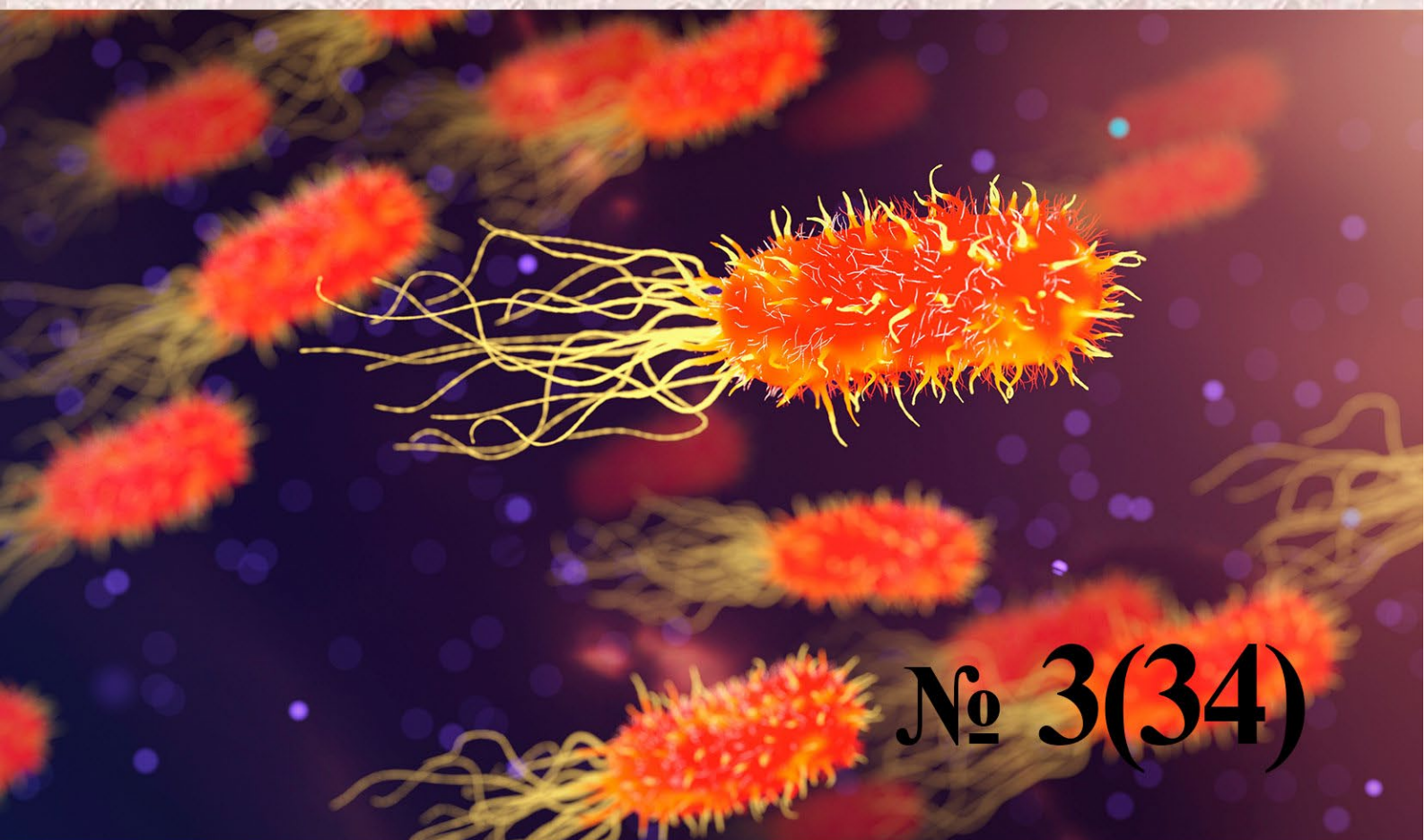


16+

ISSN 2304-4691

Актуальная биотехнология



№ 3(34)

2020

ISSN 2304-4691

**Основан в 2012г.
г. Воронеж**

Актуальная биотехнология

№ 1 (35)

2021

16+

Учредитель ООО «Биоактуаль»

Главный редактор

д.б.н., профессор О.С. Корнеева

Редакционный совет

д.б.н., профессор Ф.К. Алимова

д.т.н., профессор В.В. Бирюков

д.т.н., профессор Л.А. Иванова

д.б.н., профессор Л.П. Лазурина

д.б.н., профессор Е.Г. Новосёлова

д.х.н., профессор Т.В. Овчинникова

д.т.н., профессор А.Н. Остриков

д.б.н., профессор В.Н. Попов

д.т.н., Член-Корр. РАСХН Л.В. Римарева

Ответственный редактор

к.т.н. А.А. Дерканосова

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций:

Свидетельство о регистрации ПИ № ФС77-62393 от 14 июля 2015 г.

Журнал «Актуальная биотехнология» выходит 4 раза в год

Подписной индекс издания в агентстве «Роспечать» 58012

По каталогу «Издания органов научно-технической информации» физические и юридические лица могут оформить подписку во всех отделениях почтовой связи Российской Федерации и странах СНГ и Балтии.

Адрес редакции и издательства

394026, г. Воронеж, пр-т Труда, д. 48, корп. 4, оф. 11

Отпечано в типографии ООО Фирма «Элист»

Адрес типографии

394000, г. Воронеж, ул. Никитинская, 11

E-mail: actbio@mail.ru

Сдано в набор 14.09.2020. Подписано в печать 22.09.2021.

Дата выхода в свет: 26.09.2021

Усл. печ. л. 4,6. Тираж 1500 экз. Заказ 50

Цена – свободная.

Содержание

МАТЕРИАЛЫ VII МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ «БИОТЕХНОЛОГИЯ: НАУКА И ПРАКТИКА»

СЕКЦИЯ 1. ПИЩЕВАЯ, СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ И ЛЕСНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

