВ¹, А.Г. БЫКОВ², А.Н. РЕШЕТИЛОВ^{2*}

¹ ФГБОУ ВПО «Тулский государственный университет», Тула;

² ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН»,
Пушино Московской области

Обнаружено, что экспонирование суспензии клеток *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* В-1280 в растворах глутарового альдегида, а затем их использование в рецепторном элементе электрохимического биосенсора приводит к изменению субстратной специфичности бактерий — снижению окислительной активности микроорганизмов *G. oxydans* В-1280 в отношении этилового спирта. Этот эффект можно отнести к простым способам изменения селективности биосенсоров на основе данных клеток. Полученные результаты могут быть использованы при разработке биосенсоров для анализа алкогольной продукции, ферментационных и бродильных сред, требующих минимальную пробоподготовку.

Ключевые слова: биосенсоры, селективность, иммобилизация, ингибирование.

Введение

Биосенсорный метод анализа позволяет с высокой точностью определять содержание различных биологически активных соединений, в том числе, глюкозы и этилового спирта в различных объектах. При этом значительное число описанных лабораторных моделей биосенсоров основано на применении ферментов [18]. Ферментные биосенсоры имеют, как правило, более высокую субстратную специфичность, чем клеточные. Несмотря на это, созданию биосенсоров на основе целых клеток микроорганизмов, обладающих широким спектром окисляемых субстратов, в мировой практике уделяется большое внимание [16]. Это связано с наличием у микробных клеток определенных преимуществ по сравнению с ферментами при использовании в качестве основы рецептора биосенсора. Клетки микроорганизмов легко культивируются, воспроизводятся и поддержива-

ются в чистой культуре. В отличие от ферментов, клетки не требуют дорогостоящей очистки. Они на протяжении длительного времени сохраняют функциональность своих ферментных систем, восстанавливая их, и проявляют большую стабильность. В некоторых случаях они способны сохранять жизнеспособность и активность на протяжении нескольких лет [12].

Зачастую анализируемые вещества находятся в растворе одновременно, что существенно затрудняет определение концентрации целевого субстрата. Возможные методы увеличения селективности биосенсорных систем на основе кислородного электрода типа Кларка подробно рассмотрены в обзоре [15]. Одним из наиболее широко применяемых способов является подбор различных условий функционирования клеток, таких как рН, метод иммобилизации, использование специальных диализных мембран и др. [17]. Выбор условий выращивания культур микроорганизмов также является достаточно эффективным методом повышения селективности биосенсоров [14]. Селективность медиаторных биосенсоров может изменяться в зависимости от используемого медиатора электронного транспорта [8]. Также существуют способы повышения селективности систем микробных биосенсоров путем использования различных математических методов обработки данных [2].

При этом важно отметить, что иммобилизация биологического компонента на электрохимическом преобразователе оказывает одно из наиболее важных влияний

© 2015 г. Каманин С.С., Чарыева С.Б., Арляпов В.А., Быков А.Г., Решетиллов А.Н.

* Автор для переписки:

Решетиллов Анатолий Николаевич

д.х.н., профессор, заведующий лабораторией биосенсоров
Института биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г.К. Скрябина РАН

142290 Московская обл., Пушкино, Проспект Науки, 5

Тел.: +7 (4967) 31-8600

E-mail: anatol@ibpm.pushchino.ru

на селективность биосенсора. Применение различных методов иммобилизации позволяет получить клетки, сохраняющие активность ферментных систем и способные функционировать достаточно длительное время. Включение биоматериала в полимерные гели является одним из наиболее эффективных способов иммобилизации [13]. Примером такой иммобилизации служит включение в гель поперечно-сшитого бычьего сывороточного альбумина (БСА) [10]. Получаемая после сшивания молекул БСА матрица обеспечивает высокую диффузию субстратов и метаболитов, формирует благоприятное для иммобилизованных объектов белковое окружение.

Сшивающим агентом в данном случае является глутаровый альдегид (ГА), который в больших концентрациях может оказывать токсичное воздействие на клетки микроорганизмов [9]. Описано, что ГА может негативно воздействовать на различные ферментные системы микроорганизмов с разной степенью [3]. Данная особенность может быть использована для изменения селективности микробных биосенсоров.

Одними из наиболее перспективных микроорганизмов для создания биосенсоров являются бактерии штамма *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* ВКМ В-1280 (Всероссийская коллекция микроорганизмов, ФГБУН ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН). Бактерии рода *Gluconobacter*, в частности бактерии штамма *G. oxydans* В-1280, обладают уникальной организацией метаболической системы, характеризующейся поверхностной локализацией ряда основных окислительных ферментов и высокой оперативностью электрон-транспортной цепи, что обеспечивает быстрый ответ биосенсора. Они широко используются в биотехнологии для процессов производства аскорбиновой, уксусной и других кислот [5], могут являться эффективными биокатализаторами в составе биосенсора [1].

Описанные ранее электрохимические модели биосенсоров, использующие клетки данного рода, были основаны на применении в качестве преобразователя кислородных, стеклоуглеродных и графитопастовых электродов, приготовленных методом матричной печати.

В настоящей работе рассматривается новый аспект возможного влияния на субстратную специфичность биосенсора, а именно: влияние на метаболизм микробной клетки путем предобработки ее биологически активным соединением. В качестве такого соединения был выбран ГА. Микробной культурой служили бактериальные клетки *G. oxydans* В-1280. Для создания биосенсоров использовали электрод, полученный методом матричной

печати, а также кислородный электрод типа Кларка с иммобилизованными клетками *G. oxydans* В-1280.

Материалы и методы

Биосенсорные измерения с использованием кислородного электрода

Электрохимические измерения проводили с использованием рН-метр-иономер-БПК-термооксиметра ЭКСПЕРТ-001-4.0.1 (ООО «Эконикс-эксперт», Россия), сопряженного с персональным компьютером, работающим под управлением специализированного программного обеспечения EXP2PR (ООО «Эконикс-эксперт», Россия), позволяющего проводить регистрацию и обработку сигналов сенсоров. Измеряемым параметром (ответом биосенсора) являлась максимальная скорость изменения концентрации кислорода при добавлении субстратов (мг/л·с). Преобразователями являлись кислородные электроды типа Кларка (ООО «Эконикс-эксперт», Россия) с иммобилизованными клетками микроорганизмов. Измерения выполнены в кювете объемом 5 мл. Для измерений использовали натрий-калиевый фосфатный буферный раствор (рН=6,8), концентрация солей в котором составляла 20 мМ. Раствор перемешивали магнитной мешалкой (200 об/мин.). Пробы вводили автоматическими микропипетками переменного объема (200–1000 мкл, 20–200 мкл, 0,5–10 мкл, Biotech, США).

Биосенсорные измерения с использованием электродов, полученных методом матричной печати

Сигнал регистрировали с использованием графитопастового электрода, полученного методом матричной печати (Русенс, Россия), на поверхности которого располагали иммобилизованный биологический материал. В качестве медиатора электронного транспорта использовали ферроцен (Sigma-Aldrich). В качестве преобразователя использовали потенциостат EmStat (PalmSens, Нидерланды). Рабочий потенциал составлял +350 мВ относительно хлорсеребряного электрода сравнения. Измерения проводили в кювете объемом 4 мл с калий-фосфатным буферным раствором (рН 6,8, 33 мМ), содержащим KCl в концентрации 0,1 М. Перемешивание осуществляли магнитной мешалкой с частотой 200 об/мин. Измеряемым параметром (ответом биосенсора) являлась скорость изменения выходного сигнала биосенсора при добавлении субстратов (нА/с). После каждого измерения осуществляли промывание электрода калий-фосфатным буферным раствором (рН 6,8, 33 мМ) в течение 1–2 минут.

Культивирование клеток *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* B-1280

В работе использовали бактерии *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* (ВКМ В-1280). Культивирование бактерий проводили на питательной среде состава: 200 г/л D-сорбит (ООО Диаэм); 20 г/л дрожжевой экстракт (ООО Диаэм); дистиллированная вода — 100 мл, рН среды — 5,2–5,5, при температуре 28 °С в течение 26 часов. Клетки собирали центрифугированием при 12000 об/мин. в течение 10 мин. и отмывали двукратно 33 мМ калий-фосфатным буфером с рН 6,8. Полученную биомассу замораживали при -10 °С.

Иммобилизация бактерий *G. oxydans* B-1280 на кислородном электроде

Биомассу клеток микроорганизмов взвешивали и ресуспендировали в калий-фосфатном буферном растворе (20 мМ, рН 6,8) до конечной концентрации 150 мг/мл по сырой массе бактерий. Далее 3 мкл полученной суспензии наносили на пористый стекловолоконный фильтр (Whatman GF/A, Sigma) размером 3×3 мм². Рецепторный элемент оставляли на воздухе при 20 °С до полного высыхания. Подготовленный таким образом рецепторный элемент размещали на поверхности кислородного электрода типа Кларка (ООО Эконикс-Эксперт) и фиксировали с помощью нейлоновой сетки.

Модификация печатных электродов бактериями *G. oxydans* B 1280

Для создания модифицированного микробными клетками электрода, полученного методом матричной печати, на поверхность рабочего электрода наносили 1 мкл раствора ферроцена в ацетоне с концентрацией 2 мг/мл и оставляли до полного высыхания. Далее в микропробирку помещали 7 мг БСА (Sigma-Aldrich), 100 мкл калий-фосфатного буферного раствора (рН=6,8, 33 мМ) и перемешивали до полного растворения.

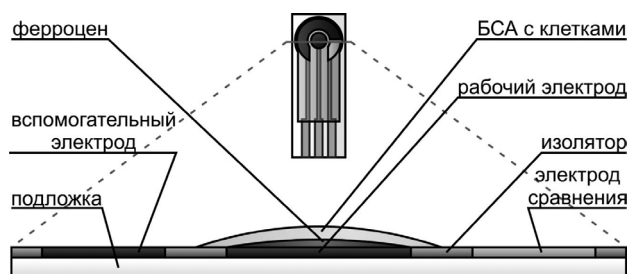


Рис. 1. Схема строения электрода, полученного методом матричной печати и модифицированного клетками бактерий *G. oxydans* B-1280

К полученному раствору добавляли 10 мкл суспензии клеток, разбавленной калий-фосфатным буферным

раствором (рН=6,8, 33 мМ) в соотношении 1:1, перемешивали и добавляли 15 мкл 25%-ного глутарового альдегида (Panreac Química S.L.U.). Полученную смесь перемешивали еще раз, отбирали 3 мкл и быстро переносили на электрод (рис. 1). Время полимеризации составляло 30 минут.

Модифицированный бактериальными клетками электрод, полученный методом матричной печати, перед использованием промывали в калий-фосфатном буферном растворе (рН=6,8, 33 мМ) в течение 5 минут.

Ингибирование клеточной активности бактерий *G. oxydans* B-1280

К образцам культуры *G. oxydans* B-1280 добавляли одинаковый объем 25% раствора ГА, интенсивно перемешивали и выдерживали при комнатной температуре в течение определенного времени, которое составляло от 2 до 70 минут. После экспозиции в ГА клетки промывались фосфатным буферным раствором (рН=6,8, 33 мМ) и иммобилизовались на электрод, полученный методом матричной печати, после чего биосенсор подвергали контрольному измерению активности клеток.

Для клеток, иммобилизованных на кислородном электроде типа Кларка, использовали также несколько модифицированную схему обработки ГА (далее в тексте, где необходимо, данный момент указывается). Суть схемы состояла в том, что ГА применяли для обработки уже иммобилизованных клеток, находящихся на электроде.

Для этого электрод, содержащий бактериальные клетки, помещали в 25% раствор ГА на 40 минут, после чего биосенсор отмывали фосфатным буферным раствором (рН=6,8, 20 мМ) пятикратно и проводились контрольные измерения активности клеток.

Определение количества живых клеток микроорганизмов высевом на плотные питательные среды по методу Коха

Разведения готовили в физиологическом растворе (0,85% раствор NaCl, ООО Диаэм). Для приготовления разведений физраствор разливали по 4,5 мл в 7 стерильных пробирок. Затем 0,5 мл исследуемой суспензии клеток стерильной автоматической микропипеткой переменного объема (Biotech, США) переносили в первую пробирку, полученное разведение тщательно перемешивали, а затем отбирали 0,5 мл полученной суспензии и переносили в следующую пробирку. Аналогично готовили все последующие разведения. Посев осуществляли на твердую агаризованную питательную среду в ряд стерильных чашек Петри по 50 мкл каждого разведения на чашку. По поверхности питательной среды суспензию распределяли стеклянным стерильным шпа-

телем. Колонии микроорганизмов подсчитывали через 2 суток инкубации.

Определение содержания глюкозы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Определение содержания глюкозы в образцах проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе марки «HP 1100» (Hewlett Packard, США) с использованием детектора рефрактометрического типа и колонки (300×6,5 мм), заполненной сульфированным сополимером полистирола и дивинилбензола в кальциевой ионной форме с размером частиц 30 мкм. В качестве элюента использовали деионизированную воду. Анализ проводили при температуре колонки 80 °С и скорости потока элюента 0,5 мл/мин.

Определение содержания этилового спирта методом газовой хроматографии

Определение содержания этилового спирта в образцах проводили методом газожидкостной хроматографии (ГХ) на хроматографе «Кристал-5000.2» (ЗАО СКБ «Хроматэк», Россия) с использованием пламенно-ионизационного детектора и капиллярной колонки DB-FFAP (50 м × 0,32 мм × 0,50 мкм) (Agilent, США). Условия анализа: температура термостата колонки — 70 °С, температура испарителя — 200 °С, температура детектора — 250 °С, скорость потока газа-носителя (гелия) — 0,10 дм³/час.

Результаты и обсуждение

Механизм ингибирующего действия ГА заключается в его способности связываться с белковыми молекулами на поверхности клеток. ГА может вступать в реакцию с α-аминогруппами аминокислот, N-концевыми аминогруппами пептидов и сульфгидрильной группой цистеина с образованием основания Шиффа [9]. При этом происходят изменения в конформации фермента, что может приводить к потере активности. Преобладающей мишенью для реакции в белках является ε-аминогруппа лизина, хотя реакция может также происходить и с тирозином, гистидином, или сульфгидрильными остатками [9]. У глюкозодегидрогеназы *G. oxydans* В-1280, ответственной за окисление глюкозы, отсутствуют дисульфидные связи, характерные для алкогольдегидрогеназы, окисляющей этиловый спирт. Данные ферменты отличаются особенностями в строении внешних петель, что, возможно, оказывает влияние на изменение субстратной специфичности при воздействии ГА [5]. Токсическое действие ГА на бактериальные клетки особенно сильно сказывается на способности клеток окислять этиловый

спирт [2, 3]. Поэтому была изучена зависимость каталитической активности клеток бактерий по отношению к глюкозе и этиловому спирту от времени экспозиции их в растворе ГА. Первичную оценку влияния ГА на активность клеток проводили с использованием кислородного электрода типа Кларка.

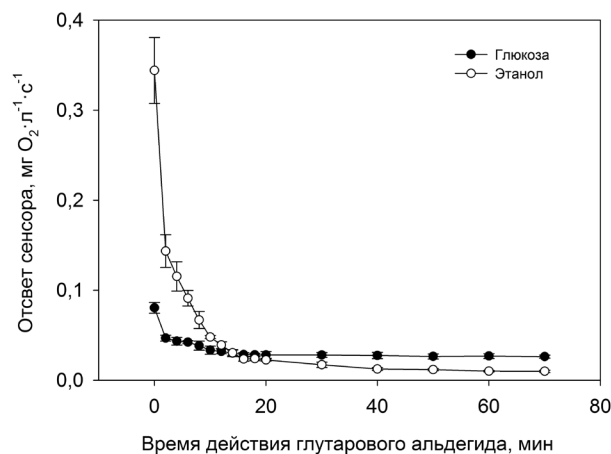


Рис. 2. Зависимость ответа биосенсора на добавление субстрата от времени действия ГА на клетки *G. oxydans* В-1280. Обработка клеток ГА до иммобилизации

В течение первых 20 минут действия ГА наблюдается существенное снижение окислительной активности бактерий по отношению к этиловому спирту. Активность клеток по отношению к глюкозе достигает своего минимума на 16-й минуте и после 30 минут активность остается практически постоянной (рис. 2). Через 40 минут экспозиции дальнейшие изменения активности клеток находятся в пределах доверительного интервала и ответ биосенсора на добавление раствора глюкозы становится больше ответа на эквивалентное количество этилового спирта в 2,5 раза.

Для выяснения, связано ли наблюдаемое изменение субстратной специфичности бактерий с отмиранием биомассы в результате действия ГА или с физиологическими изменениями живых бактериальных клеток, проведено определение численности жизнеспособных клеток бактерий методом высева на плотные питательные среды. Было подсчитано количество жизнеспособных клеток *G. oxydans* В-1280 после выдерживания их в растворе ГА в течение от 2 до 60 минут. В результате эксперимента показано, что даже после выдерживания бактерий в ГА в течение часа в биомассе остается значительное количество клеток, способных к воспроизводству, а именно: 47% от первоначального содержания. После выдерживания в течение 40 минут в биомассе остается 63% жизнеспособных клеток. Полученные результаты могут объясняться тем, что под

действием ГА в клетках могут происходить процессы, эквивалентные процессу старения.

Одним из наиболее актуальных направлений современной аналитической биотехнологии является разработка метода анализа, который позволил бы упростить и удешевить процедуру определения веществ без потери точности и специфичности, а также обеспечить возможность их постоянного мониторинга в реальных объектах. Перспективным подходом здесь является развитие биосенсоров на основе электродов, содержащих биоматериал с различающейся субстратной специфичностью. Использование планарных электродов, производимых методом трафаретной печати [11], а также электродов типа Кларка дает возможность разрабатывать высокочувствительные биоаналитические системы, обладающие низкой стоимостью и позволяющие существенно повысить уровень автоматизации биотехнологических производств.

В работе оценивалась сравнительная характеристика клеток, не обработанных ГА и подвергнутых его действию. В качестве преобразователя использовались графитовые электроды, выполненные методом матричной печати, в качестве медиатора электронного транспорта использовался ферроцен. Исследования, проведенные ранее, показали, что использование этого медиатора практически не влияет на субстратную специфичность бактерий *G. oxydans* В-1280 по отношению к глюкозе и этиловому спирту [8]. Сравнительная оценка проводилась также с помощью микробного биосенсора, основанного на электроде типа Кларка. Изучена субстратная специфичность обработанных в течение 40 минут ГА и необработанных бактерий *G. oxydans* В-1280 с использованием биосенсора на основе электродов, выполненных методом матричной печати (рис. 3), а также кислородного электрода (рис. 4). Ответ на глюкозу до обработки ГА для всех электродов был принят за 100%.

В результате действия ГА наблюдается снижение ответов на спирты относительно ответов на углеводы для электродов, выполненных методом матричной печати. При измерении кислородным электродом типа Кларка (рис. 4) наблюдается похожая тенденция. Для углеводов (в показанном для глюкозы примере на 59%), для спиртов происходит снижение сигнала в 2 раза для метилового спирта и в 32 раза — для этилового спирта. Полученные данные показывают, что при негативных процессах, происходящих в клетке под действием ГА, в первую очередь подавляется активность мембрано локализованной алкогольдегидрогеназы *G. oxydans* В-1280 [6]. Ферментные системы окисления углеводов, преимущественно локализованные в цитоплазме, менее под-

вержены процессам старения под действием ГА. Таким образом, искусственное старение клеток под действием ГА позволяет преобразовывать их субстратную специфичность и изменять селективность биосенсоров.

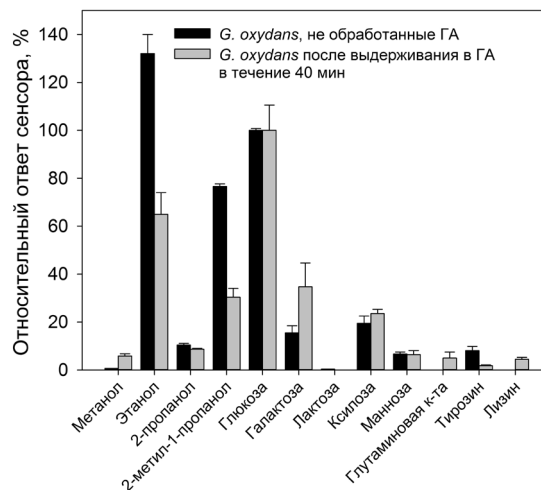


Рис. 3. Сравнение субстратной специфичности свежес выращенных клеток *G. oxydans* В-1280 и клеток, выдержанных в ГА с помощью печатного электрода. Обработка клеток ГА до иммобилизации

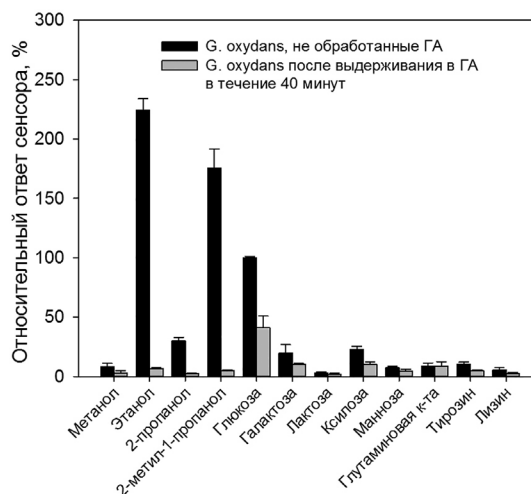


Рис. 4. Сравнение субстратной специфичности свежес выращенных клеток *G. oxydans* В-1280 и клеток, обработанных ГА; измерения кислородным электродом типа Кларка. Обработка клеток ГА после иммобилизации

Для проведения количественного анализа с использованием разработанного метода построены градуировочные зависимости ответов биосенсоров от концентрации глюкозы и этилового спирта (рис. 5) для биосенсоров с электродами, выполненными методом матричной печати и кислородного электрода типа Кларка (рис. 6) на основе как чистых, так и обработанных в течение 40 минут ГА микроорганизмов *G. oxydans* В-1280.

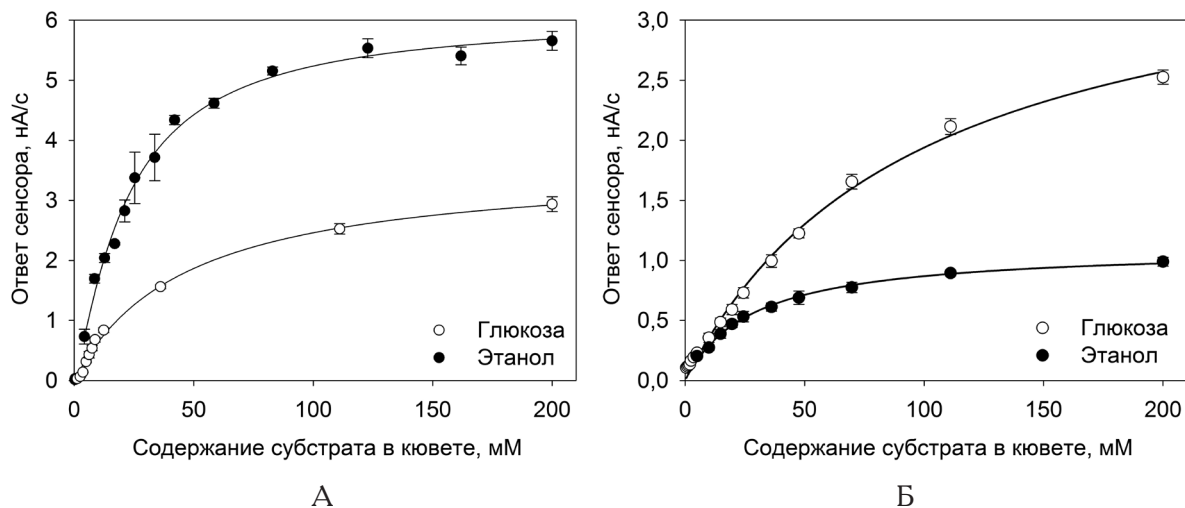


Рис. 5 (А, Б). Градуировочные зависимости ответа сенсора от концентрации этилового спирта и глюкозы; А — биосенсор на основе необработанных бактерий, Б — биосенсор на основе бактерий, обработанных ГА до иммобилизации

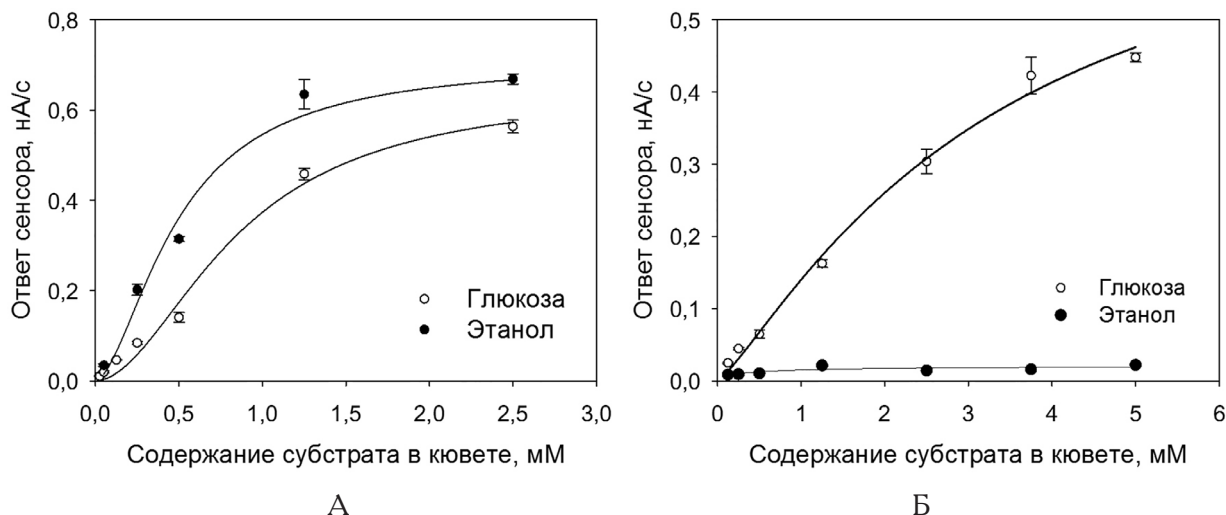


Рис. 6 (А, Б). Градуировочные зависимости ответа сенсора на основе кислородного электрода типа Кларка от концентрации этилового спирта и глюкозы; А — биосенсор на основе необработанных бактерий, Б — биосенсор на основе иммобилизованных бактерий, обработанных ГА

Полученные зависимости описывали уравнением, подобным уравнению Михаэлиса — Ментен:

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

R_{\max} — максимальный уровень сигнала биосенсора, при котором все молекулы фермента биорецепторного элемента участвуют в образовании фермент-субстратного комплекса. Достигается при $[S] \rightarrow \infty$;

K_M — эффективная константа Михаэлиса, численно равна концентрации субстрата, при которой скорость ферментативной реакции достигает половины максимального значения ($R=R_{\max}/2$).

Исходя из этого уравнения, величина отклика биосенсора будет пропорциональна концентрации субстрата $[S]$ только при условии $[S] < K_M$, в связи с чем значение константы Михаэлиса принимали за верхнюю границу линейного участка определяемых содержаний [4]. Нижняя граница линейного участка соответствует нижней границе определяемых содержаний; ее величина рассчитывается статистическим методом, исходя из критерия: относительное стандартное отклонение результатов измерения ($S_r(C)$) меньше 0,33 [7]. В таблице 1 представлены параметры градуировочных зависимостей биосенсоров на основе чистых и обработанных ГА микроорганизмов *G. oxydans* B-1280.

Таблица 1

Параметры градуировочных зависимостей ответов биосенсоров (электрод, полученный методом матричной печати / кислородный электрод типа Кларка) от концентрации глюкозы и этилового спирта в кювете

Параметры	Электрод	Необработанные бактерии <i>G. oxydans</i> В-1280		Бактерии <i>G. oxydans</i> В-1280, обработанные ГА	
		Субстраты			
		Глюкоза	Этанол	Глюкоза	Этанол
Верхняя граница определяемых концентраций (K_M), мМ	Печатный	45±4	23±2	97±2	28±2
	Кислородный	0,85±0,08	0,49±0,04	2,34±0,26	0,36±0,42
Нижняя граница определяемых концентраций, мМ	Печатный	0,15	2,9	1,5	3,7
	Кислородный	0,033	0,07	0,18	0,25
Максимальная скорость реакции (V_{max}), нА·с ⁻¹	Печатный	3,7±0,2	6,1±0,3	3,4±0,2	1,10±0,02
	Кислородный	0,65±0,04	0,71±0,03	0,54±0,05	0,02±0,01
Коэффициент чувствительности, нА·с ⁻¹ ·мМ ⁻¹	Печатный	0,074±0,002	0,113±0,009	0,0243±0,0003	0,018±0,001
	Кислородный	0,484±0,001	0,887±0,0004	0,149±0,0003	0,023±0,001

В результате действия ГА резко меняется соотношение чувствительностей биосенсоров на основе обработанных и необработанных клеток. Так, для биосенсора на основе электрода, выполненного методом матричной печати и модифицированного необработанными бактериями *G. oxydans* В-1280, чувствительность по отношению к этиловому спирту в 1,5 раз больше чувствительности к глюкозе. Для биосенсора на основе электрода, выполненного методом матричной печати, модифицированного бактериями *G. oxydans* В-1280, обработанными ГА, наблюдается обратная картина: чувствительность по отношению к этиловому спирту в 1,4 раза меньше чувствительности к глюкозе.

Для биосенсора на основе электрода типа Кларка с бактериями *G. oxydans* В-1280, не обработанными ГА, чувствительность по отношению к этиловому спирту в 1,8 раз превышает чувствительность к глюкозе. Для биосенсора, содержащего бактерии *G. oxydans* В-1280, обработанные ГА, чувствительность по отношению к этиловому спирту в 6,5 раза меньше чувствительности к глюкозе.

Воздействие ГА не только меняет соотношение чувствительностей к глюкозе и этиловому спирту, но и

приводит к снижению чувствительностей в отношении к обоим субстратам по абсолютному значению. Однако данное обстоятельство не является критичным, так как содержание глюкозы и этилового спирта в целевых реальных образцах (продукция виноделия, соки, ферментационные и бродительные среды) в несколько десятков раз выше нижней границы определяемых концентраций разработанных электродов. Полученные результаты позволяют предложить простой подход к изменению селективности биосенсоров на основе микроорганизмов *G. oxydans* В-1280, основанный на воздействии на них небольших доз ГА.

Для апробации электродов, выполненных методом матричной печати и модифицированных бактериями *G. oxydans* В-1280, были использованы образцы вин, сока и водки. Для определения глюкозы использовался электрод, выполненный методом матричной печати с микроорганизмами, обработанными ГА, а для определения этилового спирта — электрод, выполненный методом матричной печати с необработанными ГА бактериями. В качестве референтных методов были выбраны высокоэффективная жидкостная хроматография и газовая хроматография. Результаты представлены в таблице 2.

Определение содержания компонентов в реальных образцах с помощью электродов, выполненных методом матричной печати, и референтными методами

Образец	Компоненты	Полученное содержание, М	Содержание, определенное по стандартной методике, М
Вино «Улыбка Кубани»	Этанол	2,8±0,5	3,41±0,04
	Глюкоза	1,1±0,3	0,91±0,01
Вино «Кагор-32»	Этанол	2,5±0,5	3,25±0,04
	Глюкоза	0,9±0,2	0,82±0,01
Сок «Добрый» Яблоко	Этанол	0	0
	Глюкоза	0,16±0,05	0,152±0,006
Водка «Зеленая марка»	Этанол	6,8±0,1	6,90±0,02
	Глюкоза	0	0

Статистический анализ полученных результатов с использованием модифицированного теста Стьюдента показал, что значения концентраций компонентов, определяемые с помощью разработанных ферментных биосенсоров на основе электродов, выполненных методом матричной печати, и значения, полученные референтными методами, незначительно различаются между собой.

По определению селективность представляет собой возможность метода определять содержание искомого компонента в присутствии других сопутствующих компонентов [4]. Селективность по отношению к конкретному компоненту определяется отношением чувствительностей к данному веществу и мешающему. В данной работе предложен простой способ изменения селективности микробных биосенсоров по отношению к глюкозе и этиловому спирту путем обработки клеток раствором ГА. Предложенный способ позволяет использовать электрод с одними и теми же микроорганизмами до и после обработки ГА для определения этилового спирта и глюкозы, соответственно. Использование данного подхода открывает возможности для создания доступных и недорогих аналитических систем, использование которых, в отличие от стандартных методов ГХ и ВЭЖХ, не требует дополнительной пробоподготовки.

Заключение

В ходе проведенного исследования показано, что при добавлении ГА к суспензии клеток *G. oxydans* В-1280 наблюдается изменение субстратной специфичности бактерий. В результате действия ГА отмечается снижение окислительной активности по отношению к спиртам относительно активности к углеводам.

Получены градуировочные зависимости ответа сенсора от концентрации глюкозы и этилового спирта для модифицированных электродов, выполненных методом матричной печати, а также кислородного электрода типа Кларка на основе обработанных и необработанных ГА клеток *G. oxydans* В-1280. Показано, что для биосенсора с электродом, выполненным методом матричной печати, модифицированным необработанными бактериями *G. oxydans* В-1280, чувствительность по отношению к этиловому спирту в 1,5 раз больше чувствительности к глюкозе. Для биосенсора на основе кислородного электрода типа Кларка и необработанных ГА бактерий *G. oxydans* В-1280, чувствительность по отношению к этиловому спирту в 1,8 раз больше чувствительности к глюкозе.

Для биосенсора с электродом, выполненным методом матричной печати и модифицированного бактериями

G. oxydans В-1280, обработанными ГА, чувствительность по отношению к этиловому спирту в 1,4 раза меньше чувствительности к глюкозе. Для биосенсора на основе кислородного электрода типа Кларка и бактерий *G. oxydans* В-1280, обработанных ГА, чувствительность по отношению к этиловому спирту в 6,5 раз меньше чувствительности к глюкозе.

Таким образом, ингибирование окислительной активности микроорганизмов *G. oxydans* В-1280 является простым способом изменения селективности биосенсоров на их основе. Полученные результаты могут быть использованы при разработке биосенсоров для анализа алкогольной продукции, ферментационных и бродительных сред при минимальной пробоподготовке.

Работа выполнена в рамках гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых — кандидатов наук, договор № 14.Z56.14.330-МК и Государственного задания Минобрнауки России № 14.2094.2014/К.

Литература

1. Арляпов В.А., Асулян Л.Д., Блохин И.В., Карташова Т.Д., Власова Ю.А., Ануфриев М.А. Иммунизация клеток *Glucanobacter oxydans* для создания стабильных рецепторных элементов биосенсоров // Известия ТулГУ. Серия Химия. — 2006. — Т. 6. — С. 137–144.
2. Арляпов В.А., Понаморев О.Н., Алферов В.А. Многоканальный биосенсор для определения содержания глюкозы, метанола и этанола при их совместном присутствии // Биотехнология. — 2008. — № 5. — С. 84–91.
3. Арляпов В.А., Понаморев О.Н., Алферов С.В., Алферов В.А., Решетиллов А.Н. Применение низкоселективных микробных биосенсоров для определения содержания компонентов в многокомпонентных водных средах // Сенсорные системы. — 2011. — Т. 25. — № 4. — С. 352–360.
4. Карякин А.А., Уласова Е.А., Вагин М.Ю., Карякина Е.Е. Биосенсоры: устройство, классификация и функциональные характеристики // Сенсор. — 2002. — № 1. — С. 16–24.
5. Луста К.А., Решетиллов А.Н. Физиолого-биохимические особенности *Glucanobacter oxydans* и перспективы использования в биотехнологии и биосенсорных системах // Прикладная биохимия и микробиология. — 1998. — Т. 34. — № 4. — С. 339–353.
6. Понаморев О.Н., Инджгия Е.Ю., Алферов В.А., Решетиллов А.Н. Эффективность биоэлектрокаталитического окисления этанола целыми клетками и мембранной фракцией бактерий *Glucanobacter oxydans* в присутствии медиаторов электронного транспорта // Электрохимия. — 2010. — Т. 46. — № 12. — С. 1503–1508.
7. Статистика в аналитической химии / Дерффель К. — 5-е изд. — Москва: «Мир», 1994. — 268 с.
8. Чигринова Е.Ю., Бабкина Е.Е., Понаморев О.Н., Алферов В.А., Решетиллов А.Н. Микробные биосенсоры на основе производных ферроцена и бензохинона, применяемых в качестве медиаторов // Сенсорные системы. — 2007. — Т. 21. — № 3. — С. 263–269.
9. Beauchamp R.O., Jr., St. Clair M.B., Fennell T.R., Clarke D.O., Morgan K.T., Kari F.W. A critical review of the toxicology of glutaraldehyde // Crit. Rev. Toxicol. — 1992. — Vol. 22(3–4). — P. 143–174.
10. Brena B.M., Batista-Viera F. Immobilization of enzymes / In: Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells (ed. J.M. Guisan). — Totowa N.J.: Humana press, 2006. — P. 15–30.
11. Domínguez-Renedo O., Alonso-Lomillo M.A., Arcos-Martínez M.J. Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications // Talanta. — 2007. — Т. 73. — № 2. — С. 202–219.
12. Gilchrist K.H., Barker V.N., Fletcher L.E., DeBusschere B.D., Ghanouni P., Giovangrandi L., Kovacs G.T. General purpose, field-portable cell-based biosensor platform // Biosens. Bioelectron. — 2001. — Vol. 16(7–8). — P. 557–564.
13. Moschou E.A., Bachas L.G., Daunert S. Smart Hydrogel Materials / In: Handbook of Biosensors and Biochips. — John Wiley & Sons Ltd, 2008.
14. Racek J., Musil J. Biosensor for lactate determination in biological fluids. 2. Interference studies // Clin. Chim. Acta. — 1987. — Vol. 167(1). — P. 59–65.
15. Riedel K., Renneberg R., Wollenberger U., Kaiser G., Scheller F.W. Microbial sensors: Fundamentals and application for process control // Journal of Chemical Technology & Biotechnology. — 2007. — Vol. 44(2). — P. 85–106.
16. Su L., Jia W., Hou C., Lei Y. Microbial biosensors: A review // Biosensors and Bioelectronics. — 2011. — Vol. 26(5). — P. 1788–1799.
17. Tkac J., Vostiar I., Gorton L., Gemeiner P., Sturdik E. Improved selectivity of microbial biosensor using membrane coating. Application to the analysis of ethanol during fermentation // Biosensors and Bioelectronics. — 2003. — Vol. 18(9). — P. 1125–1134.
18. Turner A.P.F. Biosensors: sense and sensibility // Chemical Society Reviews. — 2013. — Vol. 42(8). — P. 3184–3196.

Список сокращений:

ГА — глутаровый альдегид.

ГХ — газожидкостная хроматография.

ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография.

**EFFECT OF GLUTARALDEHYDE
ON THE SUBSTRATE SPECIFICITY OF BACTERIA
GLUCONOBACTER OXYDANS SUBSP. INDUSTRIUS VKM B-1280**

S.S. KAMANIN¹, S.B. CHARYEVA¹, V.A. ARLYAPOV¹, A.G. BYKOV², A.N. RESHETILOV²

¹ *Tula State University, Tula;*

² *G.K. Scriabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, Pushchino, Moscow Region*

It is found that the exposure of the cell suspension *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* B-1280 in solutions of glutaraldehyde, and then their use in electrochemical biosensor cell receptor leads to a change in substrate specificity of bacteria — reducing oxidative activity *G. oxydans* microorganism B-1280 against ethanol. This effect can be attributed to a simple way of varying selectivity biosensor cell based on the data. The results can be used in the development of biosensors for the analysis of alcoholic beverages, fermentation and fermentative media requiring minimal sample preparation.

Keywords: biosensors, selectivity, immobilization, inhibition.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ КОНВЕРСИЯ ОТХОДОВ ОТ РАЗДЕЛКИ КРАБА *PARALITHODES CAMTSCHATICUS* ПРИ ПОЛУЧЕНИИ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ С ХИТИНОМ

Т.А. ИГНАТОВА, Т.В. РОДИНА, А.В. ПОДКОРЫТОВА*

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

Разработаны рациональные режимы ферментативного гидролиза: ГМ 1:1; температура 50 ± 2 °С, рН $7,5 \pm 0,5$, продолжительность 45 мин. и технологическая схема получения кормовой добавки с хитином из отходов от разделки краба *Paralithodes camtschaticus*. Кормовой продукт, содержащий хитин, рекомендовано использовать как кормовую добавку в рационе кормления сельскохозяйственных животных в агропромышленном комплексе (АПК).

Ключевые слова: отходы от разделки краба, хитин, хитозан, ферменты, кормовая добавка.

Введение

Камчатский краб (*Paralithodes camtschaticus*) — один из самых крупных ракообразных Дальнего Востока — является важнейшим объектом промысла. В середине XX века камчатский краб был преднамеренно вселен Баренцево море, где к началу XXI века его запасы достигли промысловых объемов [5]. Общий улов крабов в Российской Федерации в настоящее время составляет около 40 тыс. тонн [16]. Добываемый краб в основном используется для получения крабового мяса как деликатесной пищевой продукции. При разделке крабов и производстве сыро-мороженных или варено-мороженных конечностей краба образуется от 30 до 50% отходов (карапакс краба с абдоменом и внутренностями), что составляет в среднем от 12 до 20 тыс. т в год. До настоящего времени отходы от разделки крабов не используются промышленностью, несмотря на то, что в их составе содержатся такие высокоценные компоненты, как белок (12,5%), хитин (2,6%), липиды (0,24%) и минеральные элементы (4,96%) (в расчете на сырой материал). Карапакс с абдоменом используют для получения хитозана

и на его основе биологически активных добавок к пище (БАД), а гепатопанкреас краба — в качестве источника ферментных препаратов и жиров [10].

В последнее время хитин-хитозан успешно используют в различных направлениях — медицине, пищевой отрасли и др. В животноводстве применяют в качестве сорбента при различных желудочно-кишечных заболеваниях неинфекционной, так как хитиновые препараты ускоряют курс лечения и позволяют исключить или значительно уменьшить использование антибиотиков и сульфаниламидов, обладающих кумулятивным эффектом [1]. Учеными Уральской государственной академии ветеринарной медицины (УГАВМ) были проведены исследования, результаты которых показали возможность широкого применения хитозана для лечения и профилактики интоксикаций сельскохозяйственных животных и птиц гетероциклическими пестицидами [14]. Также показано положительное влияние хитозана на состояние минерального обмена в организме крупного рогатого скота, поскольку в результате усиления элиминации из организма животных меди, никеля, кадмия и свинца создаются условия для оптимизации соотношения минеральных элементов [17].

Карапакс с абдоменом и внутренностями — это панцирь- и белоксодержащие отходы (ПБСО), которые в связи с высоким содержанием белка (12,5%) перспективно использовать в качестве сырья для получения белковых гидролизатов методом биотехнологической конверсии.

В связи с изложенным является целесообразной разработка комплексной ресурсосберегающей технологии

© 2015 г. Игнатова Т.А., Родина Т.В., Подкорытова А.В.

* Автор для переписки:

Подкорытова Антонина Владимировна
доктор технических наук, профессор
зав. сектором водорослей ФГБНУ «ВНИРО»
107140 Москва, В. Красносельская, 17
Тел.: +7 (499) 264-95-78
Факс: +7 (499) 264-91-87
E-mail: podkor@vniro.ru

переработки отходов от разделки камчатского краба и создание кормовой добавки, содержащей хитин.

При использовании гидролизатов в качестве кормовых компонентов для рыб, птиц или молодняка домашних животных, как правило, желательна средняя степень гидролиза белков ввиду того, что растворы гидролизатов имеют значительно большее, по сравнению с обычной белковой пищей, осмотическое давление и поэтому, попадая в ЖКТ, могут вызвать диарею и рвоту [6]. Согласно опубликованным данным, для белковых гидролизатов, применяемых в кормах в качестве добавки, максимальная степень гидролиза не является необходимой [9].

Оптимальная степень расщепления белков в кормовых гидролизатах специфична для каждого вида животного и может быть определена только экспериментально. Так, например, для обеспечения максимального прироста молоди рыб, как показано в научных публикациях, степень гидролиза белка должна составлять от 15 до 25%. При меньшей степени гидролиза, как и при большей, наблюдается снижение их прироста и увеличение кормового коэффициента [18].

В связи с этим при разработке технологии получения кормовой добавки из отходов от разделки краба камчатского *Paralithodes camtschaticus* основной задачей является правильный выбор ферментов, специфичных для данного типа сырья, и определение рациональных режимов гидролиза его белковой составляющей.

Материалы и методы

При разработке технологии получения кормовой добавки использовали панцирь- и белоксодержащие отходы (ПБСО) от разделки краба камчатского *P. camtschaticus*, выловленного в Баренцевом море (Норвегия), — это карапакс с абдоменом и внутренностями. Отходы хранились до переработки в замороженном состоянии в течение 1 месяца при температуре минус 20 ± 2 °С.

Массовые доли воды, липидов, общего, аминного, небелкового азотов и минеральных веществ определяли по ГОСТ 7636-85 и Лазаревскому А.А. [7]. Содержание хитина в отходах от разделки краба камчатского *Paralithodes camtschaticus* и кормовой добавке определяли весовым методом согласно [12].

При изучении процесса ферментализации планирование и анализ эксперимента проводили, применяя план неполной классификации дисперсионного анализа (ортогональный план — латинский квадрат 3×3). В

качестве переменных количественных факторов нами были выбраны концентрация фермента, используемого для обработки крабовых отходов (карапакс краба с абдоменом и внутренностями), и продолжительность процесса ферментализации. Уровни факторов: «концентрация фермента» (с) — 0,1, 0,4, 0,7% к массе суспензии; «продолжительность предобработки» (τ) — 1, 1,5, 2 часа. Качественным фактором в эксперименте являются различные типы ферментов, используемые для обработки крабовых отходов. При разработке технологии использовали ферментные препараты: папаин (Pap) (активность 800–900 ед./мг); Brewers protease BL (Br) (активность 180000 ед./г); Strenzym FP 21021 L (St) (активность 100000 ед./г).

Ферментализ. ПБСО (карапакс краба с абдоменом и внутренностями) измельчали на волчке в замороженном состоянии. Навеску средней пробы помещали в термо- и химически устойчивую емкость, заливали водой с использованием гидромодуля (ГМ) 1:1, смесь перемешивали и нагревали до температуры 50 ± 2 °С, затем вносили рассчитанное количество фермента (от 0,1 до 0,7% к массе суспензии) и проводили гидролиз в течение 1–2 часа при pH $7,5 \pm 0,5$. Степень гидролиза контролировали по соотношениям аминного азота к общему азоту, небелкового азота к общему азоту, аминного азота к небелковому азоту и по переходу общего азота в гидролизат.

Степень гидролиза белков в ферментализатах сравнивали с таким показателем для автолизата, полученного по той же схеме.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили в соответствии с «Математическими методами планирования экспериментов» [2, 3].

Аминокислотный состав белков определяли методом ВЭЖХ на хроматографе жидкостном ионно-кратическом «Стайер» в соответствии с «Методами практической биотехнологии» [8].

Жирнокислотный состав липидов определяли на газожидкостном хроматографе Shimadzu по ГОСТ Р 51483-99, ГОСТ Р 51486-99, а также с использованием Руководства Р 4.1.1672-03 по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище.

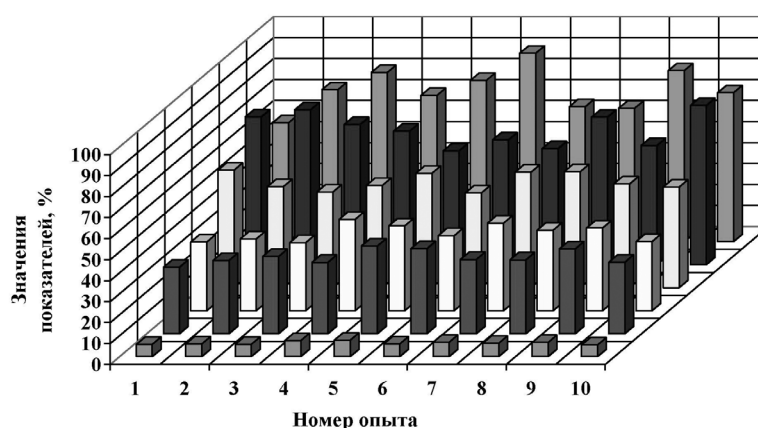
Содержание минеральных веществ, таких как натрий, калий, фосфор, определяли в соответствии с «Руководство по методам анализа качества и безопасности пищевых продуктов» [15], кальций — ГОСТ 26570, железо — ГОСТ 30178.