РОЛЬ АЦК ДЕЗАМИНАЗЫ РИЗОБАКТЕРИЙ В ФОРМИРОВАНИИ АРХИТЕКТУРЫ КОРНЕВОЙ СИСТЕМЫ И КОРНЕВЫХ ВОЛОСКОВ У ТОМАТОВ	
Д.С. Сырова, П.С. Ульянич, А.И. Шапошников, А.А. Белимов	12
РАЗРАБОТКА КОМПЛЕКСНОЙ ТЕХНОЛОГИИ УСКОРЕННОЙ СЕЛЕКЦИИ РИСА НА ДЛИТЕЛЬНУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ К ПИРИКУЛЯРИОЗУ	
Е.Г. Савенко, Ж.М. Мухина, В.А. Глазырина, Л.А. Шундрин	14
РАЗРАБОТКА ИММУНОАНАЛИЗА ПОЛИМИКСИНОВ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И ЛЕКАРСТВЕННОГО МОНИТОРИНГА	
И.А. Гальвидис, К.М. Буркин, Ю.А. Суровой, М.А. Буркин	15
ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БЕЛКОВЫХ ВЕЩЕСТВ ФАСОЛИ НА АМИЛАЗЫ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ	
В.А. Базулева, Е.А. Прутенская, М.Г. Сульман	19
ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ТЕРМОИНАКТИВАЦИИ ОКСИДАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ ИЗ ДРОЖЖЕЙ <i>Ogataeapara polymorpha</i> DL1	
Д.Л. Атрошенко, М.Д. Шеломов, Ю.А. Ушакова, С.С. Савин, В.И. Тишков	22
ПОИСК И КОЛОКАЛИЗАЦИЯ САТЕЛЛИТНЫХ ПОВТОРОВ В <i>SHEPHERDIA ARGENTEA</i> (PURSH) NUTT	
К.Д. Боне, О.В. Разумова, И.В. Киров, Г.И. Карлов	23
ЭЛЕМЕНТНЫЙ СТАТУС МОЛОКА КОРОВ В СЕЗОННОЙ ДИНАМИКЕ	
О.А. Воронина, С.Ю. Зайцев	24
БИОТЕХНОЛОГИЯ ТВОРОЖНОГО ПРОДУКТА	
О.И. Долматова	26
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ КОНЦЕНТРАТОВ ПИЩЕВЫХ ВОЛОКОН, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ОВОЩНЫХ СОКОВ	
М.А. Кожухова, Р.А. Дроздов, А.А. Кушнерова, Т.В. Бархатова, Т.А. Дроздова	27
РАСТИТЕЛЬНО-БАКТЕРИАЛЬНЫЕ АССОЦИАЦИИ В УСЛОВИЯХ <i>IN VITRO</i> И <i>EX VITRO</i> : ЭФФЕКТ КОИНОКУЛЯЦИИ	
Н.В. Евсеева, К.Ю. Каргаполова, О.В. Ткаченко, Г.Л. Бурягин	31
ИЗУЧЕНИЕ ВИДОВОГО СОСТАВА АКТИВНОГО ИЛА В ПРОЦЕССЕ АДАПТАЦИИ К СТОЧНЫМ ВОДАМ КОНДИТЕРСКОЙ ФАБРИКИ	
О.С. Корнеева, Э.А. Борисова, Т.В. Свиридова, Г.П. Шуваева, О.Л. Мещерякова	32
ДИАГНОСТИКА ВОЗБУДИТЕЛЯ СОСУДИСТОГО БАКТЕРИОЗА КРЕСТОЦВЕТНЫХ МЕТОДОМ ДОТ-ИММУНОАНАЛИЗА	
М.А. Кузнецов, А.А. Щербаков, С.В. Ивашенко, О.С. Ларионова, М.Н. Киреев	33
РАЗРАБОТКА КОРМОВЫХ ДОБАВОК НА ОСНОВЕ ТРАНСФОРМАЦИИ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ ГРИБАМИ-БАЗИДИОМИЦЕТАМИ	
А.В. Кураков, А.В. Барков, С.А. Кулачкова, А.В. Шнырева, Е.Ю. Кожевникова, Е.Г. Кондратьева, В.А. Терехова, В.С. Садыкова	36
ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА СУБД ДЛЯ ОПИСАНИЯ МАССИВА ДАННЫХ О СВОЙСТВАХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И СЫРЬЯ	
О.Н. Мусина, Е.М. Нагорных	40
ПРИМЕНЕНИЕ БИОФАРАМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ДЕСЕНСИБИЛИЗАЦИИ ПРИ ЛЕЧЕНИИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ	
А.В. Печерский, В.И. Печерский, В.Н. Вильянинов, О.В. Печерская, В.Ф. Семиглазов	44
АНТИВИРУСНЫЕ БИОГЕЛИ ВИТАЛЬГАР ИЗ ВОДОРΟΣЛЕЙ СЕМЕЙСТВА <i>LAMINARIACEAE</i>	
А.В. Подкорытова, Л.Х. Котельникова, И.А. Шашкина	45
ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТИВНОСТИ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА ДОМАШНЕЙ КОРОВЫ В НАПРАВЛЕНИИ НОКАУТА ГЕНА β -ЛАКТОГЛОБУЛИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9	
Г.Н. Сингина, П.В. Сергиев, М.П. Рубцова, Н.В. Равин, А.В. Лопухов, Т.А. Ворожбит, Е.Н. Шедова	49
ТЕСТ-РЕАКЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ИЗВЕСТКОВАНИЕ КИСЛЫХ ПОЧВ	
Е.А. Прищепенко, И.А. Дегтярева	50
АНАЛИЗ РЕПИТОМА ВЫЯВИЛ ЦЕНТРОМЕРНЫЙ ПОВТОР <i>CANNABIS SATIVA</i>	
О.В. Разумова, С.Р. Прокопчук, К.Д. Боне, Ю.В. Бочаркина, Д.В. Романов, Г.И. Карлов	53
РАЗРАБОТКА РЕЦЕПТУР МУЧНЫХ КОНДИТЕРСКИХ ИЗДЕЛИЙ СО СНИЖЕННОЙ САХАРОЕМКОСТЬЮ	
И.М. Святославова, Ю.Ю. Усанова, А.К. Реганян	54
РОЛЬ TRF-ПОДОБНЫХ БЕЛКОВ В РЕГУЛЯЦИИ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР У <i>PHYSCOMITRELLA PATENS</i>	
А.В. Санникова, Л.Р. Валеева, М.Р. Шарипова, Е.В. Шакиров	55
ПОДБОР ЗАКВАСОЧНЫХ КУЛЬТУР ДЛЯ ЙОГУРТОВ С ПОВЫШЕННОЙ ПРОБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ	
Д.В. Ключникова, К.Н. Суханова, Д.И. Борисова, А.Р. Пименова	56