Безопасность определяли по микробиологическим показателям и содержанию тяжелых металлов, которые

устанавливали в соответствии с требованиями Технического регламента таможенного союза «О безопасности кормов и кормовых добавок» (ТР 201_/00_/ТС) (с даты введения его в действие) согласно существующим ГОСТ: КМАФАнМ – ГОСТ 10444.15; БГКП (ко-лиформы) – ГОСТ Р 52816; *Staphylococcus aureus* – ГОСТ Р 52815; патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы – ГОСТ Р 52814; плесени и дрожжи – ГОСТ 10444.12, тяжелые металлы (кадмий, свинец) – по ГОСТ Р 51301; мышьяк – по ГОСТ 26930; содержание ртути – по ГОСТ Р 53183.

Результаты

Результаты ферментативного гидролиза отходов, подготовленных от разделки крабов, в состав которых входят карапакс краба с абдоменом и внутренностями, проведенного по методике, описанной выше, представлены на рисунке 1. Полученные данные (см. рис. 1) были использованы для выбора рациональных параметров ферментализации. Проведена статистическая обработка результатов эксперимента, на основании которых рассчитаны критерии Фишера (табл. 1).



№ опыта	Наименование фермента	τ, ч	с, %
1	St	1,0	0,1
2	St	1,5	0,4
3	St	2,0	0,7
4	Br	1,0	0,4
5	Br	1,5	0,7
6	Br	2,0	0,1
7	Paр	1,0	0,7
8	Paр	1,5	0,1
9	Paр	2,0	0,4
10	Комплекс собственных ферментов	1,5	-

■	Содержание сух. в-в в гидролизате, %
■	Содержание Нам., %к Нобщ.
□	Выход Нобщ. в гидролизат, % от содержания Нобщ. в сырье
□	Содержание Ннеб., %к Нобщ.
■	Выход остатка после ферментализа, % к исходному сырию
■	Содержание Нам.,% к Ннеб.

Рис. 1. Изменение степени гидролиза белка, накопления сухих веществ в гидролизате, выхода азотсодержащих веществ в раствор и остатка после ферментализации в зависимости от параметров процесса

Таблица 1

Значения расчетного критерия Фишера ($F_{\text{экс}}$) по контролируемым показателям

Источник дисперсии	Наименование отклика процесса					
	$N_{\text{ам.}} / N_{\text{общ.}}$	$N_{\text{ам.}} / N_{\text{неб.}}$	$N_{\text{неб.}} / N_{\text{общ.}}$	выход $N_{\text{общ.}}$ в гидролизат	содержание сухих в-в в гидролизате	выход остатка после ферментализа
Концентрация фермента	0,7286	1,1058	0,7159	15,1799	2,9649	1,6253
Продолжительность ферментализа	4,4796	19,6362	2,9143	14,3227	1,5965	0,6141
Тип фермента	2,6536	4,8809	0,9748	72,3228	6,3859	3,4686

При сравнении полученного критерия Фишера ($F_{\text{экс}}$) с табличным значением этого критерия ($F_{\text{таб.}}=19$, при $\alpha=0,05$; $f_1=2$; $f_2=2$ [3]) было установлено, что выбранные переменные факторы оказывают влияние на степень гидролиза ($N_{\text{ам.}}/N_{\text{неб.}}$) и выход азотсодержащих веществ в раствор. При этом на степень гидролиза ($N_{\text{ам.}}/N_{\text{неб.}}$) большее влияние оказывает продолжительность ферментализации, а на выход азотсодержащих веществ в раствор — тип фермента, используемого для гидролиза белка (см. табл. 1). На соотношения $N_{\text{ам.}}/N_{\text{общ.}}$, $N_{\text{неб.}}/N_{\text{общ.}}$, содержание сухих веществ в гидролизате, выход остатка после ферментализации выбранные переменные факторы не оказывают статистически значимого влияния (см. табл. 1).

При сравнении средних значений выхода азотистых веществ в раствор с помощью рангового критерия Дункана [3] при обработке сырья ферментами различных типов было установлено, что в процессе ферментализации наименьший выход азотсодержащих веществ в раствор наблюдается при применении ферментного препарата Strenzym FP 21021 L, а наибольший — при использовании папаина и Brewers protease BL. Проведенные вычисления показали отсутствие статистически значимых различий между использованием ферментов папаина и Brewers protease BL (табл. 2).

Таблица 2

Сравнительные данные средних значений выхода азотистых веществ в раствор при использовании различных типов ферментов в процессе гидролиза ПБСО

Нормированная ошибка	0,26	
Наименьшие значимые ранги	1,58 1,58 1,58	
Упорядоченные средние значения	33,10 39,87 39,83	
Сравнение средних значений	$St^1 - Br^2$ 6,76 > 1,58	Различие значимо
	$Pa^3 - Br$ 0,03 < 1,58	Различие не значимо
	$Pa^3 - St$ 6,73 > 1,58	Различие значимо

Примечания: 1 — St (Strenzym FP 21021 L); 2 — Br (Brewers protease BL); 3 — Pa (папаин)

Папаин является более дешевым и доступным ферментным препаратом по сравнению с Brewers protease BL, в связи с чем целесообразным является его использование для гидролиза белков, содержащихся в крабовых отходах.

Сравнение значений степени гидролиза ($N_{\text{ам.}}/N_{\text{неб.}}$), полученных в ходе экспериментов (см. рис. 1), выявило, что данный показатель возрастает с увеличением продолжительности гидролиза и мало зависит от концентрации ферментного препарата. В связи с этим целесообразным является применение наименьшей концентрации папаина (0,1% к массе суспензии) для проведения ферментализации.

Известно, что внутренности краба содержат комплекс ферментов (протеиназы, коллагеназы, липазы и т.д.) [13]. Изучение изменения содержания аминного азота в гидролизате в процессе ферментализации, протекающего под действием комплекса собственных ферментов, показало, что его накопление происходит в течение 1,5–2,0 часов (рис. 2), что хорошо согласуется с данными, опубликованными ранее [11].

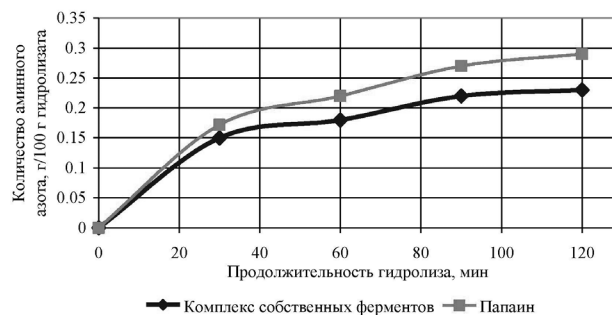


Рис. 2. Изменение содержания аминного азота в гидролизате при проведении ферментализации крабовых отходов под действием папаина и комплекса собственных ферментов

Таким образом, было установлено, что гидролиз белков крабовых отходов под действием комплекса собственных ферментов следует проводить в течение 1,5 часов.

Сравнение степеней гидролиза белков при использовании папаина (концентрация 0,1% к массе суспензии) и проведение ферментализации под действием собственных ферментов, продемонстрировало, что в случае использования комплекса собственных ферментов ферментализация идет практически до конечных продуктов, о чем свидетельствует высокое содержание $N_{\text{ам.}}/N_{\text{неб.}}$ 71,0%, по сравнению с папаином. При использовании папаина степень гидролиза заметно меньше и составляет 63,6%. Вероятно, гидролиз под воздействием папаина проходит ступенчато с образованием на первой стадии водорастворимых пептидов, с последующим их расщеплением до свободных аминокислот, что и обуславливает более высокий выход азотсодержащих веществ в гидролизат, по сравнению с процессом под действием собственных ферментов (см. рис. 1, опыты № 8 и 10).

Сравнение степеней расщепления белков, содержащихся в отходах от разделки краба, определенных по относительному содержанию небелкового и аминного азота в гидролизате (без учета выхода азотсодержащих веществ в гидролизат), показало, что наиболее эффективным является комплекс собственных ферментов краба. Если же об эффективности действия ферментов судить по выходу азотсодержащих веществ в гидролизат, то наиболее действенным по отношению к белкам крабовых отходов представляется папаин (см. рис. 1).

Таким образом, на основании экспериментальных данных было установлено, что для получения гидролизата с более высокой степенью расщепления белка, но низким выходом растворимых азотистых веществ, целесообразно использовать комплекс собственных ферментов внутренностей краба, а для получения гидролизата со средней степенью гидролиза белка и высоким выходом азотсодержащих веществ необходимо применять папаин.

В связи с тем, что для кормления сельскохозяйственных животных применяют гидролизаты со средней степенью гидролиза, то целесообразно применять папаин в концентрации не более 0,1% к массе суспензии для получения кормовых гидролизатов из отходов от переработки крабов.

Использование папаина к тому же позволяет повысить эффективность переработки крабовых отходов за счет более высокого выхода азотсодержащих веществ

из сырья в гидролизат (см. рис. 1, опыты № 8 и 10) и сократить продолжительность процесса, о чем свидетельствует более быстрое накопление продуктов гидролиза (см. рис. 2) по сравнению с применением комплекса собственных ферментов.

Таким образом, нами получен продукт из крабовых отходов (карапакс краба с абдоменом и внутренностями) при следующих параметрах режима ферментализации: ГМ 1:1; температура 50 ± 2 °С, рН $7,5 \pm 0,5$, продолжительность 45 мин.

С помощью анализа степени гидролиза крабовых отходов обнаружено, что полученный продукт можно отнести к кормовой добавке с низкой степенью гидролиза белков (табл. 3).

По внешнему виду кормовая добавка — это суспензия светло-розового цвета, содержащая взвешенные частицы хитина.

Анализ химического состава кормовой добавки из ПБСО показал наличие в ее составе 1,7% хитина (см. табл. 3), что положительно ее характеризует. Исследованиями ряда авторов доказано, что применение хитина-хитозана в условиях свиноводческого комплекса ведет к увеличению показателей, характеризующих воспроизводительные, откормочные, мясные качества животных, а также позволяет сократить расход кормов на 5,95–15,64% и получить дополнительный прирост живой массы [4].

Таблица 3

Характеристика кормовой добавки из ПБСО

Наименование показателя и единицы измерения		Значение показателя	
Содержание	воды, %	86,9	
	сухих веществ, %	13,1	
	золы, % (% сух. в-ва)	5,1 (39,0)	
	хитина, % (% сух. в-ва)	1,7 (12,8)	
	липидов, % (% сух. в-ва)	0,1 (0,5)	
	белка, % (% сух. в-ва)	6,2 (47,7)	
	$N_{\text{общ.}}$, г/100 г гидролизата	1,114	
	$N_{\text{ам.}}$	г/100 г гидролизата	0,180
		$N_{\text{ам.}} / N_{\text{общ.}}$, % к $N_{\text{общ.}}$	16,2
		$N_{\text{ам.}} / N_{\text{неб.}}$, % к $N_{\text{неб.}}$	57,5
	$N_{\text{неб.}}$	г/100 г гидролизата	0,313
$N_{\text{неб.}} / N_{\text{общ.}}$, % к $N_{\text{общ.}}$		28,1	
Выход $N_{\text{общ.}}$ в гидролизат, % от содержания $N_{\text{общ.}}$ в сырье, %		20,5	

В результате анализа содержания токсичных элементов в кормовой добавке и микробиологических показателей установлены ее безопасность и соответствие требованиям Технического регламента таможенного союза «О безопасности кормов и кормовых добавок» (с даты введения его в действие).

При использовании белковых гидролизатов как источника аминокислот в кормах животных большое значение придается их аминокислотному составу.

При анализе состава аминокислот и их содержания в кормовой добавке из ПБСО (табл. 4) было установлено, что гидролизат содержит 10 незаменимых аминокислот необходимые для рациона сельскохозяйственных животных.

Таблица 4

**Аминокислотный состав
кормовой добавки из ПБСО**

Наименование аминокислоты	Содержание аминокислоты в кормовом продукте, мг/100 г продукта
Аспарагиновая кислота	578,50
Треонин*	277,98
Серин	280,37
Глутаминовая кислота	877,89
Глицин	443,51
Аланин	349,55
Метионин+цистин*	95,37
Валин*	150,46
Изолейцин*	230,27
Лейцин*	486,68
Тирозин	230,27
Фенилаланин*	287,87
Гистидин*	251,03
Лизин*	427,22
Аргинин*	373,16
Пролин	664,50

Примечание: *незаменимые аминокислоты

Как показали исследования, кормовой продукт, полученный из отходов от разделки крабов, содержит липиды в количестве 0,5% в расчете на сухие вещества. Липиды имеют высокую энергетическую ценность и являются структурным материалом, входящим в состав протоплазмы клеток. Отдельные жирные кислоты, такие как линолевая, линоленовая и арахидоновая, считаются незаменимыми, жизненно необходимыми для нормаль-

ных процессов обмена веществ, роста и развития животных; поэтому они обязательно должны содержаться в рационе [7]. В связи с этим нами проведены исследования жирнокислотного состава липидов ферментолизата, полученного из ПБСО. Результаты выявили, что около 80% жирных кислот липидов, содержащихся в ферментолизате, представлены моно- и полиненасыщенными жирными кислотами. Из незаменимых жирных кислот для многих животных является линолевая, которая обнаружена в ферментолизате в количестве 1,23% от суммы жирных кислот.

Содержание и состав минеральных элементов в кормах животных играет очень существенную роль, так как они выполняют важные структурные и динамические функции в обмене веществ их организма. Минеральные вещества являются структурными элементами, создают внутреннюю среду организма, необходимую для нормального функционирования ферментов, гормонов и витаминов, поддерживают кислотно-щелочное равновесие и осмотическое давление в клетках и тканях животного. При организации рационального кормления с/х животных необходимо нормировать и контролировать содержание в рационах кальция, фосфора, натрия, железа, цинка, марганца, меди, кобальта, йода и фтора [7]. Анализ кормовой добавки из ПБСО показал наличие в ней особо важных минеральных элементов для различных производственных групп животных (табл. 5).

Таблица 5

**Основные минеральные элементы
кормовой добавки из ПБСО**

Наименование минерального элемента	Единицы измерения, на /кг продукта	Содержание минерального элемента
Фосфор	г	1,03
Натрий	г	2,99
Калий	г	2,37
Кальций	г	2,52
Железо	мг	17,52

Заключение

Таким образом, на основании проведенных исследований научно обоснована комплексная биотехнология переработки панцирь- и белоксодержащих отходов от разделки камчатского краба (ПБСО). Разработаны биотехнологические режимы (ГМ 1:1; температура 50 ± 2 °С, рН $7,5 \pm 0,5$, продолжительность 45 мин.) ферментолиза отходов от разделки краба камчатского *Paralithodes camtschaticus*, применение которых позволяет полу-

чить кормовую добавку, отвечающую требованиям по показателям безопасности и содержанию биологически важных компонентов, таких как незаменимые аминокислоты, жирные кислоты и минеральные элементы, а также хитин, необходимый для усиления адаптационных возможностей и увеличения продуктивности сельскохозяйственных животных.

Литература

1. Албулов А.И., Самуйленко А.Я. и др. Лечебно-профилактические препараты из гидробионтов для молодняка сельскохозяйственных животных / Материалы Всероссийской научной конференции «Совершенствование методов контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов». — М., 2001. — С. 202–203.
2. Грачев Ю.П., Плакси Ю.М. Математические методы планирования экспериментов. — М.: ДеЛи принт, 2005. — 296 с.
3. Джонсон Н., Лион Ф. Статистика и планирование эксперимента в технике и науке: Методы обработки данных. — М.: Издательство Мир, 1980. — 520 с.
4. Журавель В.В. Продуктивность и этологические особенности свиней на фоне применения хитозана: автореф. дис. ... канд. сельскохозяйственных наук: 06.02.10. — Курган, 2011. — 20 с.
5. Камчатский краб [Электронный ресурс]. — Режим доступа: https://ru.wikipedia.org/wiki/Камчатский_краб.
6. Канидьева А.Н., Турецкий В.И., Пономарев С.В. и др. Гидролизаты рыбной муки в стартовых кормах для личинок сиговых рыб как ведущий фактор эффективности кормления / Биологические основы рационального кормления рыб. Вып. 49. — М., 1986. — С. 121–126.
7. Лазаревский А.А. Технохимический контроль в рыбообработывающей промышленности. — М.: Пищепромиздат, 1955. — 518 с.
8. Лисицын А.Б., Иванкин А.Н., Неклюдов А.Д. Методы практической биотехнологии. Анализ компонентов и микропримесей в мясных и других пищевых продуктах. — М.: ВНИИМП, 2002. — 408 с.
9. Мухин В.А., Новиков В.Ю. Ферментативные белковые гидролизаты тканей морских гидробионтов: получение, свойства и практическое использование. — Мурманск: ПИНРО, 2001. — 97 с.
10. Немцев С.В. Комплексная технология хитина и хитозана из панциря ракообразных. — М.: ВНИРО, 2006. — 134 с.
11. Роль Л.Н. Исследование режима гидролиза белков краба-стригуна комплексом протеаз внутренностей и ферментным препаратом протосубтилин Г 10Х / Проблемы технологии переработки нетрадиционного сырья из объектов дальневосточного промысла. — Владивосток, 1989. — С. 64–72.
12. Руководство по современным методам определения содержания хитозана в пищевых продуктах и препаратах на его основе. — М.: ВНИРО: научно-технические и методические документы, 2005. — 23 с.
13. Рыбные ресурсы. [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://www.fisheries.ru/cgi-bin/news/print.cgi?num=00827>.
14. Самородова И.М. Применение хитозана для лечения острых отравлений кроликов гетероциклическими соединениями / Материалы Шестой Международной конференции «Новые достижения в исследовании хитина и хитозана». — М.: Изд-во ВНИРО, 2001. — С. 225–227.
15. Скурихин И.М., Тутельян В.А. Руководство по методам анализа качества и безопасности пищевых продуктов. — М.: Брандес, Медицина, 1998. — 342 с.
16. Статистические сведения по рыбной промышленности России 2011–2012 гг. — ФГУП ВНИРО, 2013.
17. Таирова А.Р. Состояние минерального обмена в организме коров на фоне применения хитозана / Материалы Шестой Международной конференции «Новые достижения в исследовании хитина и хитозана». — М.: Изд-во ВНИРО, 2001. — С. 230–233.
18. Холодная С.В. Сухой белковый рыбный концентрат — перспективный компонент стартовых кормов для осетровых рыб / Рыбохозяйственная наука на пути в XXI век: Тез. Докл. всерос. конф. Молодых ученых. — Владивосток: Изд-во ТИПРО-центра, 2001. — С. 150–152.

Список сокращений:

АПК — агропромышленный комплекс,
 БАД — биологически активная добавка,
 БГКП — бактерии группы кишечной палочки,
 ВЭЖХ — высокоэффективная газовая хроматография,
 ГМ — гидромодуль,
 ГОСТ — Государственный стандарт,
 ЖКТ — желудочно-кишечный тракт,
 КМАФАнМ — количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов,
 НУСП — нормы удовлетворения суточной потребности,
 НКГС — нормы кормления на голову в сутки,
 ПБСО — панцирь- и белоксодержащие отходы,
 ТР — технический регламент,
 ТС — таможенный союз,
 УГАВМ — Уральская государственная академия ветеринарной медицины.

**BIOTECHNOLOGICAL CONVERSION OF WASTE
FROM CUTTING CRAB *PARALITHODES CAMTSCHATICUS*
IN OBTAINING THE FEED ADDITIVE WITH CHITIN**

T.A. IGNATOVA, T.V. RODINA, A.V. PODKORYTOVA

Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography, Moscow

Rational modes of enzymatic hydrolysis: GM 1:1; the temperature of 50 ± 2 °C, pH 7.5 ± 0.5 , duration of 45 minutes and the technology of feed additives receiving from waste crab *Paralithodes camtschaticus* after their cutting were developed. It was recommended to use the fodder product containing chitin as feed additive in a diet of feeding of farm animals in agro-industrial complex (AIC).

Keywords: waste from cutting crab, chitin, chitosan, enzymes, feed additive.

ПОЛУЧЕНИЕ МЕТАНА В ПРОЦЕССЕ БИОТРАНСФОРМАЦИИ БИОМАССЫ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОК МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *RHIZOPUS ORYZAE*, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ

Ф.Т. МАМЕДОВА¹, О.В. СЕНЬКО^{1,2}, О.В. МАСЛОВА¹, Т.А. МАХЛИС¹, Е.Н. ЕФРЕМЕНКО^{1,2*}

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,

²Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН

Показана возможность получения молочной кислоты (МК) из восстанавливающих сахаров, содержащихся в ферментолизатах биомассы микроводоросли *S. vulgaris*, накопленной при их культивировании в сточной воде. В течение 40 ч (за 1 рабочий цикл) в таком процессе может быть получено до $28,4 \pm 1,1$ г/л МК; при этом период полуинактивности клеток мицелиального гриба *R. oryzae*, иммобилизованных в криогель поливинилового спирта, продуцирующих МК, составляет 480 ч. Установлено, что возможна биотрансформация биомассы иммобилизованных клеток (БИК) грибов, использованных для получения МК и предобработанных методом термолиза (121°C , 0,5 ч), в метан с выходом $39,4 \pm 1,2\%$. Увеличение выхода метана до $51,4 \pm 1,7\%$ оказалось возможным при проведении предварительного «обогащения» БИК клетками микроводоросли *S. vulgaris* за счет их биосорбции на иммобилизованном мицелии при его экспонировании в среде с хлореллой.

Ключевые слова: биомасса, иммобилизованные клетки, метаногенез, микроводоросли, *Chlorella vulgaris*, молочная кислота.

Введение

В настоящее время в стадии масштабно внедряемых или только разрабатываемых находится большое количество различных технологий, предлагающих использование разных видов биомассы в качестве исходного сырья [1–4]. Наибольшую практическую значимость представляют собой процессы, обеспечивающие не только конверсию возобновляемых ресурсов, но и утилизацию отходов, накапливающихся в реализуемых процессах, в коммерчески ценные продукты.

Практика показывает, что при проведении процессов биоконверсии восстанавливающих сахаров (ВС), содержащихся в ферментолизатах возобновляемого сы-

рья, например, в органические кислоты, с применением высокоэффективных биокатализаторов в виде клеток микроорганизмов, включенных в гелевые носители [5–7], образуется ряд отходов, требующих дальнейшей утилизации, например, остатки негидролизованного ферментами исходного сырья, отделяемые от ферментоллизатов, а также биомасса иммобилизованных клеток бактерий, дрожжей или мицелиальных грибов, использованных в самом процессе в качестве биокатализаторов.

Актуальным является поиск эффективных с экологической и экономической точки зрения способов утилизации таких отходов.

Утилизация остатков ферментоллизованной биомассы фототрофных микроорганизмов, используемой в качестве исходного сырья в биотехнологических процессах, может быть реализована в процессе метаногенеза. При этом процент конверсии такой биомассы в метан может достигать $55 \div 69\%$ [2, 8–9]. Что касается переработки биомассы иммобилизованных клеток после их использования в биотехнологических процессах, то известно, что образцы БИК, полученные на основе бактериальных клеток и криогеля поливинилового спирта (ПВС) после использования в биотехнологических процессах, можно подвергать реутилизации путем нагрева гранул с включенными в них клетками при 108°C в течение 20 мин.

* © 2015 г. Мамедова Ф.Т., Сенько О.В., Маслова О.В., Махлис Т.А., Ефременко Е.Н.

* Автор для переписки:

Ефременко Елена Николаевна
доктор биол. наук, профессор,
зав. лабораторией эубиокатализа кафедры химической энзимологии
хим. факультета МГУ им. М.В.Ломоносова,

ведущий научный сотрудник Института биохимической физики
имени Н.М. Эмануэля РАН

119991 Москва Ленинские горы, 1/3

Тел.: +7 (495) 939-31-70

E-mail: elena_efremenko@list.ru

для расплавления криогеля ПВС и термолита биомассы иммобилизованных клеток. Далее полученный раствор ПВС, обогащенный остатками термолитованных бактериальных клеток, может быть успешно использован вновь для формирования криогеля и иммобилизации в него клеток бактерий [10].

Пока практически нерешенной на сегодняшний день остается проблема утилизации биомассы грибного иммобилизованного мицелия, который в потенциале может стать отходом ряда биотехнологических производств. Известно, что свободный грибной мицелий после специальной предобработки может быть использован в качестве сорбента для ионов различных металлов и в качестве удобрения в сельском хозяйстве [11–13].

В качестве одного из эффективных подходов к утилизации «богатой» органическими компонентами биомассы мицелиальных грибов, по всей видимости, может рассматриваться процесс метаногенеза. Известно, что выход метана при конверсии различных видов биомассы предопределяется соотношением в ней липидов, белков и углеводов, и чем выше содержание липидов, тем выход целевого продукта больше [8, 14–15]. В этой связи эффективность метаногенеза биомассы мицелиальных грибов может быть невысокой из-за относительно невысокого содержания липидных компонентов в клетках грибов по сравнению с другими микроорганизмами при условии их нецеленаправленного культивирования для получения высоких внутриклеточных концентраций липидов. Вопрос поиска целесообразного биотехнологического решения по утилизации иммобилизованной биомассы мицелиальных грибов, в частности, в ходе ее использования в качестве исходного сырья для получения метана, представляется актуальным и пока остается открытым.

В данной работе предложен и исследован процесс получения метана в ходе биотрансформации предварительно обработанной методом термолита иммобилизованной в криогель поливинилового спирта биомассы мицелиального гриба, использованного для получения молочной кислоты (МК). Поскольку известно, что сорбционная способность поверхности клеток мицелиальных грибов довольно высока по отношению к разным химическим соединениям и даже к отдельным видам клеток микроорганизмов, в частности, к микроводорослям [16], то также была исследована возможность оптимизации процесса метаногенеза биомассы иммобилизованных клеток грибов по уровню выхода метана за счет предварительной сорбции на поверхности иммобилизованных грибных клеток биомассы микроводорослей, накапливающейся в

ходе очистки сточных вод [17]. Такие исследования были предприняты из-за исходного предположения о том, что сорбирующиеся на иммобилизованном мицелии клетки микроводорослей могли бы, таким образом, «обогащать» грибные отходы биоорганическими веществами, прежде всего липидами, которые способствовали бы повышению уровня выхода метана при переработке такого «модифицированного» сырья. Для проведения этих исследований были выбраны клетки микроводоросли *Chlorella vulgaris* C-1, поскольку биомасса именно этих клеток, как оказалось, может быть благоприятным сырьем для получения МК под действием биомассы иммобилизованных клеток рода *Rhizopus*, утилизацию которой в процессе метаногенеза и предстояло исследовать.

Материалы и методы

В работе использовались клетки зеленой микроводоросли *Chlorella vulgaris* C-1, биомасса которой накапливалась в процессе ее культивирования в модельной сточной воде, имитирующей бытовые стоки [17], в течение трех суток при 25 °С в аэробных условиях в режиме круглосуточного освещения люминесцентными лампами (30 Вт). Накопленная биомасса микроводоросли осаждалась из среды роста центрифугированием (8000 об/мин, 10 мин.), подвергалась механической дезинтеграции в шаровой мельнице Mini-BeadBeater-24 (размер стеклянных бус 0,5 мм, скорость вращения ротора 3000 об/мин.) в течение 4 мин. Осадок влажной биомассы суспендировался в 50 мМ Na-ацетатном буфере (рН 5,5), сюда же вносились комплексные ферментные препараты: Cellulase из *Trichoderma viride* (Sigma) из расчета 8 мг/г сухих веществ биомассы и α -amylase из *Aspergillus oryzae* (Sigma) из расчета 2 мг/г сухих веществ биомассы; ферментативный гидролиз проводился при 37 °С в течение 20 ч. Далее жидкая фаза ферментативного гидролизата, содержащая $45,2 \pm 1,7$ г/л восстанавливающих сахаров, использовалась для получения МК под действием клеток мицелиального гриба *R. oryzae* F-814, иммобилизованных в соответствии с ранее разработанным способом [7].

Трансформация ферментолитатов биомассы микроводорослей *C. vulgaris* C-1 в МК под действием иммобилизованных клеток (30 г сухих веществ/л) проводилась при 28 °С в аэробных условиях с постоянным перемешиванием (180 об/мин.) в течение 40 ч. Соотношение жидкой и газовой фаз в мини-реакторе составляло 0,35. Для поддержания рН $6,2 \pm 0,2$ использовался 1М раствор NH_4OH .

Определение концентрации ВС проводилось с использованием метода Шомоди — Нельсона [18], а концентрации МК — с использованием ферментативного аналитического набора Lactate Dry-Fast (Sentinel, Италия).

При проведении биосорбции в сточные воды с накопленной биомассой клеток *S. vulgaris* вносились гранулы иммобилизованного мицелия так, что концентрация биомассы микроводорослей и иммобилизованных клеток гриба была по 1,7 г сухих веществ/л. Процесс биосорбции осуществлялся при 28 °С и постоянном перемешивании (180 об./мин.).

Процесс метаногенеза БИК мицелиального гриба *R. oryzae* F-814, микроводорослей *S. vulgaris* С-1, а также их комбинации, полученной в результате сорбционных процессов, в метан и расчет показателей процесса осуществлялись согласно ранее разработанному способу [8]. В качестве биокатализатора метаногенеза использовался анаэробный ил, взятый с очистных сооружений завода по изготовлению чипсов ФритоЛей (г. Кашира) из действующего анаэробного реактора. Перед метаногенезом все типы биомассы подвергались термолизу при 121 °С в течение 30 мин.

Определение сухого веса биомассы клеток и содержания основных биоорганических компонентов биомассы (белков, жиров и углеводов) осуществлялось согласно известным методикам [19–22].

Результаты и обсуждение

В работе первоначально была показана возможность многократного эффективного использования иммобилизованных в криогель ПВС клеток мицелиального гриба *R. oryzae* F-814 в периодическом биотехнологическом процессе получения МК. Было установлено, что в заданных условиях при использовании иммобилизованных клеток грибов за 1 цикл (40 ч) из ВС, содержащихся в ферментолизатах биомассы хлореллы, может быть получено до 28,4±1,1 г/л МК (рис. 1). Период полуинaktivции такого биокатализатора в процессе получения МК составил 480 ч.

Было рассчитано, что в ходе периодического биотехнологического процесса получения МК на каждую 1 тонну продукта может накапливаться до 100–250 кг отходов, подлежащих утилизации в виде использованной БИК, что делает сам процесс переработки БИК актуальным.

Была предложена схема получения метана из предобработанных методом термолиза БИК с помощью

клеток метаногенов, входящих в состав анаэробного активного ила.

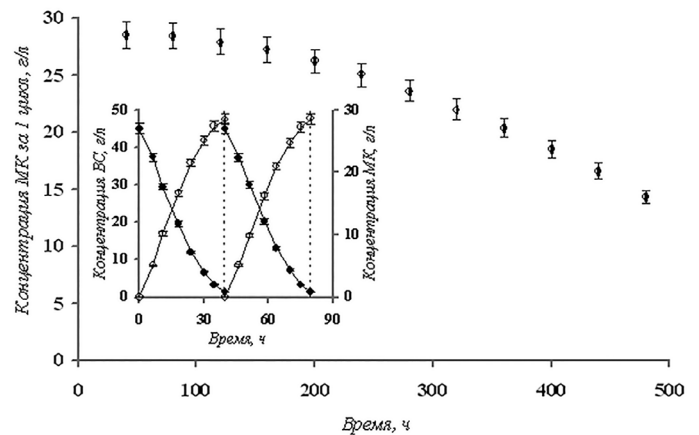


Рис. 1. Изменение концентрации МК в среде в процессе многократного использования иммобилизованных клеток мицелиального гриба *R. oryzae*. Каждая «точка» соответствует максимальному уровню накопления кислоты в конце каждого цикла периодического процесса. На «врезке» представлена кинетика потребления ВС (●) и накопления в среде МК (○) в двух циклах использования БИК. Пунктирными линиями на «врезке» отмечено время замены культуральной жидкости в реакторе на свежую питательную среду. Исходный субстрат — ферментативные гидролизаты биомассы *S. vulgaris*, полученные при дезинтеграции и гидролизе исходной ее концентрации 100 г сухих веществ/л

Для оптимизации процесса с точки зрения выхода конечного продукта перед осуществлением термолиза было предложено проведение биосорбции биомассы микроводорослей *S. vulgaris*, накопленной в ходе очистки сточных вод, на гранулах ИБК (рис. 2).

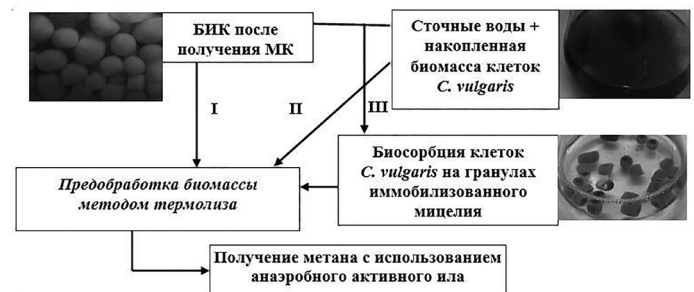


Рис. 2. Схема получения метана при использовании в качестве исходного субстрата в процессе метаногенеза: I — иммобилизованный грибной мицелий, II — биомасса микроводорослей *S. vulgaris*, III — иммобилизованный грибной мицелий и сорбированная на нем биомасса микроводорослей *S. vulgaris*

**Результаты получения метана с использованием различных типов биомассы
в качестве исходного субстрата в процессе метаногенеза**

Исходный субстрат, подвергнутый термолизу перед метаногенезом	Основные биоорганические компоненты, % от биомассы			% конверсии в метан
	липиды	белки	углеводы	
Иммобилизованный мицелий <i>R. oryzae</i> F-814, использованный для получения МК из ферментолитатов биомассы <i>S. vulgaris</i> , накопленной на сточных водах	6,9±0,8	30,1±1,3	58,2±2,7	39,4±1,2
Биомасса <i>S. vulgaris</i> , накопленная на сточных водах	17,1±0,9	9,9±0,5	55,5±2,5	67,6±2,1
Иммобилизованный мицелий <i>R. oryzae</i> F-814 с сорбированной биомассой клеток <i>S. Vulgaris</i>	11,1±0,2	21,7±0,7	57,1±2,8	51,4±1,7

Было установлено, что биомасса иммобилизованных клеток мицелиального гриба *R. oryzae* F-814 после применения в процессе получения МК может быть использована для получения метана; при этом степень ее конверсии в метан составляет около 40% (табл. 1).

Был исследован процесс биосорбции клеток микроводорослей *S. vulgaris*, накопленных в процессе их культивирования в среде сточных вод, с использованием в качестве «сорбента» БИК мицелиальных грибов *R. oryzae*, которые до этого использовались в процессе получения МК в течение 500 ч (см. рис. 1). Основной процесс сорбции клеток микроводорослей *S. vulgaris* проходил в течение первых 6 ч и практически завершился к 12-му часу. Сорбционная емкость гранул иммобилизованного мицелия *R. oryzae* F-814 в отношении биомассы клеток микроводорослей *S. vulgaris* составляла $0,71 \pm 0,03$ г/г по сухим веществам.

Необходимо отметить, что применение использованного в процессах получения МК свободного грибного мицелия для целей биосорбции клеток микроводорослей было практически невозможным вследствие того, что к окончанию процесса получения МК наблюдался частичный лизис и деструкция иммобилизованного грибного мицелия. Следует отметить, что хотя пустые гранулы (без клеток мицелиальных грибов) криогеля ПВС способны сорбировать клетки микроводорослей *S. vulgaris* из их суспензии, в данном случае величина сорбционной емкости использованных гранул была обусловлена исключительно иммобилизованным мицелием, плотная упаковка которого в объеме гранул криогеля ПВС была неоднократно продемонстрирована ранее [5].

Полученная БИК грибного мицелия, «обогащенная» сорбированной биомассой микроводорослей, далее

использовалась в качестве исходного сырья в процессе метаногенеза (см. табл. 1). Для сравнения также был проведен процесс с использованием в качестве субстратов для метаногенеза отдельно образца биомассы микроводорослей *S. vulgaris*.

Перед началом исследований определялся состав основных биоорганических компонентов всех вышеуказанных видов биомассы (см. табл. 1). Далее было установлено, что обогащение «отработанного» иммобилизованного мицелия *R. oryzae* F-814 сорбированной биомассой *S. vulgaris* и использование такой «смешанной» биомассы для получения метана приводит к увеличению его выхода на 12%, что, очевидно, происходит преимущественно за счет увеличения доли липидов в ее составе.

Заключение

Таким образом, была продемонстрирована возможность биотрансформации в метан БИК грибного мицелия после его использования в процессах получения МК. Заметное увеличение выхода метана оказалось возможным за счет проведения предварительной биосорбции клеток микроводорослей на иммобилизованных мицелиальных клетках гриба и последующей трансформации полученной таким образом «смешанной» биомассы, подвергнутой кратковременному термолизу, в метан под действием клеток метаногенов.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных научных исследований Президиума РАН № 25 «Фундаментальные аспекты химии углеродной энергетики».

Литература

1. Ефременко Е.Н., Спиричева О.В., Варфоломеев С.Д., Синецкий С.П., Байбак А.В., Лозинский В.И. Иммуобилизованный биокатализатор, способ его получения и способ получения молочной кислоты с использованием этого биокатализатора // Патент РФ №2253677. С 12 N 11/04. 2005.
2. Завьялова Н.В., Филимонов И.В., Ковтун В.А., Голипад А.Н., Петров С.В., Стяжкин К.К., Ефременко Е.Н., Холстов В.И., Янковская А.А. Основные технологические операции и стадии биоремедиации почв и очистки вод in situ // Теоретическая и прикладная экология. — 2014. — № 4. — С. 34–41.
3. Ковалев В.В., Унгурияну Д.В., Ковалева О.В. Теоретические и практические аспекты совершенствования процессов биогазовой технологии // Журнал Проблемы региональной энергетики. — 2012. — № 1. — С. 102–113.
4. Мамедова Ф., Никольская А., Ефременко Е. Исследование возможности использования сточных вод для накопления биомассы микроводорослей // Вестник Кузбасского государственного технического университета. — 2013. — № 1. — С. 113–116.
5. Машукова Н.В., Миронов П.В., Лоскутов С.Р. Сорбция катионов цинка, меди и кобальта отработанной биомассой и полисахаридным комплексом клеточных стенок *Penicillium chrysogenum* // Биотехнология. — 2004. — Т. 4. — С. 60–66.
6. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Под ред. Егорова Н.С. — М.: Изд. МГУ, 1995. — 224 с.
7. Сенько О.В., Степанов Н.А., Маслова О.В., Лягин И.В., Ефременко Е.Н. Ресурсосберегающая биотехнология получения фумаровой кислоты из возобновляемого растительного сырья // Вестник Кузбасского государственного технического университета. — 2013. — № 1. — С. 111–113.
8. Синицын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.М. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов. — М.: МГУ, 1995. — 220 с.
9. Унрод В.И., Солодовник Т.В. Хитин- и хитозансодержащие комплексы из мицелиальных грибов: получение, свойства, применение // *Biopolym. Cell.* — 2001. — Vol. 17(6). — P. 526–533.
10. Bishnoi N.R., Bishnoi G. Fungus — An alternative for bioremediation of heavy metal containing wastewater: A review // *JSIR.* — 2005. — Vol. 64. — P. 93–100.
11. Dawson R.M.C., Elliott D.C., Elliott W.H., Jones K.M. *Data for Biochemical Research (Third Edition).* — Oxford Science Publications, OUP, Oxford, 1986.
12. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // *Anal. Chem.* — 1956. — Vol. 28(3). — P. 350–356.
13. Efremenko E.N., Nikolskaya A.B., Lyagin I.V., Senko O.V., Makhlis T.A., Stepanov N.A., Maslova O.V., Mamedova F., Varfolomeyev S.D. Bioresource Production of biofuels from pretreated microalgae biomass by anaerobic fermentation with immobilized *Clostridium acetobutylicum* cells // *Bioresour. Technol.* — 2012. — Vol. 114. — P. 342–348.
14. Efremenko E.N., Spiricheva O.V., Lozinsky V.I., Varfolomeev S.D. *Rhizopus oryzae* fungus cells producing L(+)-lactic acid: kinetic and metabolic parameters of free and PVA-cryogel-entrapped mycelium // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2006. — Vol. 72(3). — P. 480–485.
15. Efremenko E.N., Spiricheva O.V., Veremeenko D.V., Baibak A.V., Lozinsky V.I. L(+)-lactic acid production using PVA-cryogel entrapped *rhizopus oryzae* fungus cells // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* — 2006. — Vol. 81. — P. 519–522.
16. Efremenko E.N., Stepanov N.A., Nikolskaya A.B., Senko O.V., Spiricheva O.V., Varfolomeyev S.D. Biocatalysts based on immobilized cells of microorganisms in the production of bioethanol and biobutanol // *Catalysis in Industry.* — 2011. — Vol. 3. — P. 41–46.
17. Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // *J. Biol. Chem.* — 1957. — Vol. 226(1). — P. 497–509.
18. Gultom S.O., Hu B. Review of Microalgae harvesting via co-pelletization with filamentous fungus // *Energies.* — 2013. — Vol. 63. — P. 5921–5939.
19. Lakaniemi A.-M., Hulatt C.J., Thomas D.N., Tuovinen O.H., Puhakka J.A. Biogenic hydrogen and methane production from *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta* biomass // *Biotechnol. Biofuels.* — 2011. — Vol. 4. — P. 34–46.
20. Mussgnug J.H., Klassen V., Schlüter A., O. Kruse O. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept // *J. Biotechnol.* — 2010. — Vol. 150. — P. 51–56.
21. Senko O.V., Gladchenko M.A., Lyagin I.V., Nikolskaya A.B., Maslova O.V., Chernova N.I., Kiseleva S.V., Korobkova T.P., Efremenko E.N., Varfolomeyev S.D. Biomass transformation of phototrophic microorganisms to methane // *ISJAEE.* — 2012. — Vol. 107. — P. 89–94.
22. Sialve B., Bernet N., Bernard O. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable // *Biotechnol. Adv.* — 2009. — Vol. 27(4). — P. 409–416.

Список сокращений:

- МК — молочная кислота,
 БИК — биомасса иммобилизованных клеток,
 ВС — восстанавливающие сахара,
 ПВС — поливиниловый спирт.

METHANE PRODUCTION WITHIN BIOTRANSFORMATION OF BIOMASS OF FILAMENTOUS IMMOBILIZED FUNGUS CELLS RHIZOPUS ORYZAE, USED TO PRODUCE LACTIC ACID

F.T. MAMEDOVA, O.V. SENKO, O.V. MASLOVA, T.A. MAKHLIS, E.N. EFREMENKO

The possible production of lactic acid (LA) from reducing sugars present in fermentolysates of microalgae *C. vulgaris* biomass, accumulated within their cultivation in wastewater. It can be obtained up to 28.4 ± 1.1 g/l LA during 40 h (1 working cycle) in such process, whereas the period of semi-inactivation of filamentous fungus cells immobilized in cryogel of poly(vinyl alcohol) and producing LA was established to be 480 h. It was shown that biotransformation of fungus biomass of immobilized cells (BIC), used for LA production and pretreated by thermolysis (121 °C, 0.5 h), is possible to methane with $39.4 \pm 1.2\%$ yield. Increase in methane yield up to $51.4 \pm 1.7\%$ can be reached as result of previous enrichment of BIC with the cells of microalgae *C. vulgaris* owing to cell biosorption on immobilized mycelium during its exposure in the medium with chlorella biomass.

Keywords: biomass, immobilized cells, methanogenesis, microalgae, *Chlorella vulgaris*, lactic acid.

ОПТИМИЗАЦИЯ ДЕПИРОГЕНИЗИРУЮЩЕЙ ФИЛЬТРАЦИИ РАСТВОРА ГЕТЕРОЛОГИЧНОГО АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА

Е.Г. АБРАМОВА*, А.К. НИКИФОРОВ, И.М. ЖУЛИДОВ, А.Г. СЕЛЕЗНЕВА,
Л.В. САВИЦКАЯ, О.А. ЛОБОВИКОВА, С.В. ГЕНЕРАЛОВ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Рассмотрены биотехнологические приемы депирогенизации раствора гетерологичного антирабического иммуноглобулина и представлены результаты исследований по оптимизации указанного баромембранного процесса за счет подбора высоко-технологичных современных фильтрационных материалов и условий проведения фильтрации. В тестах *in vivo* подтверждена эффективность предложенной технологии с использованием глубинных фильтров с Zeta-потенциалом.

Ключевые слова: антирабический иммуноглобулин, эндотоксин, баромембранный процесс, депирогенизация, глубинный фильтр.

Введение

Проблема пирогенности весьма актуальна для производителей инъекционных растворов, в первую очередь, тех растворов, которые вводят в большом количестве. В производстве иммунобиологических лекарственных средств (а к ним относится антирабический иммуноглобулин — препарат крови) данная проблема актуальна в связи с биологической природой исходного сырья, что в значительной степени увеличивает вероятность производственных рисков.

Антирабический иммуноглобулин из сыворотки крови лошади, производимый в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», входит в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов и применяется для постэкспозиционной профилактики бешенства у людей [11, 12]. Указанное лекарственное средство контролируется по 15 спецификационным показателям, одним из которых является пирогенность.

Наличие пирогенных примесей в лекарственном препарате обуславливает повышение температуры тела при их попадании в кровь. К наиболее активным пирогенам относятся грамотрицательные бактерии и их

токсины, в том числе погибшие микробные клетки. По химическому составу пирогенные вещества представляют собой липополисахаридные или липополисахаридно-протеиновые комплексы наружных мембран грамотрицательных бактерий, называемые также бактериальными эндотоксинами [10]. Бактериальные эндотоксины являются исключительно активными пирогенами, для развития лихорадочного приступа достаточно их присутствия в инфузионном растворе в концентрации 1 нг/мл. Сложность удаления эндотоксина обусловлена, во-первых, его термостабильностью — эндотоксин выдерживает температуру до 250 °С и автоклавирование при температуре 120 °С в течение 3–5 ч, следовательно, при гибели бактериальной клетки сохраняется пирогенный эффект; во-вторых, низкой молекулярной массой (в среднем 10–20 кДа), из-за чего стерилизующие мембраны с размером пор 0,2 мкм оказываются малоэффективными для удаления пирогенов. В литературе описано успешное применение метода ультрафильтрации через полуволоконные мембраны с номинальной отсечкой по молекулярной массе (НОММ) 15 кДа для снятия пирогенности растворов при производстве антирабической вакцины [6]. Однако для раствора антирабического иммуноглобулина (мол. масса 150 кДа) данный метод неприемлем ввиду ограничения по молекулярной массе.

В основе депирогенизации фармацевтических белковых растворов с помощью баромембранных технологий лежит такое свойство пирогенов, как наличие поверхностного отрицательного заряда. Липополисахариды отрицательно заряжены в слабокислой, нейтральной и щелочной среде благодаря фосфатным группам, входящим в гликозидные остатки. До 60-х годов XX столетия

© 2015 г. Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Жулидов И.М., Селезнева А.Г., Савицкая Л.В., Лобовикова О.А., Генералов С.В.