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭКСТРАКЦИИ ПЕКТИНА ИЗ ОТХОДОВ ПЕРЕРАБОТКИ ЯБЛОК ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ И НЕИОНОГЕННЫХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ Л.Н. Скрыпник, А.Е. Новикова	57
БАКТЕРИИ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ УРОЖАЙНОСТИ СОИ И.Э. Смирнова, А.К. Саданов	61
РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ЙОГУРТНОГО ПРОДУКТА С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ Е.А. Пожидаева, Л.В. Голубева, Я.А. Дымовских, Е.С. Попов	65
БИОЛОГИЧЕСКИЙ СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ ВСХОЖЕСТИ КОРМО-БОБОВЫХ КУЛЬТУР И.Э. Смирнова, А.К. Саданов	67
ОСОБЕННОСТИ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ ЛАВАНДЫ УЗКОЛИСТНОЙ В.С. Власова, Н.А. Егорова, Л.А. Хасанова, З.М. Хасанова	71
ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОРОЩЕННОЙ ЧЕЧЕВИЦЫ В ТЕХНОЛОГИИ БЕЛКОВЫХ ПРОДУКТОВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ Л.В. Антипова, А.О. Дарьин	72
КОМПЛЕКСЫ СУКЦИНИЛИРОВАННОГО ХИТОЗАНА С ПЕПТИДАМИ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ МОЛОКА Т.Н. Головач, В.П. Курченко, Р.В. Романович, М.П. Бондаренко, Е.И. Тарун	74
КОНЦЕПЦИЯ СНИЖЕНИЯ АЛЛЕРГЕННОСТИ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ Е.И. Мельникова, Е.В. Богданова	78
ВЫРАЩИВАНИЕ ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МУЛЬТИЭНЗИМНОЙ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ К.С. Нечитайло, Е.А. Сизова	79
ВЛИЯНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ НА ВЫХОД СПИРТА И ОБРАЗОВАНИЕ ПОБОЧНЫХ ПРОДУКТОВ С.Ф. Яковлева, А.Н. Яковлев, Е.А. Мотина, Т.Н. Тертычная	82
ВЛИЯНИЕ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА ФИТАЗЫ НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ДРОЖЖЕЙ <i>S. CEREVISIAE</i> В ПРОИЗВОДСТВЕ СПИРТА Т.С. Ковалева, А.Н. Яковлев, Г.В. Агафонов, С.Ф. Яковлева	83
ВЛИЯНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ РЕЖИМОВ НА КОНЦЕНТРАЦИЮ СУХИХ ВЕЩЕСТВ В ПРОЦЕССЕ ВОДНО-ТЕПЛОВОЙ ОБРАБОТКИ ЗЕРНОВОГО СЫРЬЯ С.Ф. Яковлева, А.Н. Яковлев, Т.С. Ковалева, О.С. Корнеева	84
ПЕРСПЕКТИВЫ РАСШИРЕНИЯ АССОРТИМЕНТА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ ЗА СЧЕТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОДУКЦИИ КРОЛИКОВОДСТВА Л.В. Антипова, М.С. Болдырева	85
ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ ПРОТОПЛАСТОВ РАПСА СОРТА АНТАРЕС Ц.С. Гарибян, З.С. Константинов, Е.В. Захарова	86
ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА СЕМЕЙСТВА ГЕНОВ MADS-BOX ПЕРЦА <i>Capsicum annum L.</i> А.В. Нежданова, А.М. Камнионская, А.В. Щенникова	87
ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ ВЫХОДА БИОМАССЫ СИЛИКАТНЫХ БАКТЕРИЙ Л.А. Улаханова, С.В. Гомбоева, Н.С. Балдаев, В.Ж. Цыренов	91
СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ НОКАУТОВ ПО ГЕНАМИ РАВ-ГЕРАНИЛГЕРАНИЛТРАНСФЕРАЗЫ У РАСТЕНИЙ <i>MARCHANTIA POLYMORPHA</i> М.С. Кулаженко, Л.Р. Валеева	92
ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА АДАПТОГЕННЫХ СВОЙСТВ ФИТОЭКДИСТЕРОИД СОДЕРЖАЩИХ ЭКСТРАКТОВ ИЗ ЗЕРЕН КИНОА В.А. Шипелин, Н.А. Петров, С.Н. Зорин, В.К. Мазо, Ю.С. Сидорова	93
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СУХОГО ПЕРЕМЕАТА В БИОСИНТЕЗЕ КОРМОВОГО БЕЛКА И.С. Полянская, Г.О. Катаранов, Е.Н. Закрепина	98
ОЦЕНКА БИОГЕННОСТИ И ТОКСИЧНОСТИ ЭЛЕМЕНТОВ В ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ГИДРОХИМИИ И.С. Полянская	99
СУБСТРАТНОЕ СТИМУЛИРОВАНИЕ РАІ, КАК ПОДХОД К ПОЛУЧЕНИЮ ВЫСОКОЛИГНИФИЦИРОВАННОГО СЫРЬЯ ИЗ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ (<i>TRITICUM AESTIVUM L.</i>) П.В. Федораев, А.В. Рябова, А.В. Пунгин, Э.В. Токупова, Л.Н. Скрыпник	101
ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ Н.А. Фокина, Н.Ю. Селиванов*, Г.Т. Урядова, Л.В. Карпунина	105
КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ И ИОННЫЙ ОБМЕН В СИСТЕМЕ ГЛУТАМИНОВАЯ КИСЛОТА – ИОН МЕТАЛЛА – ИМИНОКАРБОКСИЛЬНЫЙ ИОНИТ А.В. Астапов, Ю.С. Перегудов, Л.П. Бондарева, П.А. Поздняков	106
ТЕХНОЛОГИЯ КОМПЛЕКСНОЙ УТИЛИЗАЦИИ ОТХОДОВ ПЕРЕРАБОТКИ БОБОВЫХ КУЛЬТУР С ПОЛУЧЕНИЕМ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ И БИОТОПЛИВА Е.В. Ожимкова, М.Г. Сульман	107
БИОТЕХНОЛОГИЯ КЕФИРНОГО ПРОДУКТА О.И. Долматова	108
ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РОСТСТИМУЛИРУЮЩИХ РИЗОБАКТЕРИЙ <i>PAENIBACILLUS POLYMYXA</i> В СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ И.В. Егоренкова	109
ТЕНЗИОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД АНАЛИЗА БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ ЖИВОТНЫХ: НАУКА И ПРАКТИКА С.Ю. Зайцев, О.А. Воронина, С.Л. Белоухов	110