* Автор для переписки:

Абрамова Елена Геннадьевна

кандидат биологических наук,

зав. лабораторией профилактических иммуноглобулинов

ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»

410005 Саратов, Университетская, 46

E-mail: akn7@yandex.ru

в фармацевтической промышленности для снятия пирогенности инъекционных растворов широко применялись глубинные асбесто-целлюлозные фильтры, поскольку асбестовое волокно является природным носителем Zeta-потенциала благодаря положительно заряженным волокнам и эффективно удерживает пирогенные примеси. Однако в 1973 году FDA и ВОЗ запретили использование асбестовых фильтров в производстве препаратов для инъекций, поскольку была доказана канцерогенность наночастиц асбеста [9]. После отказа от использования асбестовых фильтров в фармацевтике начали применять другие методы удаления пирогенов (обработка детергентами и другими химическими реагентами, ионообменная хроматография, аффинный способ), но большинство из них оказалось малоэффективным применительно к растворам иммуноглобулина. Описан способ очистки пирогенного раствора иммуноглобулина путем обработки сорбентом — гидроокисью алюминия при снижении концентрации белка (до 1%) и подбора оптимальных значений рН и ионной силы [3]. Альтернативой данному методу, достаточно трудоемкому в условиях промышленного производства, может служить депирогенизирующая фильтрация с использованием эффективных глубинных матриц. В последние годы в биотехнологии для очистки препаратов крови находят применение модифицированные глубинные фильтры с повышенной сорбционной емкостью, в которых традиционный механизм глубинной фильтрации комбинируется с электрокинетическим задержанием пирогенных частиц [5, 8].

Повышенные значения пирогенности готового препарата могут быть обусловлены как некачественной депирогенизацией полуфабриката, так и факторами риска, присутствующими на этапе розлива и запайки препарата. В настоящей работе мы рассмотрим этап депирогенизирующей фильтрации полуфабриката иммуноглобулина, отметив лишь, что розлив и запайка антирабического иммуноглобулина в РосНИПЧИ «Микроб» осуществляются в «чистых помещениях» класса А в соответствии с правилами GMP [1, 7].

Цель работы — подбор оптимального глубинного фильтра для депирогенизации раствора антирабического иммуноглобулина при промышленном производстве препарата.

Материалы и методы

В работе использовали полуфабрикат антирабического иммуноглобулина в виде раствора с содержанием белка $10 \pm 1\%$, рН $7,0 \pm 0,4$, приготовленный

в соответствии с промышленным регламентом производства ПР № 01898109-26-10 на производство иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади жидкого, раствора для инъекций. Осадок гамма-глобулина, выделенный риванол-спиртовым методом, разводили 0,9%-ным раствором хлористого натрия, приготовленным на воде для инъекций (ФС 42-2620-97).

Испытания на пирогенность проводили биологическим методом согласно Государственной Фармакопее, 11 изд., ч. 1 [2] на кроликах породы «Шиншилла» $2,0 \pm 0,5$ кг. Экспериментальные животные содержались в соответствии с Приказом № 267 «Правила лабораторной практики в Российской Федерации» (2003) и «Положением о контроле качества лабораторных животных, питомников и экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утвержденным Министром здравоохранения РФ 23.04.2003 г. и президентом РАМН 22.04.2003 г. В течение 3 сут. перед испытанием у каждого подопытного кролика измеряли температуру. Препарат вводили 3 кроликам по 1 мл на 1 кг массы кролика. Препарат считали апилогенным, если после его введения сумма максимальных отклонений температуры у 3 кроликов не превышала $1,4^\circ\text{C}$.

Для депирогенизации раствора антирабического иммуноглобулина использовали глубинные фильтры Zeta carbon, Zeta plus («CUNO, 3M Company», США) и S 5P, F 7HP, F 4HP («Sartorius», Германия) в виде дисков диаметром 142 мм. При сборке фильтрационной установки фильтр-картон устанавливали в фильтродержатель для дисковых пластин («Millipore», США). Пластины смачивали подачей на установку 0,9% раствора хлористого натрия, приготовленного на воде для инъекций. Для получения воды для инъекций использовали установку приготовления воды для инъекций УВИ-0,15 (АОЗТ «Мембранная техника и технология», Россия). Собранный фильтрационный систему помещали в пакет для автоклавирования и подвергали паровой стерилизации при температуре 121°C в течение 40 минут под давлением $0,11$ МПа в стерилизаторе паровом электрическом ВК-75 (ОАО «Тюменский завод медоборудования и инструментов», Россия).

Для проведения баромембранного процесса использовали компрессор мембранный МК $1,5 \times 2$ (ЗАО «Владисарт», Россия). Для подачи фильтруемого раствора использовали танк напорный из нержавеющей стали SM17532 («Sartorius», Германия) емкостью 20 дм³. Фильтрацию иммуноглобулина осуществляли при температуре раствора $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Данная темпера-

тура является оптимальной для фильтрации растворов иммуноглобулинов с высоким содержанием белка, что доказано биотехнологами [4].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Раствор антирабического иммуноглобулина с содержанием белка $10 \pm 1\%$ относится к труднофильтруемым растворам в связи с высокой вязкостью, что ограничивает выбор фильтрационных материалов для депирогенизации полуфабриката.

Для проведения исследований по изучению эффективности удаления эндотоксина из раствора иммуноглобулина с использованием глубинных фильтров нами были выбраны модифицированные фильтр-пластины ZetaPlus на основе фильтрационного материала марки ZA с основой из целлюлозы и диатомита, ZetaCarbon с добавлением активированного угля фармацевтической квалификации, а также фильтр-картоны нескольких типов: S5P с микронным рейтингом 0,3 мкм, F7HP с рейтингом 1,0 мкм, F4HP с порогом отсечения 1,5 мкм и C4P с рейтингом 8 мкм. Глубинные фильтры, в отличие от мембранных, не имеют четко обозначенных пор, тем не менее, характеризуя плотность фильтра, производители указывают номинальный рейтинг фильтрации, ориентируя потребителя при выборе фильтров под его конкретные задачи. Немаловажным фактором является наличие у фильтр-картонов поверхностного положительного заряда за счет включения в состав полимерной смолы, что способствует «улавливанию» отрицательно заряженных молекул эндотоксина.

В качестве исходного раствора иммуноглобулина был взят раствор с показателем пирогенности $4,7 \text{ }^\circ\text{C}$, определенным биологическим методом на кроликах.

В результате однократной фильтрации раствора иммуноглобулина наиболее эффективными оказались пластины ZetaPlus и ZetaCarbon, позволившие снизить первоначальный показатель пирогенности до значений $1,6 \pm 0,1$ и $1,8 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$, соответственно. Использование фильтр-картона S 5P с микронным рейтингом 0,3 мкм оказалось менее эффективным — значение пирогенности после фильтрации составило $2,2 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$. Применение других типов фильтр-картона оказалось неэффективным, присутствие эндотоксина в растворе иммуноглобулина после фильтрации обусловило пирогенную реакцию у кроликов на уровне $4,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ в случае использования фильтровального картона F 7HP и $4,6 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ при ис-

пользовании пластин F 4HP (рис. 1). В данном случае критичной явилась величина порога отсечения, следовательно, для удаления эндотоксинов из белкового раствора оправдано использование матриц с рейтингом не более 0,3 мкм. В дальнейшем фильтры с номинальным рейтингом фильтрации более 0,3 мкм не использовали для депирогенизации иммуноглобулина.

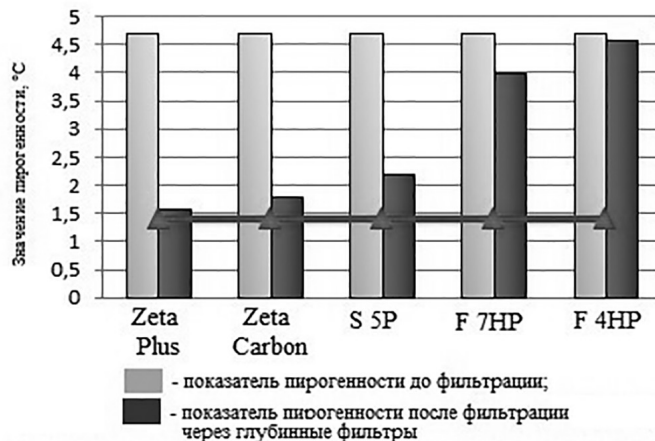


Рис. 1. Эффективность депирогенизации раствора иммуноглобулина в зависимости от типа фильтра

Тем не менее, после первичной фильтрации через одну пластину модифицированных фильтров ZetaPlus и ZetaCarbon не были достигнуты значения пирогенности, удовлетворяющие требованиям нормативных документов (НД), и для повышения эффективности процесса депирогенизации раствора был апробирован так называемый сэндвич-вариант, то есть фильтрация раствора иммуноглобулина через две пластины, заправленные в фильтродержатель.

Были испытаны три комбинации пластин и все они оказались достаточно эффективными, позволившими снизить значение пирогенности до допустимого НД показателя (рис. 2). Фильтрация раствора иммуноглобулина через пластины в комбинации ZetaPlus/ZetaCarbon и ZetaCarbon/ZetaCarbon обеспечила снижение первоначального показателя пирогенности до значений $1,2 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$; депирогенизация через глубинные фильтры в комбинации ZetaPlus/ZetaPlus обусловила снижение пирогенной реакции животных до значения $0,9 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Для фильтрации лекарственных растворов, получаемых из иммунной крови, немаловажным является тот факт, что фильтр-картоны на основе активированного угля в дополнение к депирогенизирующему эффекту обладают свойством задерживать гемпигмент и улучшать показатели цветности целевого продукта. В связи с этим представляется целесообразным осуществлять депиро-

генизирующую фильтрацию антирабического иммуноглобулина следующим образом: при первичной очистке иммуноглобулина после растворения осадка — через две пластины ZetaCarbon с целью дополнительного обеззараживания раствора, при вторичной фильтрации после отстаивания раствора — через две пластины ZetaPlus.

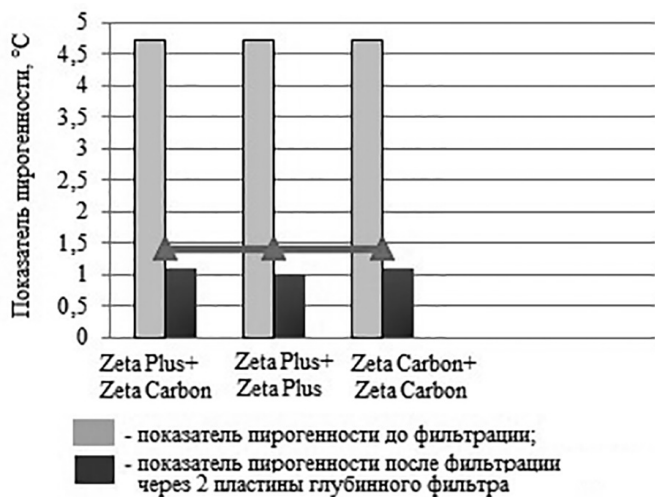


Рис. 2. Эффективность депирогенизации раствора иммуноглобулина в зависимости от комбинации пластин с Zeta-потенциалом

Важную роль при депирогенизирующей фильтрации через глубинные фильтры играет время контакта между раствором белка и материалом фильтра. Для установления зависимости эффективности удаления эндотоксина от времени контакта раствора с матрицей были проведены экспериментальные исследования с использованием двух пластин ZetaPlus. Отметим, что выбор оптимальной величины давления в данном случае является весьма тонким процессом, поскольку речь идет о минимальном значении, при котором возможно проведение фильтрации; в то же время выбранная величина должна исключать риск необратимой остановки баромембранного процесса. Фильтрацию осуществляли под давлением от 0,03 до 0,08 МПа при температуре раствора 37 ± 1 °C. На рисунке 3 представлены данные эксперимента, свидетельствующие о влиянии величины давления, обуславливающей интенсивность потока, на адсорбционную активность глубинного фильтра в отношении пирогенных примесей. Так, при величине давления 0,08 МПа зарегистрировано наибольшее значение показателя пирогенности — $1,6 \pm 0,1$ °C. При уменьшении величины давления до 0,03 МПа и соответственно увеличении времени контакта раствора иммуноглобулина с фильтром, наблюдали тенденцию к снижению пирогенной реакции до $0,9 \pm 0,2$ °C, что соответствует требованиям НД.

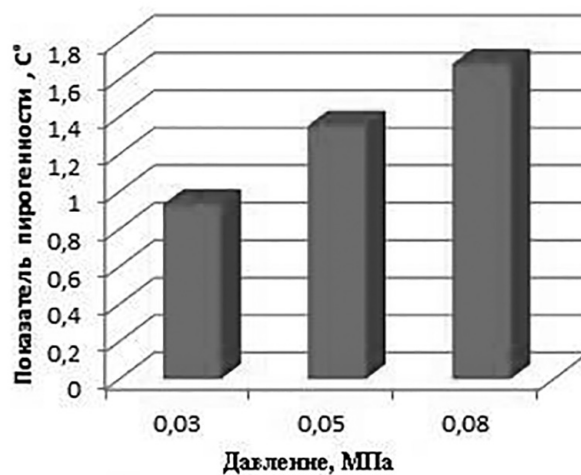


Рис. 3. Эффективность депирогенизации раствора иммуноглобулина в зависимости от величины давления

Заключение

В результате экспериментов установлено, что для проведения депирогенизирующей фильтрации раствора антирабического иммуноглобулина с содержанием белка $10 \pm 1\%$, рН $7,0 \pm 0,4$ наиболее эффективными являются модифицированные глубинные фильтры с Zeta-потенциалом с рейтингом не более 0,3 мкм. Процесс депирогенизации оптимизирован за счет фильтрации через комбинацию двух фильтр-пластин с положительным зарядом при давлении 0,03 МПа и температуре раствора 37 ± 1 °C.

Литература

- ГОСТ Р 52249-2009 «Правила производства и контроля качества лекарственных средств». — М., 2009. — 138 с.
- Государственная Фармакопея СССР, 11 изд. — Вып. 1. — М.: Медицина, 1987. — 335 с.
- Исрафилов А.Г., Кудашева Г.Б., Осипенко А.М., Лютов А.Г., Еникеева С.А., Корнилова И.А. Способ очистки иммуноглобулина от пирогенных веществ // Патент 2110279РФ, 95119174/14, А61К39/395, 13.11.1995.
- Комиссаров А.В., Комоско Г.В., Лещенко А.А., Луб М.Ю., Пименов Е.В., Дармов И.В., Климов В.И., Логвинов С.В. Изучение процесса стерилизующей фильтрации жидкого противосибиреязвенного лошадиного глобулина // Биотехнология. — 2002. — № 2. — С. 66–74.
- Краснопольский Ю.М., Борщевская М.И. Биотехнология иммунобиологических препаратов. — Харьков: «Фарм-тэк», 2008. — 312 с.
- Мухачева А.В., Мовсесянц А.А., Алсынбаев М.М. Выбор оптимальных методов очистки белковых веществ,

- входящих в состав вакцины антирабической культуральной концентрированной очищенной инактивированной (КОКАВ) // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. — 2014. — № 3(76). — С. 84–88.
7. «Правила организации производства и контроля качества лекарственных средств», утв. приказом Министерства промышленности и торговли РФ от 14 июня 2013 г. N 916.
 8. Терентьев М.А. Фильтры Зета Плюс для фармацевтических и биотехнологических производств. Чем можно заменить асбестовые фильтры / *Медицинский бизнес*. — 2003. — № 2(103). — С. 18–22.
 9. Яворская Е.С. Современные направления в мембранной нанофильтрации биофармпрепаратов. Часть 2. Удаление бактериальных эндотоксинов, мембранная ионообменная и аффинная хроматография. Мембраны для контроля вирусов в воде / *Мембраны*. — 2007. — № 2(34). — С. 34–41.
 10. Sharma S.K. Endotoxin detection and elimination in biotechnology // *Biotechnol. and Appl. Biochem.* — 1986. — Vol. 8. — No. 1. — P. 5–22.
 11. WHO Expert Consultation on Rabies: second report. WHO technical report series 982. — Geneva, 2013. — 139 p.
 12. Wilde H., Chomchey P., Punyaratabandhu P. et al. Purified equine rabies immune globuline: a safe and affordable alternative to human rabies immune globulin // *Bull. of the WHO*. — 1989. — Vol. 67. — No. 6. — P. 731–738.

OPTIMIZATION FILTERING FOR DEPYROGENATION SOLUTION OF HETEROLOGOUS ANTI-RABIES IMMUNOGLOBULIN

E.G. ABRAMOVA, A.K. NIKIFOROV, I.M. ZHULIDOV, A.G. SELEZNEVA,
L.V. SAVITSKAYA, O.A. LOBOVIKOVA, S.V. GENERALOV

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov

The article discusses biotechnological techniques for depyrogenation solution of heterologous anti-rabies immunoglobulin and the results of research on the optimization of this baromembrane process by choosing high-tech modern filtration materials and conditions of filtration. The efficiency of the proposed technology using depth filters with Zeta-potential function was confirmed in in vivo tests.

Keywords: anti-rabies immunoglobulin, endotoxin, baromembranes process, depyrogenation, depth filter.

К 95-ЛЕТИЮ ОТКРЫТИЯ Н.И. ВАВИЛОВЫМ ЗАКОНА ГОМОЛОГИЧЕСКИХ РЯДОВ В НАСЛЕДСТВЕННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ

В.С. ВОРОБЬЕВ*

Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, Москва



В истории биологии есть события, которые являются ключевыми вехами в ее развитии. В XX столетии к ним относится дата, связанная с открытием Николаем Ивановичем Вавиловым закона гомологических рядов в наследственной изменчивости. Это случилось на III Всероссийском селекционном съезде 4 июня 1920 года в Саратове, в стенах местного университета, в Большой физической аудитории третьего корпуса на улице Казарменной (ныне — Университетская), когда молодой профессор, заведующий кафедрой частного земледелия и селекции агрономического факультета, сообщил в своем докладе о результатах собственных наблюдений и обобщений на основании восьмилетнего опыта.

© 2015 г.

* **Автор для переписки:**

Воробьев Вадим Сергеевич

к.м.н., член Центрального Правления Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

E-mail: obr@biorosinfo.ru

Главная идея данного закона состояла в том, что у близких по происхождению видов и родов организмов появляются сходные наследственные изменения. Сам автор излагает его содержательную сущность следующим образом: «Виды и роды, генетически близкие, характеризуются сходными рядами наследственной изменчивости с такой правильностью, что, зная ряд форм в пределах одного вида, можно предвидеть нахождение параллельных форм у других видов и родов. Чем ближе генетически расположены в общей системе роды и виды, тем полнее сходство в рядах их изменчивости. Целые семейства растений в общем характеризуются определенным циклом изменчивости, проходящей через все роды и виды, составляющие семейство». Конкретно это выражается в многочисленных вариациях в строении корней, листьев, семян и других структур у любого вида растений. Эти сходные аллельные формы многократно повторялись у разных видов: колосья с остью или без нее, колосковые пленки, узлы соломины злаков с антоцианиновой окраской или без нее и т.д. Такие вариации не носят случайный характер: у каждого вида встречается определенный набор вариаций, который практически идентичен у близкородственных видов и сходен у разных родов и семейств. Иногда сходство носит аналогичный, а не гомологичный характер. Имеет значение предикативная составляющая закона: из воспроизводимости того факта, что генетически близким родам и видам свойственны сходные ряды наследственной изменчивости, следует, что на основании знания ряда форм в пределах одного вида можно предсказать обнаружение параллельных форм у других родственных видов и родов.

Существенно, что автор закона сформулировал его в виде двух закономерностей (взяты из публикации 1920 года) [6]:

1. Первая закономерность, которая бросается в глаза при детальном изучении форм у каких-либо линейных растений, принадлежащих к одному и тому же роду, — это тождество рядов морфологических и физио-

логических свойств, характеризующих разновидности и расы у близких генетических линнеев, параллелизм рядов видовой генотипической изменчивости... Чем ближе генетически виды, тем резче и точнее проявляется тождество рядов морфологических и физиологических признаков.

2. ...2-я закономерность в полиморфизме, вытекающая по существу из первой, состоит в том, что не только генетически близкие виды, но и роды проявляют тождества в рядах генотипической изменчивости.

Вначале Вавилов сформулировал закон главным образом для растений, однако позже он распространил его на грибы, водоросли и животных и пришел к заключению, что закон носит всеобщий характер.

Исходной основой закона было наличие фенотипической изменчивости, но ученый высказал предположение о существовании в пределах одного и того же рода и близких родов множества общих генов наряду со спецификой видов и родов.

Важно практическое следствие закона — его применимость к задачам селекции. Желаемый признак легче найти у какой-либо разновидности и закрепить его скрещиванием с другими формами. В период, когда искусственная индукция мутагенеза химическими или излучающими агентами была невозможна, поиск организмов с нужными признаками осуществлялся в природных популяциях в экспедициях в предполагаемые центры происхождения культурных растений. Такой подход широко использовался в дальнейшем школой Вавилова на базе обширной мировой «вавилонской» коллекции растений, хранящейся в ВИР.

В печати сообщение об открытии Николая Ивановича Вавилова на русском языке впервые было опубликовано в 1920 году в Докладах на 3-м Всероссийском селекционном съезде — Саратов: Губполиграфотдел, 1920, 16 с. (рис. 1).

В 1921 году «Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости» был также опубликован в журнале «Сельское и лесное хозяйство» [1].

На английском языке доклад увидел свет в 1922 году в *Journal of Genetics* (Vavilov N.I. The law of homologous series in variation. *J. Genet.*, Vol. 12, № 1, p. 47–89) [20].

Данное классическое произведение переиздавалось в русском варианте [5, 7, 8] и подвергалось анализу [12, 13, 19]. Сейчас имеются и обширные Интернет-материалы на этот счет [16]. Отдельные аспекты этой темы приводятся в других трудах ученого и биографических материалах о нем [2, 3, 4, 15].

В целом, закон гомологических рядов вписывается в триаду научных достижений Вавилова: иммунитет растений, закон гомологических рядов, центры происхождения культурных растений.



Рис. 1. Титульный лист брошюры с докладом Н.И. Вавилова «Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости» (Саратов, 1920) [6]

При рассмотрении памятной даты в сфере науки существенно оценить историческую динамику того или иного события. Прежде всего, речь идет о предыстории и приоритетности открытия. Вавилов никогда не настаивал на своем первопродомстве, упоминая имена предшественников, в том числе Дарвина и Уолша. Известно, что во время своей стажировки в 1913–1914 гг. в Англии, в Садоводческом институте имени Джона Иннеса у У. Бэтсона (местечко Мэртон неподалеку от Лондона) он интересовался трудами Дарвина. С целью более глубокого ознакомления с его эпистолярным наследием молодой русский стажер несколько дней работал в библиотеке Дарвина в Шрусбери с подлинными

произведениями классика науки, включая его рукописи, дневники и иные материалы [11]. Не исключено, что уже тогда он пропитался многими идеями великого английского ученого, которые послужили толчком к теоретическим обобщениям начинающего российского таланта. Кроме того, в этих поистине святых местах для биологов всего мира выпускник Петровки (Тимирязевки) не мог не посетить Лондонское Линнеевское общество с его уникальной коллекцией гербариев, собранных самим Линнеем. При этом он, попутно выполняя задание старшего коллеги (Мальцева А.И. из Петербургского бюро прикладной ботаники Р.Э. Рэгеля), исследовал специальную папку с овсягами и скрупулезно промерил длину колосковых пленок. Но, как всегда, доброе дело, сделанное для другого, непременно возвращается сторицей самому вершителю — Вавилову это пригодилось спустя несколько лет при анализе, сопоставлении и систематизации фактов для обоснования закона гомологических рядов.

Далее — вопрос о точности закона, его достоверности. Здесь опять приходит на помощь объективность и самокритичность Николая Ивановича. Так, он признавал, что во многих случаях на примере видов и родов он предпочитал говорить о гомологии признаков, а не генов. Кроме того, в 1936 году он называл первую формулировку закона излишне категоричной, объясняя это недостаточными знаниями организации генов. В частности, в 1920 году не было известно, что «близкие виды могут при наличии сходных внешне признаков характеризоваться многими различными генами». Отмечал он и недооценку роли отбора при анализе особенностей изменчивости.

К тому же, по свидетельству учеников и близких людей, Вавилов не возражал против острых дискуссий в своем институте (ВИР), в том числе по некоторым положениям закона гомологических рядов, однако обеспечивал соблюдение научной этики и сохранение доброжелательной, творческой атмосферы среди сотрудников [14].

Веским аргументом в деле признания заслуг ученого всегда была позиция именитых современников. Имеется очень четкое и однозначное высказывание крупного отечественного генетика Н.В. Тимофеева-Ресовского, человека прямого и критичного (знавшего его лично и чаще всего общавшегося с ним за границей): «Вавилов показал, что в общем и целом наследственная изменчивость всех растений в очень сильной степени варьирует параллельно. Он назвал это гомологическими рядами изменчивости растений.