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ МОЛОКА КАК БИОМАРКЕРОВ ПРИ КОНТРОЛЕ СОСТАВА МОЛОЧНЫХ И МЯСНЫХ ПРОДУКТОВ	
Е.А. Зверева, Н.И. Смирнова, О.Д. Гендриксон, А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев.....	111
ПРИМЕНЕНИЕ SWOT-АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНКУРЕНТОСПОСОБНОСТИ ПРОДУКЦИИ НА ПРЕДПРИЯТИИ ХЛЕБОПЕКАРНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ	
И.С. Косенко	112
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОДУЛИРОВАННЫХ УЛЬТРАЗВУКОВЫХ ВОЛН В ПРОЦЕССЕ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕЙКОЦИТАРНОГО ИНТЕРФЕРОНА	
А.А. Олешкевич	116
БИОТЕХНОЛОГИЯ ОТДЕЛЬНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА <i>THYMUS L.</i>	
Л.А. Хасанова, З.Н. Сулейманова, В.В. Назаров, Р.З. Нуриманов, Б.Ж. Баймурзина, Л.А. Сулейманова, З.М. Хасанова	117
РАЗРАБОТКА НАПИТКОВ НА ОСНОВЕ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ	
Л.А. Хасанова, З.М. Хасанова, З.Н. Сулейманова, В.В. Назаров, Б.Ж. Баймурзина, Р.З. Нуриманов, А.В. Миронова, Л.А. Сулейманова, Э.Ю. Страхова, Р.З. Тагиров, О.В. Топорков, З.Ю. Ибрагимова, Э.В. Ялазюк.....	119
МЕТИЛОТРОФНЫЕ ДРОЖЖИ КАК ФИТОСИМБИОНТЫ	
Е.Н. Капаруллини, Н.В. Агафонова, Н.В. Дороница	120
ВОДНЫЕ БИОРЕСУРСЫ, КАК ПЕРСПЕКТИВНОЕ СЫРЬЕ ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ГЕРОДИЕТИЧЕСКИХ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ	
Л.Х. Котельникова, Е.А. Сухова.....	121
ИССЛЕДОВАНИЕ СЛОЖНЫХ КИНЕТИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ В ЗЕРНЕ ТРИТИКАЛЕ СОРТА ГОРКА МЕТОДОМ ТЕРМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА	
Т.Н. Тертычная, И.В. Кузнецова, А.В. Дранников, А.А. Шевцов, Н.В. Засыпкин.....	124
ПОВЫШЕНИЕ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КАЛЛУСОВ ПШЕНИЦЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ РИЗОБАКТЕРИЙ	
О.В. Ткаченко, Н.В. Евсеева, Г.Л. Бурягин, Ю.П. Федоненко, Ю.В. Лобачев	125
СЕКЦИЯ 2. МЕДИЦИНСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ И БИОФАРМАЦЕВТИКА	126
EFFECTS OF RUMEX TIANSHANICUS LOSINSK EXTRACT ON GI TRACT AND HEMATOLOGICAL INDICATORS IN EXPERIMENTAL GASTRITIS	
D.M. Yergozova, I.B. Ginayatova, A.K. Shokan, N.O. Kudrina, T.Y. Kulmanov	127
ИНГИБИРОВАНИЕ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ SET7/9 ПОВЫШАЕТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ РАКОВЫХ КЛЕТОК К ГЕНОТОКСИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ	
А.А. Дакс, О.Ю. Шувалов, О.А. Федорова, А.В. Петухов, Н.А. Барлев	128
ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ СВЕРХКРИТИЧЕСКОЙ ЭКСТРАКЦИЕЙ	
Н.В. Меньшуткина, И.В. Казеев, А.И. Артемьев, П.А. Флегонтов, Р.Р. Дашкин	129
УСКОРЕННЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУБСТРАТНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ DNTP С ДНК-ПОЛИМЕРАЗАМИ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В SELEX	
С.А. Лапа, О.С. Волкова, С.В. Вишнякова, В.Е. Шершов, А.В. Чудинов.....	132
РАЗРАБОТКА ТРЕНАЖЕРА ВИРТУАЛЬНОЙ РЕАЛЬНОСТИ ДЛЯ СОВРЕМЕННОГО БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА	
С.Г. Литвинцев, Е.А. Мартинсон	133
УПРАВЛЕНИЕ ПРОФИЛЕМ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ДОКСОРУБИЦИНА ИЗ НАНОРАЗМЕРНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ НА ОСНОВЕ СОПОЛИМЕРА МОЛОЧНОЙ И ГЛИКОЛЕВОЙ КИСЛОТ (PLGA)	
Ю.В. Ермоленко, Н.А. Назарова, Н.С. Осипова, Т.С. Ковшова, С.Э. Гельперина.....	134
РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ПОДХОДА, ОСНОВАННОГО НА ОБНАРУЖЕНИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКЕ САЙТОВ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ВЭЖХ-МС/МС В БЕЛКОВЫХ КОМПОНЕНТАХ ПЛАЗМЫ КРОВИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ УПРОЩЕННОЙ ОДНОСТАДИЙНОЙ МЕТОДИКИ ПРОБОПОДГОТОВКИ	
В.С. Иванов, А.Д. Васильева, Д.Ю. Азарова, А.С. Кононихин, М.А. Розенфельд	139
ДИНАМИКА АНТИТЕЛОБРАЗОВАНИЯ И ИЗОТИПЫ АНТИТЕЛ В ИММУННОМ ОТВЕТЕ МЫШЕЙ BALB/C НА S БЕЛОК ВИРУСА SARS-COV-2	
В.Ю. Кан, А.Д. Бидина, А.Т. Ожаровская, Д.В. Воронина, О.В. Зубкова	140
ПОЛУЧЕНИЕ НАНОРАЗМЕРНЫХ СИСТЕМ ДЛЯ СО-ДОСТАВКИ ПАКЛИТАКСЕЛА И ПРОИЗВОДНОГО ЭТОПОЗИДА НА ОСНОВЕ АЛЬБУМИНА И СОПОЛИМЕРОВ МОЛОЧНОЙ И ГЛИКОЛЕВОЙ КИСЛОТ И СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИХ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НА ЛИНИИ КЛЕТОК МЫШИНОЙ ГЛИОМЫ GL261	
Т.С. Ковшова, С.А. Бойко, Ю.А. Малиновская, М.А. Меркулова, С.Э. Гельперина	141
РАЗРАБОТКА МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ОТ-ПЦР В ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ФАЗЕ ДЛЯ УСКОРЕННОГО ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ПНЕВМОНИИ	
С.А. Лапа, Е.С. Клочихина, А.А. Топилина, Р.А. Мифтахов, А.В. Чудинов.....	146
ВЛИЯНИЕ ПРИЕМА ПИЩИ, БОГАЩЕННОЙ МАСЛЯНЫМ ЭКСТРАКТОМ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ РАЗЛИЧНЫХ ТАКСОНОВ НА МАССУ ТЕЛА И УРОВНИ САХАРА В КРОВИ У МЫШЕЙ-SAMOK C57BL6	
А.П. Лыков, И.П. Уваров, Р.Г. Геворгиз, С.Н. Железнова	148
МОДЕЛЬ ДРОЖЖЕЙ <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ЧЕЛОВЕКА	151
В.С. Павлов, А.А. Ильина, Д.С. Спасская, Д.С. Карпов, А.В. Кудрявцева	151
ФОРМИРОВАНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ, ВОССТАНОВЛЕНИЕ РЕГЕНЕРАЦИИ И ПРОФИЛАКТИКА ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У ЛЮДЕЙ СТАРШЕ 40 ЛЕТ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	
А.В. Печерский, В.И. Печерский, А.Б. Смолянинов, В.Н. Вильянинов, Ш.Ф. Адылов, А.Ю. Шмелёв, О.В. Печерская, В.Ф. Семиглазов	152
ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА AGT MET235TNR У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ С ОЖИРЕНИЕМ, ПРОЖИВАЮЩИХ В РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ	
Абд Али Алаа Хашим; О.В. Бочарова; Е.Д. Теплякова; Т.П. Шкурят; Г.В. Карантыш	153

БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЕ ДНК-ИММУНОГЕНА НА ОСНОВЕ ГЕНОВ КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2	
А.А. Рябенкова, Е.Р. Чирак, Е.Л. Чирак, Н.Н. Колмаков, И.В. Духовлинов	154
РАЗРАБОТКА И ПОЛУЧЕНИЕ ДНК-ИММУНОГЕНА НА ОСНОВЕ ГЕНОВ SARS-COV-2	
А.А. Рябенкова, Е.Р. Чирак, Е.Л. Чирак, Н.Н. Колмаков, И.В. Духовлинов	157
ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ IgY-ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ HBsAg	
В.Б. Сбойчаков, С.В. Борисенко, А.М. Сокурова	160
НАКОПЛЕНИЕ БИОМАССЫ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ НА РАЗЛИЧНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ	
А.В. Солдатенкова, С.А. Лазарев, Н.А. Михайлова	164
ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СТРУКТУРНОЙ АДАПТАЦИИ БЕЛКОВ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА (НА ПРИМЕРЕ ФИБРИНОГЕНА, КОАГУЛЯЦИОННОГО ФАКТОРА XIII И ПЛАЗМИН(ОГЕН)А)	
Л.В. Юрина, А.Д. Васильева, В.С. Иванов, М.И. Индейкина, М.А. Розенфельд	165
ЕЗ-УБИКВИТИНЛИГАЗА R19N2 ВЛИЯЕТ НА УРОВЕНЬ АУТОФАГИИ В КЛЕТКАХ РАКА ЛЕГКОГО	
О.А. Федорова, А.И. Гудович, А.А. Дакс, О.Ю. Шувалов, А.В. Петухов, Е.В. Байдюк, Н.А. Барлев	166
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КОМПЛЕКСОВ β - И γ -ЦИКЛОДЕКСТРИНА С ГИДРОЛИЗАТОМ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ МОЛОКА НА ТЕСТ-ОБЪЕКТЕ <i>TETRAHYMENA PYRIFORMIS</i>	
Т.Н. Головач, В.Г. Цыганков, А.М.Бондарук, Л.Н. Журихина, В.П.Курченко	167
МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И ПОЛИВИНИЛОВОГО СПИРТА ДЛЯ МЕДИЦИНЫ	
Е.К. Мохова, Е.А. Соколова, М.Г. Гордиенко, Е.В. Мищенко, С.В. Каленов	170
ИЗМЕНЕНИЕ БАЛАНСА СТАБИЛЬНЫХ ИЗОТОПОВ ВОДОРОДА В ОРГАНИЗМЕ КАК ФАКТОР АКТИВАЦИИ ФУНКЦИИ ЦИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	
Н.В. Яглова, С.С. Обернихин, Е.П. Тимохина, В.В. Яглов	171
СРАВНЕНИЕ ПРОТИВОПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ОЧИЩЕННОГО ЭКДИСТЕРОНА С ЭКСТРАКТАМИ ЕГО ОСНОВНЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ	
Ю.Н. Кирдеева, Н.П. Тимофеев, Н.А. Барлев, О.Ю. Шувалов	173
ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ Фуллеренов в эксперименте	
К.С. Эльбекьян, А.А. Комарова, О.А. Дюдюн, З.Х. Султыгова, Р.Д. Арчакова, О.А. Яндиев	174
ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА ГИМНЕМЫ ЛЕСНОЙ НА ПОКАЗАТЕЛИ УГЛЕВОДНОГО И ЛИПИДНОГО ОБМЕНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ	
К.С. Эльбекьян, А.Б. Муравьева, Е.В. Маркарова, О.А. Дюдюн	175
ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ ДЛЯ БИОМЕДИЦИНЫ	
С.Н. Тиморшина, Е.А. Ганецкая, А.А. Осмоловский	176
ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОДЛИННОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КР-СПЕКТРОСКОПИИ	
А.Ю. Хрущев, Кис И.В., С.В. Антонова, В.Б. Муравьева, О.А. Махлис, Н.И. Соболева	178
ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ БЕЛКОВ-ОНКОМАРКЕРОВ MIA И СУРВИВИН БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМ МИКРОАНАЛИЗОМ	
Е.Е. Башмакова, А.Н. Кудрявцев, Н.С. Панамарев, Л.А. Франк	179
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БЛОКИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ БУФЕРОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ТИТРА АНТИТЕЛ К ВИРУСУ SARS-COV-2 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ МЫШЕЙ	
А.Д. Бидина, В.Ю. Кан, П.М. Петрова, Д.Е. Зрелкин, Д.В. Воронина	181
ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ФЛАГЕЛЛИНА <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	
А.П. Жеребцов, А.А. Калошин, Н.А. Михайлова	182
БИОЦИДНЫЕ СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ СУЛЬФИДА КАДМИЯ, ПОЛУЧЕННЫХ МИКРОБНЫМ СИНТЕЗОМ	
О.А. Журавлева, В.С. Кулигин, Т.А. Воейкова, В.Г. Дебабов	183
ЗАЩИТНЫЕ СВОЙСТВА ГИБРИДНЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ OPRF-ATOX И OPRF-ATOX-OPRI <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДОЗ ВВЕДЕНИЯ И СООТНОШЕНИЯ С АДЬЮВАНТОМ	
Н.А. Михайлова, А.А. Калошин, Е.М. Ганковская	184
БИОТЕХНОЛОГИЯ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ <i>LUDISIA DISCOLOR</i> (KER GAWL.) A. RICH	
В.В. Назаров, Е.Ю. Семёнова, В.О. Климентова, Л.А. Хасанова, Р.З. Нуриманов, З.М. Хасанова	185
ПОЛУЧЕНИЕ ЛИНИЙ ГРИБА <i>CLAVICEPS PURPUREA</i> (FRIES) TULASNE СО СПОСОБНОСТЬЮ К БИОСИНТЕЗУ ЭРГОТАМИНА В САПРОФИТНОЙ КУЛЬТУРЕ МЕТОДОМ УФ-МУТАГЕНЕЗА	
П.С. Савин, Р.И. Бобылева	190

СЕКЦИЯ 3. ЭКОЛОГИЯ, БИОЭНЕРГЕТИКА И БИОГЕОТЕХНОЛОГИЯ

СОВРЕМЕННЫЕ СТРАТЕГИИ РАЗРАБОТКИ БИОЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ СИСТЕМ	
О.Н. Понаморева, В.А. Алферов	192
ОСОБЕННОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ОКСИДОРЕДУКТАЗ В ПРОЦЕССАХ ОБЕЗВРЕЖИВАНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ	
Б.Б. Тихонов, П.Ю. Стадольникова, А.И. Сидоров, М.Г. Сульман	197
РОЛЬ НАКОПЛЕНИЯ ПРОЛИНА И МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА В ОТВЕТ НА ТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ZNO-НАНО У <i>HORDEUM SATIVUM DISTICHUM</i>	
М.С. Волошина, Е.М. Вечканов, Т.М. Минкина, А.А. Плотников, С.С. Манджиева, ...	201
РАЗРАБОТКА БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА	
В.А. Алферов, В.А. Арляпов, А.Н. Решетиллов	204
ВЛИЯНИЕ БИОЧАРА ИЗ ОТХОДОВ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА НА ИЗМЕНЕНИЕ pH ПОЧВЫ ПРИ ПОГЛОЩЕНИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ	
М.В. Бурачевская, Т.М. Минкина, Т.В. Бауэр, И.П. Лобзенко, В.И. Северина	208