И указал, что чем ближе виды друг к другу, тем больше эта гомология рядов изменчивости признаков. Целый ряд разных общих закономерностей был выявлен на этих гомологических рядах наследственной изменчивости растений. И это обстоятельство было взято Вавиловым в качестве одной из важнейших основ дальнейшей селекции и поисков хозяйственно полезных признаков у вводимых в культуру растений. Изучение гомологических рядов наследственной изменчивости прежде всего у культурных растений, затем у домашних животных является теперь уже само собой разумеющимся, одной из основ дальнейшей селекции нужных человеку сортов тех или иных изучаемых растений. Это было, может быть, одно из первых крупных достижений Вавилова мирового масштаба, которое очень быстро и создало ему мировое имя. Имени ежели не первого и лучшего, то одного из первых и лучших прикладных ботаников в мире» [18].

Известный биолог А.А. Любищев провел обстоятельный разбор закона гомологических рядов (1957) [16]. В целом он пытается вписать этот закон в контекст теорий (эволюция, отбор, систематика) и концепций (номогенез, биогенез, параллелизм), имеющих общебиологическое значение, отмечая при этом приоритет Дарвина и ссылаясь на его высказывание: «Виды, между собой различные, представляют аналогичные изменения, так что разновидность известного вида часто приобретает особенности, свойственные сродному виду, или возвращаются к признакам более раннего предка». Тем не менее им дается положительная оценка закона: «Н.И. Вавилову и принадлежит поэтому бесспорная заслуга, что он не просто извлек из забвения старое положение Дарвина, но сделал крупный шаг вперед по пути познания одной из глубоких закономерностей, лежащих в основе формирования организмов. По сравнению с Дарвином понимание Вавиловым характеризуется следующими особенностями.

1. Закон приложим не только к близким видам одного рода, но и к родам семейств, не только близких, но и отдаленных.

2. Этому закону придается такая универсальность, что по наличию ряда изменчивости в одном роде или в семействе можно предвидеть соответствующий ряд в другом роде или семействе: это и позволило Н.И. Вавилову сделать удачный прогноз...».

В заключение А.А. Любищев делает общее заключение: «Мы можем подвести итог. Работа Н.И. Вавилова по закону гомологических рядов представ-

ляет собой очень крупный шаг по пути проникновения в закономерности систематики и эволюции. Однако сравнение в смысле высоты научного достижения с периодической системой Менделеева было бы неправильно...». Действительно, метафорическое сравнение с таблицей Менделеева уже изначально было преувеличением, нередко использовавшимся в научно-популярной литературе и прессе. Уровень научной значимости открытия Вавилова был и без этого достаточно высок и не нуждался в подкреплении броскими аналогиями, особенно в профессиональной среде.

Известно высказывание о Вавиллове его учителя, академика Д.Н. Прянишникова, агрохимика и физиолога растений: «Он — гений, и мы не сознаем этого только потому, что он наш современник». Есть и мнение брата Н.И. Вавилова — академика Сергея Ивановича Вавилова, президента АН СССР, общавшегося с выдающимися физиками своего времени, открывателя закона Вавилова — Черенкова: явления, авторы, обнаружившие которое (И.Е. Тамм, Г.М. Франк, П.А. Черенков), были удостоены Нобелевской премии. Он считал, что старший брат Николай гораздо талантливее его, и это не было традиционное почитание старшего, а объективное суждение.

Что касается зарубежного авторитета, то благодаря интенсивным контактам Вавилова с иностранными специалистами концепции русского ученого были общеизвестными и получили одобрение. Венцом такого признания стало выдвижение (правда, неосуществившееся в действительности из-за уже начавшегося преследования Вавилова) президентом VII Международного генетического конгресса, проведение которого планировалось в СССР в 1937 году, но он не был поддержан правительством, в связи с чем был перенесен в Эдинбург, где и состоялся в августе 1939 года без Вавилова, избрание членом Лондонского Королевского общества в 1942 году (он в это время находился в саратовской тюрьме) и беспрецедентная честь помещения его имени на титуле международного журнала «Heredity», рядом с именами Дарвина, Линнея и Моргана [10]. Нельзя не принимать во внимание и благожелательные отзывы о нем многих выдающихся генетиков, биологов, селекционеров: У. Бэтсон, Г. Меллер, президент VII Международного генетического конгресса в Эдинбурге Ф. Кру (F.A.E. Crew) и др. Ф. Кру, открывая конгресс, сказал, что председательская мантия была сшита для более крупной фигуры, а на сцене стояло

пустое кресло, предназначенное для отсутствующего не по своей воле Вавилова [9, 17].

Вряд ли нужно говорить о том, что международное признание в еще большей мере укрепляло прижизненное и посмертное почитание Н.И. Вавилова в СССР и России, усилившееся в последней четверти XX века, после восстановления его доброго имени на государственном и общественном уровне. Но это уже выходит за тему краткой юбилейной заметки по случаю конкретной памятной даты из жизни ученого.

Литература

1. Вавилов Н.И. Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости // Сельское и лесное хозяйство, 1921. — № 1–3. — С. 84–99.
2. Вавилов Н.И. Ботанико-географические основы селекции / В кн.: Теоретические основы селекции. Т. 1. — М., 1935. — С. 17–74.
3. Вавилов Н.И. Документы и фотографии. — СПб.: Наука, 1995. — 168 с.
4. Вавилов Н.И. Жизнь коротка, надо спешить. — М.: Сов. Россия, 1990.
5. Вавилов Н.И. Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости. М.-Л. 1935. 56 с.
6. Вавилов Н.И. Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости. — Саратов: Губполиграфотдел, 1920, 16 с.
7. Н.И. Вавилов. Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости / Классики советской генетики, (1920–1940). — Л.: Наука, 1968. — С. 9–50.
8. Вавилов Н.И. Избранные произведения. — 1967. — Т. 1–2 (Т. 1). — С. 7–61.
9. Вавилов Ю.Н. В долгом поиске. Книга о братьях Николае и Сергее Вавиловых. Изд. 2-е, доп. и перераб. — М.: ФИАН, 2008. — 318 с.
10. Вавилов Ю.Н. Еще раз об отце: факты из семейного архива. Николай Вавилов за чтением Дарвина // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2007. — Т. 3. — № 4. — С. 65–69.
11. Воробьев В.С., Воробьева О.В. Вавилов и Бэтсон: ученик и учитель: новые исторические находки. К 120-летию со дня рождения Н.И. Вавилова // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2007. — Т. 3. — № 4. — С. 53–64.
12. Гомологических рядов закон / БСЭ. 3-е изд. — М.: Советская энциклопедия. 1969–1978 (авт. — Н.В. Тимофеев-Ресовский).
13. Захаров И.А. Генетическая гомология: от Вавилова до эпохи геномной инженерии // Природа. — 1987. — № 10. — С. 59–65.

14. *Зыбина С.П.* Воспоминания о Н.И. Вавилове ФГОУ ВПО РГАУ – РСХА им. К.А. Тимирязева, 2007. – 123 с.
15. К 125-летию со дня рождения Н.И. Вавилова // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2012. – Т. 8. – № 4. – С. 71–74.
16. *Любищев А.А.* Закон гомологических рядов Н.И. Вавилова и его значение в биологии. 1957. [Электронный ресурс]: http://molbiol.edu.ru/review/02_15.html.
17. *Резник С.Е.* Николай Вавилов. – М.: Молодая гвардия, 1968. – 336 с. (ЖЗЛ).
18. *Тимофеев-Ресовский Н.В.* Воспоминания. – М.: Вагриус, 2008. – 416 с. – (Серия «Мой 20 век»).
19. *Kupzow A.J.* Vavilov's law of homologous series at the fiftieth anniversary of its formulation // *Economic Botany*, 1975. – Vol. 29(4). – P. 372-379.
20. *Vavilov N.I.* The law of homologous series in variation // *J. Genet.* – Vol. 12. – No. 1. – P. 47–89.

Резюме. В кратком исследовании представлены исторические материалы и комментарии в связи с юбилейной датой – 95-летием открытия Н.И. Вавиловым закона гомологических рядов в наследственной изменчивости.

Ключевые слова: история науки, биология, генетика, закон гомологических рядов, Николай Вавилов.

ON THE 95TH ANNIVERSARY OF THE DISCOVERY OF N.I. VAVILOV'S LAW OF HOMOLOGOUS SERIES IN VARIATION

V.S. VOROBYEV

Yu.A. Ovchinnikov Russian Biotechnological Society, Moscow

In a brief study presents historical materials and comments in connection with the anniversary – the 95th anniversary of the discovery of the N.I. Vavilov's law of homologous series in variation.

Keywords: history of science, biology, genetics, law of homologous series, Nikolai Vavilov.

ЮБИЛЕЙНЫЕ И ЗНАМЕНАТЕЛЬНЫЕ ДАТЫ 2015 ГОДА*

СОБЫТИЯ, ФАКТЫ

1815 — русский химик К.Г.С. Кирхгоф (1764–1841) получил из пшеницы экстракт, способный превращать крахмал в сахар.

1830 — открытие белков.

1835 — немецкий ботаник Х. фон Моль впервые наблюдал деление растительных клеток.

1840 — Ю. Либих сформулировал теорию минерального питания растений.

1855 — обнаружена кишечная палочка (*Escherichia coli*) — будущий главный «труженик» биотехнологии.

1865 — Грегор Мендель обнародовал на заседании общества естествоиспытателей в Брно результаты исследований о передаче по наследству признаков при скрещивании гороха.

1870 — немецкий цитолог В. Флеминг (1843–1905) обнаружил митоз.

1875 — Фрэнсис Гальтон продемонстрировал полезность близнецового метода для изучения наследственных свойств. Вышел в свет русский перевод его книги «Наследственность таланта».

1875 — Чарльз Дарвин выдвинул теорию существования «геммул» (наследственных частиц).

1880 — А. Коссель расщепил нуклеиновые кислоты на более мелкие составные части, включая фосфорную кислоту и сахар.

1880 — Луи Пастер напечатал работу об аттенуации микробов.

1895 — С.Н. Виноградский (1856–1953) показал процесс фиксации азота бактериями *Clostridia* в отсутствие кислорода.

1900 — начало работы на дрозофиле.

1900 — повторное «открытие» законов Менделя Карлом Корренсом, Эрихом фон Чермаком и Гуго де

Фризом и соответствующие публикации (на следующий год У. Бэтсон сделал перевод на английский язык).

1905 — введен термин «генетика» (У. Бэтсоном: сначала — в письме, а в 1906 году — в печати).

1905 — вручение Нобелевской премии Р. Коху.

1905 — Э. Вильсон и Н. Стивенс установили, что X- и Y-хромосомы определяют пол.

1910 — вручение Нобелевской премии по физиологии и медицине Альбрехту Косселю (1853–1927) за работы по белковым веществам, включая нуклеины.

1910 — создание Т.Х. Морганом линейной теории гена, согласно которой гены в хромосоме расположены в линейном порядке с образованием групп сцепления (один из базовых принципов хромосомной теории наследственности).

1920 — обнародование открытия Н.И. Вавиловым закона гомологических рядов в наследственной изменчивости (Саратов, 3-й Всероссийский селекционный съезд).

1920 — открытие гормона роста (Эванс Г. и Лонг К.).

1925 — использование ультрацентрифуги для определения молекулярной массы (Теодор Сведберг).

1925 — К.Б. Бриджес (ученик Моргана) предложил балансовую теорию формирования пола: у дрозофилы пол развивающейся зиготы обусловлен соотношением числа аутосом и X-хромосом.

1925 — Н.И. Вавилов начал свою первую экспедицию по изучению генетических ресурсов земного шара.

1930 — в США принят закон о патентах на растения.

1930 — вручение Нобелевской премии по химии Гансу Фишеру (1881–1945) за конструирование гемина и хлорофилла.

1935 — публикация статьи Н.В. Тимофеева-Ресовского, К.Г. Циммера, М. Дельбрюка «О природе генных мутаций и структуре гена» (Timofeeff-Ressovsky

* Материал подготовлен О.В. Воробьевой

N.W., Zimmer K.G., Delbrueck M. Ueber die Natur der Genmutation und der Genstruktur // *Nachr. Gess. Wiss. Goettingen*, 6, N. F. — 1935. — Bd. 1. — N 13. — S. 189–245). В ней изложены принципы мутагенеза — попадания и мишени. Статья стала базой для построения книги Э. Шредингера «Что такое жизнь с точки зрения физики?», давшей толчок к прогрессу генетики и молекулярной биологии. Русский перевод статьи на сайте [http://www.jinr.ru/~drrr/Timofeff/auto/pdf/mut\(i-ii\)_r.pdf](http://www.jinr.ru/~drrr/Timofeff/auto/pdf/mut(i-ii)_r.pdf)

1935 — А.Н. Белозерский первым в мире выделил чистую ДНК. В этом же году вышла первая публикация на русском языке о биохимическом выявлении ДНК (тимонуклеиновой кислоты по терминологии того времени) в растениях — в ростках семян гороха. На иностранном языке эта статья появилась на год ранее в 1934 г. (совместно с А.Р. Кизелем).

1935 — Герман Меллер (в период работы в Москве в Институте генетики по приглашению Н.И. Вавилова) и А.А. Прокофьева-Бельговская определили размер генов у дрозофилы.

1935 — американский вирусолог и биохимик В. Стэнли получил в кристаллическом виде вирус табачной мозаики.

1940 — О. Эйвери в Рокфеллеровском институте изолировал чистую ДНК.

1940 — обнаружение резус-фактора (Ландштейнер К. с коллегами).

1945 — Макс Дельбрюк организовал в США курсы по молекулярной биологии.

1945 — Нобелевская премия по физиологии и медицине (А. Флеминг, Э.Б. Чейни, Х.У. Флори) за открытие пенициллина.

1945 — Нобелевская премия по химии А.И. Виртанену (1895–1973) за исследования и открытия в области агрохимии и химии пищевых продуктов.

1945 — основание Организации ООН по вопросам продовольствия и сельского хозяйства (ФАО) — Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations.

1950 — Нобелевская премия Ф. Хенчу, Э. Кендаллу, Т. Рейхштейну за исследования гормонов коры надпочечников.

1950 — Э. Чаргафф создал свои знаменитые правила (соотношение в ДНК аденина и тимина 1:1 и гуанина и цитозина 1:1 постоянно у различных организмов).

1955 — вручение Нобелевской премии по физиологии и медицине А.Х.Т. Теореллю (1903–1981) за исследование природы и способа действия окислительных ферментов.

1955 — Нобелевская премия по химии В. Дю Вилье за синтез полипептидного гормона.

1955 — открыт фермент, синтезирующий РНК (Северо Очоа).

1955 — открытие нового класса фитогормонов — цитокининов (Скуг Ф., Миллер К. и др.).

1960 — 55 лет со дня вручения Нобелевской премии Ф. Бернету (1899–1985) и П. Медавара (1915–1987) за исследования приобретенной иммунологической толерантности.

1960 — открытие мРНК.

1960 — полный синтез хлорофилла (Вудворд Р.Б.).

1960 — разработка ферментативного метода получения изолированных протопластов (Кокинг Э.).

1965 — вручение Нобелевской премии по химии Р.Б. Вудворду за исключительный вклад в осуществление органического синтеза.

1965 — гибридизация клеток мыши и человека (Г. Харрис и Дж. Уоткинс): Harris H., Watkins J.F. Hybrid cells derived from mouse and man: artificial heterokaryons of mammalian cells from different species // *Nature*. — 1965 Feb 13. — Vol. 205. — P. 640–646.

1965 — классификация плазмид.

1965 — Нобелевская премия по физиологии и медицине Андре Львову, Ф. Жакобу и Ж. Моно за открытие генетической регуляции синтеза ферментов и вирусов.

1965 — обнаружение С. Бреннером с соавторами стоп-кодона.

1965 — Р. Холли определил полную нуклеотидную последовательность тРНК (тРНК аланина дрожжей).

1970 — в США принят закон о защите сортов растений.

1970 — открытие обратной транскриптазы (Х. Темин, Д. Балтимор).

1970 — открытие первого онкогена (SRC) в вирусе (Р. Duesberg и Р. Vogt, вирусологи из UCSE).

1970 — открытие рестриктазы (Гамильтон Смит).

1975 — конференция в Асиломаре с призывом наложить мораторий на эксперименты с рекомбинантной ДНК. Ее инициаторами были выдающиеся молекулярные биологи: П. Берг, Д. Балтимор, Дж. Уотсон и др.

1975 — Нобелевская премия по химии — К. Прелог.

1975 — получение Нобелевской премии по физиологии и медицине Р. Дульбекко, Х. Теминым и Д. Балтимором.

1975 — правительственное постановление в США, регламентирующее эксперименты с рекомбинантными генами.

1975 — разработаны методы гибридизация (colony hybridization) и Southern blotting для выявления специфических последовательностей ДНК.

1975 — разработка Ф. Сенгером метода секвенирования ДНК.

1975 — создание первых моноклональных антител (Георг Келер и Цезарь Мильштейн — Нобелевская премия 1984 г.).

1975 — создание рекомбинантного инсулина.

1980 — изобретение полимеразной цепной реакции — ПЦР (polymerase chain reaction, PCR). Дала мощный толчок для развития молекулярной биологии в методическом плане. Автор — К. Мюллис (Kary Banks Mullis, род. в 1944 г.), удостоен за это Нобелевской премии (1993). Корпорация «Сетус» запатентовала

данный способ, а в 1991 г. продала патенты на права фирме «Хоффман — Ла Рош».

1980 — в США принято решение о возможности патентования генно-инженерных организмов.

1980 — Нобелевская премия по физиологии и медицине Б. Бенацерафу, Ж. Доссе, Дж. Снеллу за открытия генетически детерминированных структур поверхностей клеток, регулирующих иммунологические реакции.

1980 — Нобелевская премия по химии П. Бергу (половинная) — за фундаментальные исследования в области биохимии нуклеиновых кислот, в частности, рекомбинантной ДНК; другая половина вручена У. Гилберту и Ф. Сенгеру за их вклад в определение последовательности оснований в нуклеиновых кислотах.

1980 — С. Коэн и Г. Бойер получили патент США на использование вирусных и плазмидных векторов для создания рекомбинантной ДНК.

1985 — в Cal Bio клонирован ген, кодирующий белок сурфактанта легких человека.

1985 — в журнале «Science» опубликовано сообщение о новой технологии, основанной на ПЦР, позволяющей генерировать миллиарды копий последовательности гена-мишени за несколько часов (Cetus Corporation).

1985 — вышло в свет руководство Национального института здоровья (США) для осуществления экспериментов по генотерапии на людях.

1985 — клонирована полностью активная обратная транскриптаза мыши и экспрессирована в кишечной палочке.

1985 — компания Генентех получила разрешение FDA на применение протропина при дефиците гормона роста у детей.

1985 — первые полевые испытания генетически модифицированных растений, устойчивых к насекомым, вирусам и бактериям.

1990 — FDA лицензировала тестирующее антитело к гепатиту С (Chiron).

1990 — начало реализации проекта «Геном человека» под руководством Дж. Уотсона.

1990 — первая в мире успешная генотерапия (спасена жизнь 4-летней девочки, страдавшей наследственным иммунным расстройством — ADA дефицит, вызывающий SCID).

1990 — первые успешные полевые испытания генетически модифицированного хлопка (Calgene Inc.).

1995 — впервые пересажен костный мозг бабуина пациенту со СПИД.

1995 — завершено исследование полной генетической последовательности невирусного организма — бактерии *Haemophilus influenzae* (1,8 млн. пар нуклеотидов).

2000 — клонирование свиньи в эксперименте.

2000 — объявлено об общем плане последовательностей в человеческом геноме, то есть о первой реконструкции его полного генома (фактическое завершение проекта «Геном человека» — 2003 г.).

2000 — создание «золотого риса» — генномодифицированной культуры, вырабатывающей повышенное количество бета-каротина.

2000 — сообщено о секвенировании генома дрозофилы (165 млн. пар оснований, 14 тыс. генов).

2000 — составление полной карты генома растения *Arabidopsis*.

ПЕРСОНАЛИИ

170 лет со дня рождения И.И. Мечникова (1845–1916).

155 лет со дня рождения Э. Бухнера (1860–1917).

150 лет со дня рождения и 75 лет со дня смерти А. Гардена (1865–1940) — Нобелевская премия по химии 1929 г.

125 лет со дня рождения Германа Меллера (Herman Joseph Muller, 1890–1967), американского генетика. Лауреат Нобелевской премии (1946) за от-

крытие мутаций, возникающих под действием рентгеновского облучения. Разрабатывал хромосомную теорию наследственности (вместе с Т. Морганом, А. Стертевантом и К. Бриджесом). С 1933 по 1937 гг. работал в Советском Союзе. Увлекался евгеникой и пытался пропагандировать ее. Иностраный член АН СССР. В 1948 г. после политизированной сессии ВАСХНИЛ, осудившей генетику, в знак протеста вышел из состава Академии (впоследствии был восстановлен в членстве).

120 лет со дня рождения Х. Дама — лауреата Нобелевской премии 1943 г. за открытие витамина К.

120 лет со дня рождения А.И. Виртанена (1895–1973) — Нобелевский лауреат 1945 г.

115 лет со дня рождения Ганса Кребса (1900–1981).

115 лет со дня рождения Николая Владимировича Тимофеева-Ресовского (1900–1981), отечественного генетика, ученика Н.К. Кольцова. В 1925–1945 гг. трудился в Германии. После войны был подвергнут 10-летнему заключению как «невозвращенец», продолжая работать по специальности на закрытом объекте в Сунгуле (Южный Урал). В последующем работал в различных учреждениях, в том числе в Обнинске, в Институте медицинской радиологии АМН СССР (1964–1969), исследуя проблемы радиационного мутагенеза, радиационной биогеоценологии, популяционной генетики и др.

110 лет со дня рождения Северо Очоа (1905–1993), лауреата Нобелевской премии 1959 г. за открытие механизмов биосинтеза РНК и ДНК» (вместе с Артуром Корнбергом).

110 лет со дня рождения Андрея Николаевича Белозерского (1905–1972), крупного отечественного биохимика, академика АН СССР, вице-президента АН СССР (1971–1972), одного из основателей молекулярной биологии в нашей стране. В течение 40 лет трудился на кафедре физиологии растений МГУ, совмещая это с деятельностью в НИИ АН и АМН СССР, а также другими научно-организационными обязанностями, в том числе руководящими должностями в Президиуме АН СССР. В 1965 г. он основал и возглавил Межфакультетскую лабораторию биоорганической химии при МГУ.

110 лет со дня рождения Владимира Дмитриевича Тимакова (1905–1977), известного отечественного микробиолога, академика АН и АМН СССР, президента АМН СССР (1968–1977). Своей научной и организационной деятельностью способствовал развитию микробиологии и эпидемиологии в нашей стране.

110 лет со дня рождения Василия Николаевича Ореховича (1905–1997), отечественного биохимика, академика АМН СССР, вице-президента АМН СССР (1960–1963). Разрабатывал проблемы биохимии и патохимии белков и протеолитических ферментов.

105 лет со дня рождения Дороти Мэри Кроуфут-Ходжкин (Dorothy Mary Crowfoot Hodgkin, 1910–1994), известного английского химика, лауреата Нобелевской премии (1964) за рентгеноструктурное исследование структуры биологически активных веществ (холестерина, пенициллина, витамина В₁₂, инсулина). Иностраный член АН СССР (1976). Награждена золотой медалью им. М.В. Ломоносова за выдающиеся достижения в области биохимии и кристаллохимии (1982).

105 лет со дня рождения французского молекулярного биолога Жака Моно (1910–1976), лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине 1965 г. (совместно с Андре Львовым и Франсуа Жакобом).

100 лет со дня рождения П. Медавара (Нобелевская премия 1960 г.).

100 лет со дня рождения Э.У. Сазерленда (Нобелевская премия 1971 г. за изучение механизма действия гормонов, в т.ч. цАМФ).

95 лет со дня рождения американского биохимика Эдмонда Ганса Фишера (Нобелевская премия по физиологии и медицине 1992 г. за фосфорилирование белков).

95 лет со дня рождения П.Д. Митчелла (1920–1992), лауреата Нобелевской премии по химии 1978 г.

95 лет со дня рождения Б. Бенаццерафа (Нобелевская премия 1980 г.).

90 лет со дня рождения М. Родбелла (Нобелевская премия 1994 года по физиологии и медицине за обнаружение G-белка — совместно с А. Гилманом).

90 лет со дня рождения Дж. Ледерберга, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине 1958 г. (вместе с Дж. Бидлом и Э. Тейтемом).

75 лет со дня рождения П. Догерти, лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине 1996 года «За открытия в области иммунной системы человека, в частности ее способности выявлять клетки, пораженные вирусом».

120 лет со дня смерти Луи Пастера (1822–1895).

105 лет со дня смерти Р. Коха (1843–1910).

75 лет со дня смерти Николая Константиновича Кольцова (1872–1940), выдающегося исследователя, основоположника экспериментальной биологии в России. С 1916 г. — член-корреспондент Петербургской академии наук (после революции — АН СССР), академик ВАСХНИЛ (1935). Основатель и директор Института экспериментальной биологии (1917–1938), директор Центральной станции по генетике сельскохозяйственных животных (1919–1929). Предложил теорию матричной репродукции наследственной молекулы (1928) — он считал ее белком. Организатор ряда журналов, в их числе «Успехи экспериментальной биологии» (1922–1929), «Биологический журнал» (1932–1938) и др. Был соредактором журнала «Природа» (1914–1930). Итоговый труд — «Организация клетки» (1936).

70 лет со дня смерти Ганса Фишера (1881–1945), лауреата Нобелевской премии по химии 1930 г.

70 лет со дня смерти Т. Моргана (Thomas Hunt Morgan, 1866–1945), создателя хромосомной теории наследственности, за что он был удостоен Нобелевской премии по медицине в 1933 г.

60 лет со дня смерти А. Флеминга, первооткрывателя пенициллина.

60 лет со дня смерти Дж.Б. Самнера (1887–1955), лауреата Нобелевской премии по химии 1946 года.

45 лет со дня смерти Отто Варбурга.

45 лет со дня смерти Ф. Рауса (1879–1970), открывшего вирус саркомы, ныне носящей его имя.

40 лет со дня смерти английского химика Р. Робинсона (Нобелевская премия 1947 г.).

35 лет со дня смерти А.Н. Несмеянова, основоположника элементоорганической химии, академика АН СССР, президента АН СССР (1951–1961).

35 лет со дня смерти У.Х. Стайна (Нобелевский лауреат 1972 г. по химии с С. Муром и К. Анфинсеном).

30 лет со дня смерти Р.Р. Портера (1917–1985) — Нобелевская премия 1972 года по физиологии и медицине за установление химического строения антител (вместе с Дж. Эдельманом).

20 лет со дня смерти К. Анфинзена (1916–1995) — Нобелевская премия по химии 1972 г.

К 150-летию открытия Менделя*



В научной среде принято шире отмечать юбилейные даты со 100-летним или 50-летним временным шагом. На 2015 год приходится 150-летие обнаружения Грегором Менделем результатов исследования о передаче по наследству признаков при скрещивании гороха. Он доложил данные своих опытов Обществу естествоиспытателей г. Брюнна (Австрия) — ныне Брно (Чехия). Результаты работы были опубликованы в 1866 г. в Трудах Общества естествоиспытателей под названием «Опыты над растительными гибридами» (перепечатка — в 1901 году).

Но ни устное, ни письменное слово не донесли до современников истинной сущности открытия Менделя. Понадобились время и прогресс знаний, чтобы новая идея была воспринята адекватно, что и случилось в 1900 году, когда состоялось «переоткрытие» законов Менделя независимыми исследователями: Г. де Фризом (Hugo de Vries, 1848—1935) — в Нидерландах, К. Корренсом (Carl Erich Correns, 1864—1933) — в Германии, Э. Чермаком (Erich Tschermak von Seysenegg, 1871—1962) — в Австро-Венгрии. Именно рубеж 1900 года признается точкой отсчета рождения генетики как науки.

Фактическая сторона дела — описание сути опытов Менделя — общеизвестна начиная со школьных учебников и кончая профессиональным изложением в научных руководствах. Но в любом историческом рассмотрении есть непреходящая ценность ретроспективного анализа.

На наш взгляд, именно ретроспекция помогает приблизить реальность и оценить истинность того или иного события. В истории с Г. Менделем важна началь-

ная фаза фактического забвения с последующим «переоткрытием» через почти 50 лет, затем еще 50-летняя стадия утверждения принципа менделизма в биологии и, наконец, следующие третьи 50 лет после открытия Уотсона и Крика и становления молекулярной биологии с вхождением в XXI веке в постгеномную эру.

Нужно акцентировать внимание на основные исторические вехи за 150 лет. Ясно, что обязательно упоминание «повторных открывателей» законов Менделя — де Фриза, Корренса, Чермака. Но, как нам представляется, нужно всегда напоминать новым поколениям ключевую роль У. Бэтсона, которому удалось в начале XX века в англосаксонской среде уравновесить значение нарождающейся генетики (кстати, он же и придумал этот термин) рядом с господствовавшим в тогдашней биологии дарвиновским учением и этим, по сути, обеспечить своевременное преемственное развитие генетики как науки, методологии и практики.

Дальше должны быть отражены имена Моргана с коллегами и последователями и среди них — выдающегося Меллера с его открытием радиационного мутагенеза. Очень важен русский вклад — Кольцова, Вавилова, Тимофеева-Ресовского. Бесценно и также своевременно участие физиков в ускорении прогресса генетики — Дельбрюка, Шредингера. Без них не было бы появления звезды Уотсона и Крика.

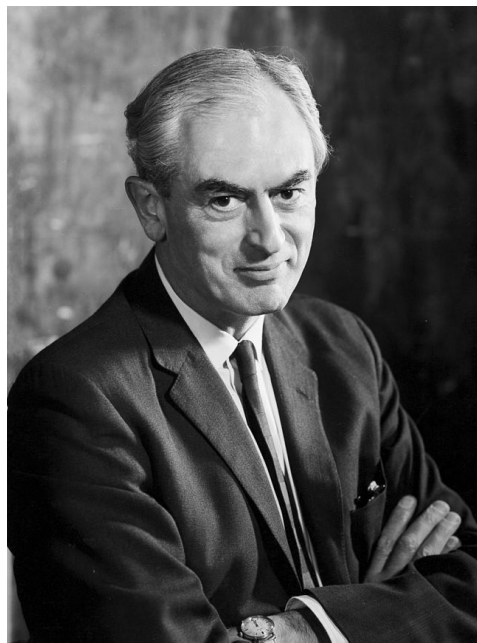
Наконец, подключение к генетике первых лиц среди химиков. Именно на их долю выпало сделать фантастические открытия XX столетия — расшифровать генетический код, открыть обратную транскрипцию, обосновать генную инженерию и т.д. Их имена известны: все они — Нобелевские лауреаты и вошли в историю науки как беспрецедентные первооткрыватели уровня Фарадея, Гельмгольца, Максвелла, Резерфорда, Бора, Гейзенберга и т.д. Вот наиболее яркие участники молекулярно-биологической «гонки», как любят называть это интеллектуальное соревнование сами химики: Очоа, Корнберг, Сенгер, Ниренберг, Корана, Темин, Балтимор, Берг и др., а еще ранее — их предшественники Эйвери, Чаргаф, Чейз.

Таким образом, имя Менделя в историческом аспекте непременно вписывается в последовательность преемственных событий.

В заключение отметим, что журнал откликнулся на менделевскую тематику (Воробьева О.В. К 140-летию выхода классической статьи Г. Менделя // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2006. — Т. 2. — № 4. — С. 72—73).

* Материал подготовлен О.В. Воробьевой

**К 100-летию со дня рождения
крупного иммунолога Питера Медавара***



28 февраля 2015 года исполнилось 100 лет одному из основателей современной иммунологии, лауреату Нобелевской премии Питеру Медавара. Журнал уже публиковал материалы о его жизни и деятельности в связи с 50-летием присуждения ему — совместно с Ф.М. Бернетом — Нобелевской премии (Воробьева О.В. К 50-летию вручения Нобелевской премии Бернету и Медавара за открытие приобретенной иммунологической толерантности // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2010. — № 4. — С. 68—75). Многие факты из его биографии уже были приведены, поэтому в настоящей подборке акценты будут смещены.

Вкратце его *curriculum vitae* выглядит следующим образом. Питер Брайан Медавар родился 28 февраля 1915 года в Бразилии, в семье бизнесмена, ливанца по происхождению, позднее получившего гражданство Великобритании, куда вся семья переехала в 1918 году.

Образование Медавар получил в Оксфордском университете, где и стал работать после его окончания. Во время Второй мировой войны в госпитале в Глазго он занимался лечением раненых, особенно с ожогами, когда приходилось пересаживать лоскуты кожи. Отсюда и возникло то направление, в котором ему довелось потом заниматься научной работой.

После войны он работал в разных учреждениях: сначала с 1947 по 1951 гг. состоял на должности про-

фессора зоологии Бирмингемского университета, а затем в течение десяти лет работал в колледже Лондонского университета. Именно в этот период он вместе со своими коллегами осуществил эксперименты, которые стали важной вехой в развитии иммунологии. За это ученый был награжден Нобелевской премией в 1960 году (вместе с Ф. Бернетом).

Столь высокое признание кардинально изменило его статус: в 1962 году он стал директором Национального института медицинских исследований в Милл-Хилле (Лондон). На этом посту он находился до инсульта, перенесенного им в 1969 году. После восстановления движений и речи он продолжил работать — с 1977 по 1983 гг. был профессором экспериментальной медицины Королевского института. Он занимал также общественные должности: президент Международного научного общества трансплантологов и др. Много внимания уделял издательским делам, публикуя труды познавательного характера. В этот период значительную помощь во всех его профессиональных занятиях оказывала жена Джин.

Видное место в его деятельности занимают научно-популярные издания, о которых подробнее будет рассказано ниже.

Ученый такого ранга был удостоен высших почестей: член Лондонского Королевского общества (1949), медаль Копли Лондонского Королевского общества (1969), дворянский титул (1952), кавалер Ордена чести (1972).

П. Медавар скончался 2 декабря 1987 года.

На указанной неброской канве жизни ярко выступают интеллектуальные достижения этого оригинального ученого. Особенно это проявляется при оценке реального преемственного вклада двух лауреатов — Ф.М. Бернета и П. Медавара — в развитие и становление современной иммунологии. Несмотря на блестящий старт иммунологии в начале XX века, выразившийся в череде Нобелевских премий — Беринг (1901), Кох (1905), Мечников, Эрлих (1908), Рише (1913), Борде (1919), затем серия крупных открытий в этой области стала значительно реже (известно, что с 1930 по 1951 гг. не присуждалось ни одной премии по иммунологии). И вот Нобелевский комитет принимает решение вручить премию 1960 года по физиологии и медицине «за исследования приобретенной иммунологической толерантности». Медавар был оценен именно согласно этой конкретной формулировке, а вот Бернет сам считал, что его «доля в открытии приобретенной иммунологической толерантности была незначительна — это формулирование гипотезы, которая помогла сделать эксперимент». Однако присуждение

* Материал подготовлен О.В. Воробьевой

Нобелевской премии Бернету было не только за генерацию идеи толерантности, но и за более фундаментальный многолетний вклад в формирование основ иммунного ответа, а точнее — создание клонально-селекционной теории иммунитета. При этом он опирался на гипотезу Йерне, выдвинутую им в 1950-е годы, сначала недостаточно понятую многими специалистами, но впоследствии признанную всеми и оцененную Нобелевской премией. Поэтому резюмируя, можно отметить, что присуждение Нобелевской премии за выдающуюся работу в иммунологии после относительного затишья ознаменовало собой подтверждение вхождения ее в новый этап на очередном витке прогрессивного развития. Об этом объективно свидетельствует целый каскад премий после знакового рубежа 1960-го года: Эдельман, Портер — установление химического строения антител (1972); Бенацераф, Доссе, Снелл — открытие генетически детерминированных структур поверхности клеток, регулирующих иммунологические реакции (1980); Йерне — разработка теории идиотипической сети, Мильштейн, Келер — разработка техники получения гибридом (1984); Тонегава — открытие генетического принципа происхождения разнообразия антител (1987); Догерти, Цинкернагель — открытия, касающиеся специфичности клеточно-опосредованной иммунной защиты (1996) и др.

Есть много событий в современной иммунологии, которые не были увенчаны наградами, но от этого их ценность не снижается: открытие IgE в 1966 году (супруги Ишизака) и других классов иммуноглобулинов, обнаружение многочисленных факторов, определяющих иммунный и аллергический ответ и т.д.

Таким образом, историческая оценка научного вклада П. Медавара должна вписываться в контекст указанных событий и фактов. Другой не менее важный аспект обсуждаемого открытия, отмеченного Нобелевской премией, касается не только его значения для иммунологии *per se*, но и его предназначения для развития всей медицины, в том числе таких направлений, как трансплантология, онкология и др. Это подчеркивал и Свен Гард из Каролинского института, представляя Нобелевских лауреатов на церемонии в Стокгольме: «Они открыли новую главу в истории экспериментальной биологии, неопровержимо доказав возможность прямого изучения иммунологически активных тканей, что в свою очередь создало условия для дальнейшего проникновения в загадку природы иммунитета и таких нарушений иммунного процесса, которые приводят к развитию серьезных заболеваний». Такую же мысль развивал позже и Медавар в своей автобиографии (1986): «Главное значение откры-

тия толерантности было не практическим, а моральным. Оно давало новую надежду многим биологам и хирургам, которые работали, чтобы сделать возможной, например, пересадку почки от одного человека к другому».

Теперь следует осветить проблему приобретенной иммунологической толерантности в связи с работами Медавара. Здесь существенно еще раз упомянуть, что экспериментальные доказательства английского ученого базировались на идеях Бернета. *Experimentum crucis* был поставлен в 1953 году П. Медавара в сотрудничестве с Р.Э. Биллингэмом и Л. Brentom.

Опыт был поставлен на инбредных линиях мышей. Иммунную реакцию к антигенам гистосовместимости устанавливали по отторжению кожного трансплантата. Было показано, что мыши одной линии, которым в эмбриональном периоде вводили кроветворные клетки селезенки мышей другой линии, по достижении состояния зрелости не отторгали кожные трансплантаты мышей доноров, то есть аллотрансплантат приживался. Контроль с пересадкой кожных лоскутов от мышей третьей линии, отличающихся по антигенам гистосовместимости от обеих линий (как доноров, так и реципиентов), продемонстрировал отторжение аллотрансплантата по обычной схеме.

Следовательно, уже на уровне знаний 1950-х годов предлагались решения проблемы «свой-чужой» и обосновывалось рассмотрение иммунологической толерантности (ареактивности) как механизма, антагонистического иммунологической реактивности, обеспечивающего целостную реакцию организма на собственные и чужеродные антигены.

В юбилейной заметке целесообразно остановиться на анализе научно-популярного наследия Питера Медавара, сравнительно мало отраженного в отечественной литературе. Он был прекрасным популяризатором и пропагандистом науки. Высокий, двухметрового роста, с громким голосом, человек энциклопедических знаний, он был востребован в обществе.

Впервые он обратился к этому жанру в 45-летнем возрасте, когда напечатал небольшую книгу «The future of man» («Будущее человека»), 1960, которая представляла собой конспект 6 лекций, прочитанных на радио BBC. Через 9 лет он написал книгу «Induction and Intuition in Scientific Thought» — «Индукция и интуиция в научном мышлении» (1969). Это было до инсульта, который случился у него в 1969 году.

После перенесенного заболевания он не оставлял просветительского направления своей деятельности. В 1978 году вместе со своей супругой опубликовал книгу: Medawar P.B., Medawar J.S. Current ideas in biology.

London, 1978. Имеется ее перевод на русский язык: Медавар П.Б., Медавар Дж. Наука о живом. Современные концепции в биологии. М., 1983. Примерно в это время им была написана брошюра с привлекательным дидактическим заглавием: *Advise to a young scientist*. N.Y., 1979. 109 p. («Советы молодому ученому»), которая наиболее привлекает внимание читателей. В 1986 году увидела свет его автобиографическая книга с интригующим названием: *Medawar P.B. Memoir of Thinking Radish. An Autobiography*. Oxford University Press, 1986. 209 p. («Мемуары думающей редиски: автобиография»).

Имеется еще ряд его философских и публицистических произведений:

- *The Art of the Soluble: Creativity and Originality in Science*, 1967 («Искусство решаемого: креативность и оригинальность в науке»).
- *Pluto's Republic*, 1984 («Республика Плутона»).
- *Act of Creation*, 1964 («Акт творения»).
- *Aristotle to Zoos: A Philosophical Dictionary of Biology* (Аристотель — зоопаркам: Философский биологический словарь, 1985. Совместно с Джин Медавар).

Особый интерес представляет его книга, адресованная молодым исследователям, — «Советы молодому ученому». В первой главе автор говорит о чертах, которые должны быть присущи научному работнику. Особенно он подчеркивает значимость наличия такого качества, как «*exploratory impulsion*» — «побуждение к исследованию».

В следующей главе «*What Shall I Do Research On?*» Медавар отвечает на вопрос, какими вопросами следует заниматься, что надо изучать. Его мнение: надо решать важные проблемы, а не размениваться на легкие подходы.

При обсуждении путей решения проблемы он рекомендует читать «интенсивно и выборочно, но не слишком много». Вообще надо обладать «искусством решаемого», чтобы достигнуть цели исследования.

Каков должен быть пол человека науки — здесь ответ ученого однозначен: равенство полов. Что касается расовых аспектов интеллектуальных способностей, то им подразумеваются равные возможности в процессе научного поиска.

Важный вопрос — необходимость синергии команды, творческое единство научного коллектива.

Обязательным условием он считает широкое обнародование молодым ученым собственных результатов.

Медавар также дает советы относительно проведения и интерпретации экспериментов. Заслуживает внимания аспект проверки гипотезы исследования. При

этом прежде чем убедить других в своей правоте, надлежит пройти этап убеждения самого себя. В философских концепциях науки он отдает предпочтение Карлу Попперу как стороннику критической оценки.

Предшественники и последователи составления сборников советов молодым, как заниматься наукой, конечно, у Медавара были. Прежде всего, великий испанский ученый, нейробиолог, первооткрыватель микроскопического строения мозга, лауреат Нобелевской премии Рамон-и-Кахаль, который более 100 лет тому назад написал на испанском языке книгу «Правила и советы для исследователей-биологов», переведенную на все основные языки научного общения (есть такие советы и в его автобиографии «Воспоминания о моей жизни»). Дает советы молодым ученым и знаменитый Джеймс Уотсон в своей книге «Двойная спираль» (1968; русский перевод — 1969) и «Избегайте занудства» (2007; русский перевод — 2010). Правда, его манера изложения и тонкий юмор требуют соответствующей коррекции при практическом применении его рекомендаций. Имеются также много автобиографий выдающихся ученых разных времен (Дарвин, Бэр, Фарадей, Пирогов, Бурдах, Сеченов, Бехтерев, Форель, Бернет, Крик, Догерти и др.), в которых без излишних наставлений преподносятся примеры реализации научных устремлений той или иной талантливой личностью, посвятившей себя науке. Но еще более убедительными пособиями в отношении научных методов являются классические книги Рене Декарта «Рассуждение о методе» и Клода Бернара «Введение в изучение экспериментальной медицины». Есть еще одно краткое произведение, которое может выручить каждого пытливого человека в любой ситуации, особенно нашего соотечественника, — это «Письмо И.П. Павлова к молодежи». Так что труды Медавара пополняют эту бездонную тему о сущности познания внешнего и внутреннего мира.

Ниже приводятся наиболее характерные высказывания Медавара по вопросам научной методологии. Иногда они носят афористический характер, как и полагается избранному им жанру в стиле мыслей древних мудрецов или остроумных максим Нового Времени.

- «Если политика является искусством возможного, то наука, несомненно, искусством решаемого. Оба в значительной степени — это практически осмысленные дела» (Акт творения, 1964).

- «Я признаю «интеллект» и считаю, что имеются наследственные различия в умственных способностях, но я не верю, что интеллект является простым, измеряемым шкалой даром, который можно вычислить, применив к

отдельной личности IQ и тому подобное» (Советы молодому ученому, 1967).

- «Ученый является собирателем и классификатором фактов не больше, чем историк является человеком, который собирает и классифицирует хронологию дат великих битв и важных открытий» (Аристотель — зоопаркам: Философский биологический словарь, 1985).

- «Каждый ученый любого возраста, который хочет сделать важные открытия, должен исследовать значимые проблемы. Неострые или пустые проблемы дадут неострые или пустые ответы. Недостаточно, чтобы проблема была «интересной». ... Проблема должна быть такой, чтобы ответ был или для всей науки, или для человечества» (Советы молодому ученому, 1979).

- «Наследственность предполагает, а развитие предполагает» (из личного сообщения Медавара, 1958).

- «Я не могу дать какому-либо ученому любого возраста лучший совет, чем такой: степень убежденности, что гипотеза справедлива, не зависит от того, истинно ли это или нет» (Советы молодому ученому, 1979).

- «Люди, которые пишут неясно, или неопытны в писательском труде, или нездоровы» (Республика Плутона, 1984).

- «Это является... признаком времени — хотя наши братья физики и химики могут улыбаться, слушая меня, — что ныне биология представляет собой науку, в которой могут быть рождены теории: теории, которые приводят к предсказаниям и предсказаниям, которые иногда сбываются. Эти факты укрепили меня во мнении, которое я страстно поддерживаю, — что биология является наследницей всех наук» (из речи Медавара на банкете во время Нобелевских торжеств, 10 декабря 1960 года).

- «Искусство исследования [есть] искусство создания трудных проблем, решаемых изобретением средств их решения» (Республика Плутона, 1984).

- «Случай, которому я найду доказательство, — это то, что когда приходит литература, она вытесняет науку» (Республика Плутона, 1984).

- «Человеческий ум обрабатывает новую идею таким же образом, как тело обрабатывает чужеродный белок: он отторгает ее» (Искусство решаемого, 1967).

- «Вы... говорили, что наука развивается как организм. Вы говорили, что, если сегодня мы видим дальше, чем наши предшественники, то это только потому, что мы стоим на их плечах. Однако [Нобелевская презентация] является тем событием, на котором я предпочту вспоминать не гигантов, на чьих плечах мы стоим, а друзей, с

которыми стоим рука об руку, ... многих коллег по работе» (из речи Медавара на банкете во время Нобелевских торжеств, 10 декабря 1960 года).

К 50-летию открытия Робертом Холли транспортной РНК*



В 2015 году отмечается очень важная дата — 50-летие открытия американским биохимиком Робертом Холли полной нуклеотидной последовательности транспортной РНК аланина. Данное событие венчало собой блестящий взлет человеческого ума — расшифровку генетического кода. Еще некоторое время до этого такой ход дела даже не прогнозировался. Известно, что в 1958 году Эдвард Тейтем при получении Нобелевской премии осторожно высказался, что генетический код будет распознан только следующим поколением ученых. Но свершилось невероятное. Уже через три года М.У. Ниренберг вместе с Г.И. Маттеи обнаружили, что синтез фенилаланина обусловлен триплетным кодом — системой трех азотистых оснований UUU, определяющих местоположение аминокислоты в молекуле белка при его синтезе. Прошло еще несколько лет, и генетический код, благодаря продолжению целенаправленной работы Ниренберга и параллельным исследованиям Кораны и Очоа, был целиком раскрыт. На долю Холли выпала честь поставить последнюю точку: установить полную химическую структуру транспортной РНК аланина дрожжей, то есть, идентифицировать отдельный ген.

При анализе жизненного пути и научной деятельности ученого представляется как бы обычная жизнь

* Материал подготовлен О.В. Воробьевой

представителя интеллектуального слоя, на долю которого выпала война в университетские годы. Но в случае Холли это оказался неординарный путь к восхождению на вершину познания самых высочайших истин.

Роберт Уильям Холли родился 28 января 1922 года в Урбане (штат Иллинойс) в семье учителей. В 1938 году по окончании средней школы он поступил на химический факультет Университета Иллинойса. Здесь он получил степень бакалавра в 1942 году, после чего перевелся в Корнельский университет, где продолжил изучение курса органической химии для получения степени PhD под руководством профессора А.Т. Бломквиста (1942–1947). Однако закончить образование он смог только в 1947 году, поскольку в 1944–1946 гг. по заданию военного ведомства участвовал вместе с профессором Винсентом дю Виньо в медицинском колледже Корнельского университета в работах по первому химическому синтезу пенициллина.