РАЗРАБОТКА БПК-БИОСЕНСОРА НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК <i>SACCHAROMYCES CEREVISIE</i> , ИММОБИЛИЗОВАННЫХ В ЗОЛЬ-ГЕЛЬ МАТРИЦУ ДЛЯ АНАЛИЗА СТЕПЕНИ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ О.А. Каманина, Е.А. Ланцова, М.С. Тимошина	211
АГГЛЮТИНИРУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ КУЛЬТУР АКТИВНОГО ИЛА С.В. Клементьев, А.В. Кобелев, А.С. Сироткин	212
МЕХАНИЗМЫ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ И ТРАНСФОРМАЦИИ НАНО- И МАКРОФОРМ Cu В РАСТЕНИЯХ <i>HORDEUM SATIVUM</i> С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНХРОТРОННЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ Т.М. Минкина, Д.Г. Невидомская, В.А. Шуваева, В.С. Цицашвили, М.Н. Бурачевская	213
ЭКОЛОГО-ТРОФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МИКОБИОТЫ ГОРОДОВ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН М.В. Петрова	216
ДИНАМИКА ТУРГОРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ЛИСТЬЕВ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ КРАТКОВРЕМЕННОЙ ЗАСУХИ Н.В. Будаговская	219
СОДЕРЖАНИЕ И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ Zn В РАСТЕНИЯХ-МАКРОФИТАХ РАЗЛИЧНЫХ СЕМЕЙСТВ НА ТЕРРИТОРИИ УСТЬЕВОЙ ОБЛАСТИ РЕКИ ДОН В.А. Чаплыгин, Ю.А. Литвинов, Д.Г. Невидомская, Н.П. Черникова, Т.М. Минкина	220
КИНЕТИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ФОРМИРОВАНИЮ ДВУХМЕДИАТОРНЫХ СИСТЕМ ДЛЯ СОЗДАНИЯ МИКРОБНЫХ БИОСЕНСОРОВ НА ПРИМЕРЕ ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗА ИНДЕКСА БИОХИМИЧЕСКОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА В.А. Арлянов, А.С. Харькова, А.С. Илюхина	224
ОЦЕНКА ФОСФОРНОЙ НАГРУЗКИ ДЛЯ СУБЪЕКТОВ РФ С УЧЁТОМ ИНТЕНСИФИКАЦИИ ПРОИЗВОДСТВА ФОСФОРНЫХ УДОБРЕНИЙ Е.Г. Васильева, К.В. Пищяева, А.С. Макарова	229
ПРИМЕНЕНИЕ ЭЛЕКТРОПРОВОДЯЩИХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ ПРОЦЕССА АНАЭРОБНОЙ ПЕРЕРАБОТКИ НАВОЗНОГО СТОКА СВИНОКОМПЛЕКСА Е.А. Журавлева, С.В. Шехурдина, Ю.В. Литти	230
ОБЕСЦВЕЧИВАНИЕ КРАСИТЕЛЕЙ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО И БРИЛЛИАНТОВОГО ЗЕЛЕНОГО КАК МОДЕЛЬ ФОТОКАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БИОГЕННЫХ НАНОЧАСТИЦ В.С. Кулигин, О.А. Журавлева, Т.А. Воейкова, В.Г. Дебабов	231
ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТА МЕТАНОЛДЕГИДРОГЕНАЗЫ МЕТИЛОБАКТЕРИЙ В БИОЭЛЕКТРОКАТАЛИЗЕ Т.А. Карасева	232
ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА АКТИВНОСТЬ РАБОТЫ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ФЕРМЕНТНЫХ ЭЛЕКТРОДОВ Н.В. Лакина, В.Ю. Долуда, В.Г. Матвеева, А.И. Сидоров, Г.Ю. Рабинович	234
ДЕТОКСИКАЦИЯ СОЕДИНЕНИЙ ФОСФОРА, И ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИЙ ЕЁ МИКРООРГАНИЗМ А.З. Миндубаев, Э.В. Бабынин, Е.К. Бадеева, Й.А. Акосах	235
ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ В ПРОГАМНОЙ ФАЗЕ ОПЛОДОТВОРЕНИЯ У ПЕТУНИИ (<i>PETUNIA HYBRIDA</i>) Ю.В. Минкина	236

СЕКЦИЯ 4. БИОИНФОРМАТИКА И IT

МУЛЬТИГЕННЫЙ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КАРОТИНОСОДЕРЖАЩЕЙ МИКРОВОДОРОСЛИ <i>D. SALINA</i> А.О. Лантушенко, Я.В. Мегер, В.Е. Шаповалова, И.В. Дегтяр, А.Б. Боровков	238
ПРОФИЛИРОВАНИЕ ЕДИНИЧНЫХ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ КАРОТИДНОЙ ПАРААНГЛИОМЕ А.В. Снежкина, В.С. Павлов, Д.В. Калинин, Г.С. Краснов, А.В. Кудрявцева	239
СЕРИНОВЫЕ ПЕПТИДАЗЫ СЕМЕЙСТВА S1 В ГЕНОМАХ И ТРАНСКРИПТОМАХ ТЕНЕБРИОНИД – ВРЕДИТЕЛЕЙ ЗАПАСОВ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР Н.И. Жиганов, В.Ф. Терещенкова, Ali Reza Bandani, И.Ю. Филиппова, Е.Н. Эллидина	240
ОСОБЕННОСТИ ИНТЕРАКТОМА МЕЖГЕННЫХ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ ПРИ РАКЕ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА А.А. Демидова, В.П. Омелеченко, Г.В. Антоненко, В.А. Лысенко, А.С. Мелихов	241
ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ ЯДРЫШЕК НА ОСНОВЕ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ И ФОТОМЕТРИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМПЬЮТЕРНОЙ ТЕХНОЛОГИИ Б.С. Иолчиев, П.М. Кленовицкий, И.П. Новгородова, Ю.А. Прытков, Н.Ф. Хуснетдинова	243
КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ГЕМОДИНАМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ В.Г. Коршунов, Н.В. Карасенко, К.С. Караханян, Н.Г. Короткиева, И.О. Михальчик	246
КАРТИРОВАНИЕ ГЕНОМНЫХ СБОРОК АЗИАТСКОЙ ПЧЕЛЫ <i>APIS CERANA</i> М.Д. Каскинова, Л.Р. Гайфуллина, Е.С. Салтыкова, У.Б. Юнусбаев, А.Г. Николенко	248
ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ПРОФАГОВ В ГЕНОМАХ ШТАММОВ <i>BACILLUS PUMILUS</i> Д.С. Пудова, А.А. Тойменцева, М.Р. Шарипова	250
ПРИМЕНЕНИЕ БПЛА ДЛЯ ПОИСКА БРАКОНЬЕРОВ В.А. Ки-Ян-Шуй, Л.А. Коробова, И.С. Толстова	251
ВЛИЯНИЕ РЕПРОДУКТИВНОГО ФЕНОТИПА НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ПЕРИОДА КОРМЛЕНИЯ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ А.В. Рогачева, Т.П. Шкурят	254
ГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ МЕТАБОЛИЗМА МЕТАНОЛА И МЕТИЛАМИНА НОВОГО МЕТИЛОТРОФА ‘ <i>ANCYLOBACTER RADICIS</i> ’ VT Н.В. Агафонова	255
ГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ НОВОГО МЕТИЛОТРОФА ‘ <i>METHYLOLIGELLA MARIS</i> ’ GL2 Н.В. Агафонова, Е.Н. Капаруллина, Н.В. Доронина	256