В 1945 году он женился на Анн Дворкин, учительнице математики; у них родился сын Фредерик.

После войны Холли провел два года (1947–1948 гг.) в Университете штата Вашингтон в Пулмене как постдокторант Американского химического общества под руководством профессора Карла М. Стивенса, а затем вернулся на должность доцента органической химии в Корнельском университете, в экспериментальной сельскохозяйственной станции «Женева». Тут он находился в течение 1950–1957 гг.

В тот период он занимался исследованием характеристики метаболических преобразований 2,4-дихлорофеноксиксусной кислоты у бобовых и идентифицировал гормоны растений, ауксины, присутствующие в капусте. При изучении пенициллина Холли установил корреляцию между химической реактивностью амидов и их пространственными структурами.

Важный урок для молодого ученого из этого периода: прежде всего, постановка вопроса, что может сделать химик-органик для биохимии. Надо заметить, что это было характерно для многих исследователей того времени (А. Тодд, В. Прелог, М.М. Шемякин и др.). При этом Холли много внимания уделял процедурам очистки, что сыграло свою положительную роль в его будущих исследованиях.

В 1955–1956 гг. во время годовичного отпуска он получил субсидию от Фонда Гутгенхайма для проведения научных исследований в Департаменте биологии Калифорнийского технологического института (Калтеха) в Пасадене. Отсюда берет начало его основательное вхождение в изучение РНК и белкового синтеза. Он

работал вместе с Джеймсом Ф. Боннером. Нужно сказать, именно эта стажировка имела решающее значение для создания базы для его будущего открытия. Холли сам говорил об этом в заключение Нобелевской лекции, что история с транспортной РНК аланина «вполне естественно следует из годовичного отпуска, Я настоятельно рекомендую такие отпуска».

Предтечей темы, которая станет основой открытия, была проблема растворимых РНК. В те годы в ряде лабораторий мира изучались механизмы белкового синтеза *in vitro*, особенно в группе Пауля Замечника в General Hospital Массачусетса. Было показано, что перед встраиванием в белки аминокислоты активируются семейством ферментов как аминоксиладенилаты. Затем перед П. Замечником и М. Хогландом встала задача прикрепления аминокислот к РНК. Оказалось, что не РНК, находящиеся в микросомах и рассматриваемые по этой причине как играющие главную роль в белковом синтезе, а новое семейство малых РНК присутствует в других субклеточных фракциях, используемых для системы синтеза *in vitro*. Из-за того, что они выявляются в супернатанте при ультрацентрифугировании, эти РНК называли растворимыми РНК. Было продемонстрировано, что они состоят из одной сотни нуклеотидов, но их точная роль в синтезе белка была неизвестна. Холли пришел к такому же заключению другим путем: при изучении чувствительности РНКазы — реакции, противоположной таковой активации аминокислот. Постепенно была выявлена связь между этими растворимыми РНК и адапторными РНК (о существовании которых высказал предположение Фрэнсис Крик три года назад), прежде чем установить связь между генетической информацией, содержащейся в нуклеиновых кислотах, и аминокислотами, составляющими белки. Это-то и делало растворимые РНК ключевым звеном в окончательной расшифровке генетического кода.

В 1958 году ученый переехал в Итаку (штат Нью-Йорк) и стал работать химиком-исследователем в Агробиохимической лаборатории при Национальной лаборатории сельского хозяйства. В 1962 году он стал профессором, а в 1964 году вернулся в свой родной Корнельский университет, где занял должность профессора и руководителя отдела биохимии и молекулярной биологии. В 1965–1966 гг. был деканом факультета биохимии.

В Корнелле Холли с коллегами провели исследования в русле раскрытия Ниренбергом генетического кода для фенилаланина.

После расшифровки генетического кода и выяснения механизма записи наследственной информации

встала очередная задача определения «перевода» этой информации с языка ДНК на язык белков. Ее решением занялся американский исследователь Роберт Холли. Успешное решение ее было увенчано Нобелевской премией вместе с учеными, раскрывшими генетический код, — Ниренбергом и Кораной в 1968 году.

Концептуальной основой предстоящей работы была центральная догма генетики, разработанная Ф. Криком. В рамках этой теории гипотетическим веществом, ответственным за звено трансляции, должны стать транспортные РНК, соответствующие 20 аминокислотам. Холли взялся за изучение только одной аминокислоты. Используя ферменты рибонуклеазы, исследователь разделял молекулу РНК на небольшие фрагменты и определял их нуклеотидную последовательность. Затем Холли синтезировал более крупные фрагменты и в конечном итоге ему удалось определить структуру тРНК, переносящей аланин в клетках дрожжей.

Этот методический прорыв привел уже других ученых к раскрытию структуры остальных тРНК. Были выяснены многие детали процесса перевода наследственной информации, включая участие рибосом.

Суть подхода Холли заключалась в следующем.

1. Проводится разрезание целой молекулы на множество мелких фрагментов с использованием одной из двух нуклеаз. Выбранные нуклеазы, панкреатическая рибонуклеаза и рибонуклеаза Т1 такадиастазы, расщепляют в различных местах так, чтобы мелкие фрагменты от каждого переваривания перекрывались.

2. Фосфодиэстераза змеиного яда может разрезать каждый мелкий фрагмент на последовательный ряд субфрагментов. Последний нуклеотид каждого субфрагмента может быть определен по последовательности каждого мелкого фрагмента (до примерно пяти нуклеотидов).

3. Сравнение коротких последовательностей фрагментов из перекрывающихся переваренных частей на этапе 1 и наличие нескольких отдельных модифицированных нуклеотидов уже позволяют консолидировать мелкие фрагменты в более длинные последовательности.

4. С использованием частичного переваривания формируют крупные фрагменты. После хроматографического разделения крупных фрагментов каждый может быть деградированным рибонуклеазами на мелкофрагментные составные части. Каждый крупный фрагмент можно затем конструировать из мелких фрагментов. Перекрытие между крупными фрагментами позволяет осуществить конечную сборку полной молекулы.

Для реализации всего процесса очистки понадобилось 150 кг пекарских дрожжей, из которых с помощью фенольного экстрагирования получили 100 г грязной фракции и только 1 г чистой дрожжевой тРНК.

Этот раздел исследования Роберт Холли выполнил вместе со своими коллегами Джин Аппгар и Сюзан Меррилл. С ними же он осуществил очистку тРНК аланина, валина, гистидина и тирозина. На весь этот цикл работ ушло три года. Результаты были напечатаны: Appgar J., Holley R.W., and Merrill S.H. Purification of the alanine-, valine-, histidine-, and tyrosine-acceptor ribonucleic acids from yeast // *J. Biol. Chem.* — 1962. — Vol. 237. — P. 796–802.

Для осуществления секвенирования молекулы, состоящей из 77 нуклеотидов, был применен метод Сенгера, который тот употребил при определении химической структуры инсулина.

Для определения нуклеотидных последовательностей Холли разрезал полинуклеотидную цепь тРНК на 16 фрагментов, идентифицировал организацию мелких фрагментов и реконструировал первоначальную общую структуру. Р. Холли совместно с Джорджем Эвереттом, Джеймсом Мэдисоном и Адой Замир сначала использовали панкреатическую рибонуклеазу для расщепления до пиримидиновых нуклеотидов, а затем рибонуклеазу Т1 такадиастазы — для расщепления цепи РНК до остатков гуаниловой кислоты. Они изолировали получившиеся фрагменты ионообменной хроматографией. Компоненты динуклеотидных фрагментов потом определяли по их хроматографическим и электрофоретическим характеристикам. Более крупные фрагменты переваривались фосфодиэстеразой змеиного яда и секвенировались. На указанные процедуры ушло около 2,5 лет. При этом в первой фазе исследования по секвенированию удалось определить два концевых фрагмента тРНК аланина. Итоги данного этапа были опубликованы: Holley R.W., Everett G.A., Madison J.T. and Zamir A. Nucleotide sequences in the yeast alanine transfer ribonucleic acid // *J. Biol. Chem.* — 1965. — Vol. 240. — P. 2122–2128. Остальные 14 фрагментов были вскоре также расшифрованы. Это была первая нуклеотидная последовательность известной нуклеиновой кислоты.

Таким образом, в 1965 году работа была полностью завершена и результаты ее были опубликованы в журнале «Science». Статья была представлена от лаборатории растений, почвы и питания Департамента сельского хозяйства США и Отдела биохимии Корнельского университета. Ссылка: Holley R.W., Appgar J., Everett G.A., Madison J.T., Marquisee M., Merrill S.H., Penswick J.R.,

and Zamir A. Structure of a Ribonucleic Acid // Science. — 1965. — Vol. 147(3664). — P. 1452–1465.

Весьма характерно резюме этой работы, предваряющее основной текст: «Установлена полная нуклеотидная последовательность транспортной РНК, выделенной из дрожжей. Это первая нуклеиновая кислота, структура которой известна». Звучит почти как формулировка закона в школьных учебниках.

Одного этого открытия достаточно для внесения в список создателей молекулярной биологии. Но ученый на этом не остановился. Им вскоре была определена в дополнение к первичной и вторичная структура тРНК. Оказалось, что вторичная структура напоминает трехлиственный клевер (рис. 1).

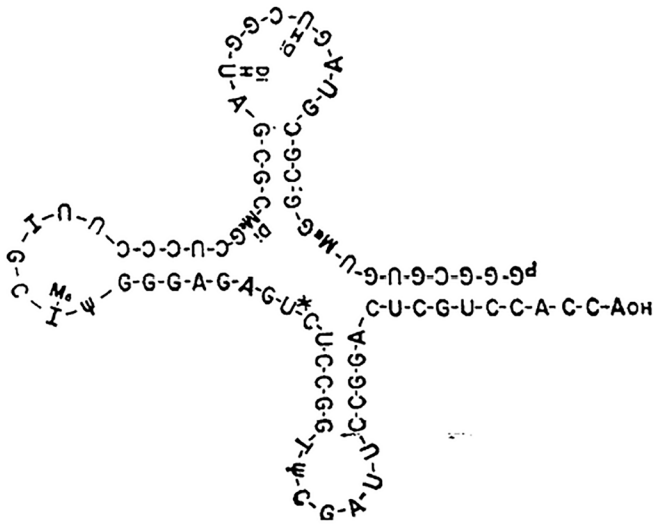


Рис. 1. Вторичная структура тРНК — «трехлиственный клевер» (из статьи Холли в «Science», 1965)

При этом последовательность нуклеотидов в среднем лепестке комплементарна последовательности информационной РНК. Подобная комплементарность между тРНК и мРНК обеспечивает правильное расположение аминокислот в составе белка. О такой конфигурации предполагали Элизабет Келлер и Джон

Пенсвик, а затем к этому присоединился Роберт Холли. Полные исследования данного вопроса показали наличие структуры клеверного листа у всех тРНК.

Столь экстраординарные открытия были замечены в научном сообществе и в 1968 году трое ученых, внесших решающий вклад в расшифровку генетического кода — Маршалл Ниренберг, Хар Гобинд Корана и Роберт Холли — были удостоены Нобелевской премии. Представитель Каролинского института Петер Рейхард, характеризовавший лауреатов, отозвался о Холли как о человеке, «который является одним из первооткрывателей специального типа нуклеиновой кислоты, которая... обладает способностью считывать генетический код и переводит его в белковый алфавит».

После такого триумфа Р. Холли некоторое время продолжил изучение тРНК, пока не переключился на исследование проблемы клеточного деления и рака. Такой путь переключения тематики проделывали некоторые молекулярные биологи (Крик, Дельбрюк, Ниренберг, Бреннер и др.), причем, как правило, не достигая высот своих звездных часов в области первоначальных собственных выдающихся открытий. Примерно это же повторилось и в случае Холли. Причем, были и моменты, связанные с генерацией гипотез (например, в отношении онкогенеза, где он отдавал предпочтение повреждению мембран), некоторые положения которых шли вразрез с другими, более вескими и впоследствии оказавшиеся более вероятными.

Ученый в 1966 году получил поддержку для проведения научной работы в Солковском институте по биологическим исследованиям в Сан-Диего (Калифорния). В 1968 г. он становится профессором молекулярной биологии Американского онкологического общества и членом научного общества Солковского института.

Он удостоен ряда наград: премия Альберта Ласкера за фундаментальные медицинские исследования (1965) и др. Состоял членом Американского общества биохимиков, имел почетные звания в университетах.

Р. Холли умер 11 февраля 1993 года.

СОБЫТИЯ ПЕРВОЙ ПОЛОВИНЫ 2015 ГОДА

КОНФЕРЕНЦИИ, СЪЕЗДЫ

26—31 января 2015 года в Звенигороде Московской области прошла зимняя школа «Современная биотехнология и биотехнологии будущего 2015». Организатор — образовательная организация Future Biotech. Мероприятие проводилось в третий раз. В его программу входят лекции, мастер-классы, постерная сессия, открытые дискуссии. Информация: <http://www.futurebiotech.ru>.

17—20 марта 2015 года в Москве состоялись 8-й Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» и 13-я международная специализированная выставка «Мир биотехнологии 2015».

Организаторы конгресса и выставки: Департамент науки, промышленной политики и предпринимательства города Москвы, Российский фонд фундаментальных исследований Министерство образования и науки Российской Федерации, Министерство промышленности и торговли Российской Федерации, Федеральное агентство научных организаций, Российская академия наук, Российский фонд фундаментальных исследований, Российский союз химиков, ЗАО «Экспо-биохим-технологии».

В рамках 8-го Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» состоялись три пленарных заседания по проблеме «Фундаментальные исследования и биотехнология». Были организованы следующие секции:

- Инновации, финансы и бизнес в становлении биотехнологической индустрии.
- Биотехнология и образование
- Биотехнология и медицина.
- Сельскохозяйственная биотехнология.
- Биокатализ и биокаталитические технологии.
- Биоинформатика.
- Биотехнология и промышленность.
- Биоматериалы и их роль в современных биотехнологии и медицине.
- Биотехнология пищи. Продукты здорового питания.
- Биотехнология в решении проблем охраны окружающей среды.
- Иммунная биотехнология.

- Биогеотехнология.
- Биоэнергетика — важный фактор в решении экологических и экономических проблем.

Состоялось обсуждение актуальных тем на круглых столах: 1) лесная биотехнология: от исследований к инновациям; 2) агробиотехнологии и агроэкосистемы; 3) биомедицинские сенсоры и технологии; 4) современные проблемы животноводства и биотехнологии их решения.

Были проведены конкурс молодых ученых и постерные сессии.

Параллельно с Конгрессом была организована 13-я международная специализированная выставка «Мир биотехнологии — 2015», на которой были представлены экспозиции по различным темам, включая: процессы и аппараты для биотехнологических производств и лабораторных исследований; компьютерные технологии; лабораторно-аналитическое оборудование и биоаналитические комплексы; диагностические наборы для выявления возбудителей заболеваний растений, в животноводстве, кормопроизводстве, в пищевой и перерабатывающей промышленности; биочипы и биосенсоры; весь спектр биопродуктов для фармацевтической и пищевой промышленности, агропромышленного комплекса, ветеринарии, геологии, промышленных производств, а также биоагенты для охраны и восстановления окружающей среды; биологически-активные добавки; тест-системы для определения алкоголя и наркотических веществ; биокатализ и биокаталитические технологии; питательные среды; биопрепараты для медицины и косметологии, а также готовые продукты на их основе; альтернативные источники энергии, в т.ч. из возобновляемого сырья, наномолекулярные преобразователи энергии; промышленная и лабораторная безопасность.

ПУБЛИКАЦИИ

Fritzsche W., de la Chapelle M.L. Molecular Plasmonics. — 2014. — 2014 p.

В книге рассматриваются оптические эффекты, происходящие в наномасштабе, и в особенности их модификация в присутствии биомолекул. Анализируются подходы к комбинированию наноструктур и биомолекул, чтобы достичь желаемых функциональных свойств. Книга предназначена для биологов-аналитиков, физико-химиков и медицинских химиков.

Handbook on Agriculture, Biotechnology and Development. S.J. Smyth, P.W.B. Phillips, D. Castle (Eds.). — Edward Elgar Pub, 2014. — 868 p.

Данная книга представляет собой руководство по сельскохозяйственной биотехнологии. В состав ее авторов входят ведущие профильные специалисты из 57 учреждений 16 стран. Акцент делается на ГМ культуры, являющиеся объектом инноваций в сельском хозяйстве.

Abdul Wahab, Shahid Ullah Khan. Handbook of Pharmaceutical Biochemistry for Health Professionals. — Lambert Academic Publishing, 2015. — 340 p.

Настоящее руководство по фармацевтической биохимии для медиков предназначено для студентов, обучающихся по программам по биохимии, биотехнологии и смежным дисциплинам.

Handbook of RNA Biochemistry. 2 Volume Set. 2nd Edition. R.K. Hartmann, A. Bindereif, A. Schon, E. Westhof (Eds.). — Wiley, 2014. — 1384 p.

Двухтомное руководство по биохимии РНК выходит вторым изданием. В его подготовке приняли участие около 100 специалистов из разных стран. Каждый том состоит из двух частей, в которых обстоятельно излагаются основы биохимии РНК. В первом томе рассматриваются вопросы синтеза и структурной детерминации РНК, во втором томе анализируются проблемы геномики и биоинформатики РНК и ее функции. Очень важным аспектом является, помимо обсуждения фундаментальных вопросов, ориентация на решение практических проблем.

Нетрусов А.И. Введение в биотехнологию: учебник. — М.: Академия, 2014. — 282 с.

Учебник создан в соответствии с Федеральным государственным образовательным стандартом по направлению подготовки «Биология». Приведены современные сведения об основах биотехнологии и промышленной микробиологии; рассмотрены объекты и методы биотехнологии микроорганизмов; даны сведения о процессах получения различных веществ с помощью микробов, генномодифицированных штаммов, возобновляемых источников энергии и их выделения с применением мембранных технологий; описаны приемы выращивания микробных, растительных и животных клеток и очистки биотехнологических продуктов. Рассмотрены традиционные и современные биотехнологии для получения пищевых продуктов с применением твердофазного культивирования, иммобилизованных клеток и другие аспекты этой быстро развивающейся науки, включая патентование биологических объектов и создание нового биотехнологического производства.

Авдеева Л.В., Алейникова Т.Л., Андрианова Л.Е. Биохимия. Учебник. Под ред. Северина Е.С. 5-е изд., испр. и доп. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. — 768 с.

В учебнике рассмотрены основные положения классической биохимии. Приведены сведения о структуре и свойствах биомолекул, биоэнергетике, молекулярных основах физиологических функций человека, биохимических особенностях важнейших органов и тканей. Изложены современные представления о молекулярных основах нарушений при ряде патологических состояний и болезней. Учебник предназначен для студентов медицинских вузов, аспирантов.

ПРЕДСТОЯЩИЕ МЕРОПРИЯТИЯ 2015 ГОДА

КОНФЕРЕНЦИИ, СЪЕЗДЫ

О проведении 3-й Международной конференции «Генетика, геномика, биоинформатика и биотехнология растений» (Новосибирск, 17–21 июня 2015 г.)

С 17 по 21 июня 2015 года в Институте цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск) состоится 3-я Международная конференция «Генетика, геномика, биоинформатика и биотехнология растений».

На конференции будут представлены результаты новейших исследований в области генетики, геномики, биоинформатики и биотехнологии растений, планируется обсуждение перспективных направлений совместных работ по фундаментальным и прикладным аспектам изучения генома растений.

Основные направления работы конференции:

- Организация и эволюция генома растений, системная биология.
- Генетика и селекция в изменяющихся условиях окружающей среды.
- Физиологическая и экологическая генетика растений.
- Генетическая инженерия и клеточная биотехнология.

22–25 июня 2015 года на базе Института цитологии и генетики СО РАН будет проходить также седьмая Международная Школа молодых ученых «Системная биология и биоинформатика» (SBB'2015).

Контакты:

E-mail: plantgen@bionet.nsc.ru

Факс: +7 (383) 3331278

О проведении II Российской конференции «Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии» (Казань, 16 – 18 сентября 2015 г.)

16–18 сентября 2015 года в Казанском научном центре РАН проводится II Российская конференция «Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии». Она посвящена как новейшим достижениям в области молекулярной биологии и биохимии, касающимся нестабильности генома, механизмов функционирования белков и пептидов, взаимодействия сигнальных систем,

молекулярных механизмов адаптации микроорганизмов и растений, так и историческим аспектам развития биохимии и молекулярной биологии. Мероприятие приурочено к 70-летию Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН.

На конференции с докладами выступят ученые, начинавшие свой путь в Казанском институте биохимии и биофизики, а в настоящее время работающие в крупных зарубежных научных центрах: Ю.Д. Фельдман (Иерусалимский университет, Израиль), И.В. Несмелова (Университет Северной Каролины, США), Р.Г. Киямова (Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев), К.Х. Ким (Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург).

Контакты:

420111, г. Казань, ул. Лобачевского, 2/31.

Тел. (843) 2927347, 2319027.

Факс: (843) 2927347.

<http://www.kibb.knc.ru>

О проведении IX Международной конференции «Биоантиоксидант» (Москва, 29 сентября – 2 октября 2015 г.)

29 сентября – 2 октября 2015 года в Москве на базе Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН и Института химической физики им. Н.Н. Семенова РАН пройдет IX Международная конференция «Биоантиоксидант», посвященная 100-летию со дня рождения академика Н.М. Эмануэля. На конференции будут обсуждены фундаментальные и прикладные проблемы органической, биологической, физической и медицинской химии процессов окисления биоорганических соединений молекулярным кислородом и действия антиоксидантов.

Основные направления конференции:

1. Синтетические, природные и гибридные антиоксиданты: синтез, выделение, физико-химические свойства.
2. Особенности биологической активности антиоксидантов в широком диапазоне доз.
3. Окислительный стресс и антиоксиданты.
4. Медицинские аспекты применения антиоксидантов.
5. Антиоксиданты в сельском хозяйстве (антимутагенез).

6. Пищевые добавки и регуляция окислительных процессов.

В рамках конференции будут проведены VII школа по проблеме «Окисление, окислительный стресс и антиоксиданты» и конкурс устных и стендовых докладов молодых ученых.

В рамках конференции 1 октября состоятся IV Эмануэлевские чтения и вручение медалей «Памяти академика Н.М. Эмануэля» за достижения в области химической и биохимической физики.

Контакты:

Тел. 8 (499) 137-31-27, 8 (495) 939-71-86.

E-mail: seren@sky.chph.ras.ru.

Web-сайт: <http://sky1.chph.ras.ru/>

О проведении VIII Всероссийской научной конференции с международным участием «Современные направления биохимии человека» (Санкт-Петербург, 3–5 декабря 2015 г.)

3–5 декабря 2015 г. в Санкт-Петербурге будет проведена VIII Всероссийская научная конференция

с международным участием «Современные направления биохимии человека». Организатор конференции: Отдел биохимии Научно-исследовательского центра Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова.

Научная программа конференции включает в себя два симпозиума:

- «Метаболические и белковые маркеры: от единичных показателей к метаболомному и протеомному профилированию».
- «Методические аспекты, патогенетическая роль и диагностическое значение определения концентрации гомоаргинина».

Состоится конкурс докладов среди молодых ученых в рамках заседания секции «Клиническая биохимия» VI Международного молодежного медицинского конгресса «Санкт-Петербургские научные чтения-2015».

Контакты:

Тел.: (812) 338 71 08

E-mail: subbotina2002@mail.ru

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 рубрикаций, 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 правила.

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.
13. Имеется электронный архив журнала на сайте Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (www.biorosinfo.ru).



Подписано к печати 30.03.15
Формат 60/90¹/₈. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 4,0. Тираж 1000 экз.

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

ОБЩЕСТВО БИОТЕХНОЛОГОВ РОССИИ ИМ. Ю.А. ОВЧИННИКОВА

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

Главными целями деятельности ОБР являются:

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

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

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

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

ОБР является членом Европейской федерации биотехнологии.

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

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

Членство в ОБР является бесплатным для физических лиц.

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

Тел.: +7 (495) 648-09-13

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