СЕКЦИЯ 5. КЛЕТОЧНАЯ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

ТРАНСКРИПТОМНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КЛЕТКАХ РАКА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ siRNA ПОДАВЛЕНИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА SOX9	
Л.Г. Кондратьева, Е.П. Копанцев, И.П. Чернов	258
ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ ЭСКЕЙП-МУТАНТА РЕКОМБИНАНТНОГО ВИРУСА ВЕЗИКУЛЯРНОГО СТОМАТИТА, НЕСУЩЕГО ГЛИКОПРОТЕИН ВИРУСА ЭБОЛА	
П.П. Голдовская, И.А. Климкина, О. Попова, Т.А. Ожаровская, О.В. Зубкова	259
РАЗРАБОТКА СПОСОБА ДОСТАВКИ СИСТЕМЫ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ CRISPR/CAS9 В ЗАРОДЫШЕВЫЕ КЛЕТКИ ПЫЛЬЦЫ <i>ALLIUM CEPA</i>	
Л.И. Хрусталева, А.С. Ермолаев, М.В. Яковцева, Н.А. Кудрявцева	260
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ГОЛОВЫ И ШЕИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОПОЛИМЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ИЗ ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА	
М.С. Холина, Н.В. Белишев, А.П. Бонарцев, Д.С. Святославов, С.И. Самойлова, И.В. Решетов, К.В. Шайтан	261
РЕПЛИКАТИВНЫЕ СВОЙСТВА АДАПТАЦИОННЫХ МУТАНТОВ РЕКОМБИНАНТНОГО ВИРУСА ВЕЗИКУЛЯРНОГО СТОМАТИТА, НЕСУЩЕГО ГЛИКОПРОТЕИН ВИРУСА ЭБОЛА	
И.А. Климкина, П.П. Голдовская, О. Попова, Д.Е. Зрелкин, О.В. Зубкова	265
РЕПАРАЦИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК, ВЫЗВАННЫХ ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЕМ, У ОДНОКЛЕТОЧНОЙ ЗЕЛЕННОЙ ВОДОРОСЛИ <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>	
И.А. Сизова, И.Н. Суслова, В.И. Шалгуев, Н.Г. Соболева, В.Н. Вербенко	266
СОЗДАНИЕ КЛЕТОК С ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫМИ СЕНСОРАМИ	
О.А. Рогачевская	267
ИЗУЧЕНИЕ ПРОНИКАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ НАНОЧАСТИЦ, КОНЬЮГИРОВАННЫХ С CY3+(Cas9GFP+NLS), В ПЫЛЬЦУ ЛУКА РЕПЧАТОГО	
М. Мардини, С.Г. Монахос, К.Н. Вишняков, Н.А. Кудрявцева, Л.И. Хрусталева	268
РЕКОМБИНАНТНЫЕ БЕЛКИ РЕЦЕПТОРА ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА, ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ	
А.В. Зубков, Н.С. Кузьмина, М.А. Андреева, А.В. Сидоров, Л.Г. Бутова	269
РОЛЬ БЕЛКА ACDR В ТРАНСКРИПЦИОННОЙ РЕГУЛЯЦИИ АЦК-ДЕЗАМИНАЗЫ У <i>METHYLOBACTERIUM RADIOTOLERANS</i> JCM2831	
Г.А. Екимова	273
ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТОМАТОВ, ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ <i>pph6</i> , В БИОРЕМЕДИАЦИИ	
З.Р. Вершинина, Л.Р. Хакимова, О.В. Чубукова	274
ПОИСК ОПТИМАЛЬНОГО СИГНАЛЬНОГО ПЕПТИДА ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ СЕКРЕЦИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ФИТАЗЫ ДРОЖЖАМИ <i>RICINIA PASTORIS</i>	
Д.С. Бульмакова, А.Д. Сулейманова, М.Р. Шарипова	276
СБОРКА И РЕДАКТИРОВАНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ	
И.А. Владимиров, О.А. Павлова, И.Н. Исаева, Д.И. Богомаз	277
ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ТЕРМОИНАКТИВАЦИИ ОКСИДАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ ИЗ ДРОЖЖЕЙ <i>OGATAEA PARAPOLYMORPHA</i> DL1	
Д.Л. Атрошенко, М.Д. Шеломов, Ю.А. Ушакова, С.С. Савин, В.И. Тишков	278
ПОЛУЧЕНИЕ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ В ПОСТГЕНОМНУЮ ЭПОХУ	
В.И. Тишков, А.А. Пометун, Д.Л. Атрошенко, П.Д. Паршин, С.С. Савин	279

СЕКЦИЯ 6. ИНЖЕНЕРНЫЕ АСПЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

ТЕХНОЛОГИЯ КОМПЛЕКСНОЙ УТИЛИЗАЦИИ ОТХОДОВ ПЕРЕРАБОТКИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПРОДУКЦИИ С ПОЛУЧЕНИЕМ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ	
В.П. Молчанов, А.Д. Хамайдуга, Ю.Ю. Косивцов, Ю.В. Луговой	281
ИНЖЕНЕРНЫЕ АСПЕКТЫ СИНТЕЗА БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ	
В.В. Будаева, И.Н. Павлов, А.Е. Ситникова	282
ФЕРМЕНТЫ БИОСИНТЕЗА ОКСИЛИПИНОВ: ПОЛУЧЕНИЕ И БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА	
С.С. Горина, Л.Ш. Мухтарова, Я.Ю. Топоркова, А.Н. Гречкин	285
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СТИМУЛЯТОРОВ РОСТА ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ В БИОЛОГИЧЕСКОМ ЦИКЛЕ РЕКУЛЬТИВАЦИИ ПОЛИГОНОВ ТБО	
А.Б. Дягилева, А.И. Смирнова, Е.В. Иванова	287
БАКТЕРИИ СОДОВОГО ШЛАМОХРАНИЛИЩА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРОДУЦЕНТЫ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ С УНИКАЛЬНЫМИ СВОЙСТВАМИ	
А.Ю. Максимов, А.В. Шилова, В.В. Егорова, В.А. Щетко, Ю.Г. Максимова	291
ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ	
Ю.Г. Максимова, А.С. Зорина, Е.М. Мочалова, А.Ю. Максимов, В.А. Щетко	296
ОСОБЕННОСТИ БИОСИНТЕЗА БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ ИНДИВИДУАЛЬНЫМИ ШТАММАМИ <i>КОМАГАТАЕИВАСТЕР ХУЛИНУС</i> НА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ ИЗ ЛЕГКОВОЗОБНОВЛЯЕМОГО ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ	
Г.Ф. Миронова, Е.А. Скиба	300
РАЗРАБОТКА БИОПРЕПАРАТА ДЛЯ ДЕСТРУКЦИИ ЛИГНИНСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ	
Е.А. Мотина, С.Ф. Яковлева, Н.А. Матвиенко, Е.А. Пименова, В.В. Кутузова	304
ПОТЕНЦИАЛ ФЛАВОНОИДОВ В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ	
Е.В. Аверьянова, А.А. Вашурин	305
ПОЛУЧЕНИЕ БИФЕРМЕНТНЫХ СШИТЫХ АГРЕГАТОВ КАТАЛАЗЫ И СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ НА ОСНОВЕ ВАТЕРИТНОЙ МАТРИЦЫ	
М.А. Тагирова, Н.Л. Еремеев, Н.Г. Балабушевич, Н.Л. Клячко	309

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РОБОТИЗИРОВАННОЙ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ НАКОПЛЕНИЯ БИОМАССЫ ФИБРОБЛАСТОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ЦЕЛЯХ	
Ф.А. Фадеев, О.В. Мадиярова, А.Д. Никанорова	310
ОСОБЕННОСТИ ЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА СПОРЫ <i>BACILLUS SUBTILIS</i>	
Е.С. Яценко, Л.В. Затонская, В.А. Петухов, П.В. Лыков, И.А. Халявин	311

СЕКЦИЯ 7. ПРОМЫШЛЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ И ПРОИЗВОДСТВО БАВ

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ КЕДРОВОГО МАСЛА НА РОСТ ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ	
Ф.П. Балдынова, Е.В. Михалева, А. А Шенаршеева, Б.Ж. Ламаханова	313
СИНТЕЗ МАГНИТНЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ НА ОСНОВЕ ФЕРМЕНТОВ КЛАССА ОКСИДОРЕДУКТАЗ	
О.В. Гребенникова, А.М. Сульман, Е.И. Шиманская, В.Г. Матвеева	314
ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ АЛГИНАТА НАТРИЯ НА МОРФОЛОГИЮ МИКРОЧАСТИЦ, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ ВНУТРЕННЕГО ГЕЛЕОБРАЗОВАНИЯ	
П.Ю. Стадольникова, Б.Б. Тихонов, А.И. Сидоров, М.Г. Сульман	315
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ ГРУППЫ В В ФЕРМЕНТАЦИОННОМ БУЛЬОНЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА	
Н.Ю. Хромова, Ю.М. Епишкина, Н.В. Хабибулина, И.В. Шакир, В.И. Панфилов	319
СИНТЕЗ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА <i>RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM</i> И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО СВОЙСТВ	
Е.А. Кузнецова, Г.М. Зомитева, Е.А. Кузнецова, К.А. Рыжикова, К.Д. Казакова	323
АНАЛИЗ БИОДОСТУПНОСТИ АНТИОКСИДАНТОВ ЧАЙНЫХ СБОРОВ	
П.В. Масленников, М.В. Зорин, А.В. Серегина	325
ОЦЕНКА РИСКА ПЕРЕКРЕСТНОЙ КОНТАМИНАЦИИ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ВИРУСОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОДЕЛЬНЫХ АДЕНОВЕКТОРОВ, НЕСУЩИХ ГЕНЫ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ	
П.М. Петрова, О. Попова, Т.А. Ожаровская, Д.В. Воронина, Д.И. Зрелкин	330
ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ НЕФТЕПРОДУКТОВ КАК СТРЕССОВОГО ФАКТОРА НА РАЗВИТИЕ КОЛОНИЙ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК	
Т.А. Василенко, Е.О. Бездетко	331
НОРМАТИВНО-ПРАВОВОЕ РЕГУЛИРОВАНИЕ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ В ПРОМЫШЛЕННОСТИ ГЕННО-МОДИФИЦИРОВАННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ШТАММ <i>ESCHERICHIA COLI</i> K-12 – ПРОДУЦЕНТ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ	
Т.А. Воейкова, В.С. Кулигин, А.Д. Новиков, О.А. Журавлева, А.Ю. Скороходова	336

СЕКЦИЯ 8. БИОТЕХНОЛОГИЯ И ОБРАЗОВАНИЕ. ЗАСЕДАНИЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО УМО В СИСТЕМЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПО УКРУПНЕННОЙ ГРУППЕ СПЕЦИАЛЬНОСТЕЙ И НАПРАВЛЕНИЙ ПОДГОТОВКИ 19.00.00 ПРОМЫШЛЕННАЯ ЭКОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

ОСОБЕННОСТИ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ МАГИСТРАНТОВ	
Г.Н. Демиденко, М.Г. Сульман	338
ОСОБЕННОСТИ ПОДГОТОВКИ КАДРОВ ПО ПИЩЕВЫМ НАПРАВЛЕНИЯМ В СООТВЕТСТВИИ С ФГОС ВО 3++ И ПРОЕКТОМ ФГОС ВО 4	
О.Я. Мезенова, С.В. Агафонова	339
НОВАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА НАПРАВЛЕНИЯ «БИОТЕХНОЛОГИЯ» ПО ПРОФИЛЮ «БИОИНФОРМАТИКА»	
Р.Р. Биглов, А.С. Кузнецов	343
ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ БИОПРОДУКТОВ ГЛУБОКОГО ГИДРОЛИЗА ПОБОЧНОГО РЫБНОГО СЫРЬЯ В КОМБИКОРМАХ ДЛЯ ИНДУСТРИАЛЬНОЙ АКВАКУЛЬТУРЫ	
Н.Ю.Мезенова, Д.С. Пьянов, О.Я. Мезенова, С.В. Агафонова, В.В. Волков	347

Секция 1. Пищевая, сельскохозяйственная и лесная биотехнология

РОЛЬ АЦК ДЕЗАМИНАЗЫ РИЗОБАКТЕРИЙ В ФОРМИРОВАНИИ АРХИТЕКТУРЫ КОРНЕВОЙ СИСТЕМЫ И КОРНЕВЫХ ВОЛОСКОВ У ТОМАТОВ

Д.С. Сырова, П.С. Ульянич, А.И. Шапошников, А.А. Белимов

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

Вопросы о роли ризосферных бактерий в развитии и функционировании корневой системы растений являются весьма актуальными и привлекают пристальное внимание исследователей различных стран (Vacheron et al., 2013; Shibata and Sugimoto, 2019). Целью исследований было раскрытие механизмов образования и эффективного функционирования симбиозов растений с микроорганизмами на примере изучения роли АЦК дезаминазы ризобактерий и стрессового фитогормона этилена в формировании архитектуры корневой системы и корневых волосков у растений томатов. Следует отметить, что в большинстве работ, посвященных на эту тему ризобактериям, наблюдаемые эффекты были представлены в форме качественных данных (рисунков и микрофотографий). Недостаточное внимание было уделено и ризосферным бактериям, содержащим фермент АЦК дезаминазу. В этом отношении интересна работа Контесто с соавторами (Contesto et al., 2008), которые использовали различные виды бактерий (*Phyllobacterium brassicacearum* STM196, *Pseudomonas putida* UW4, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 128C53K, *Mesorhizobium loti* MAFF303099) и их мутанты по гену АЦК дезаминазы для инокуляции арабидопсиса. Было показано, что АЦК дезаминаза не влияла на удлинение корней и их количество, при этом все штаммы и их мутанты удлиняли корневые волоски.

Исследования проводились по разработанной ранее методике агаровой гнотобиотической системы (Belimov et al., 2007) с томатами сорта Микротом. Объектом изучения были штаммы ризосферных бактерий, обладающие активностью АЦК дезаминазы: ростстимулирующий штамм *Variovorax paradoxus* 5C-2, фитопатогенный для томатов штамм *Pseudomonas brassicacearum* Am3 и его мутант с пониженной активностью АЦК дезаминазы Т8–1. В качестве вариантов сравнения использовали химические регуляторы фитогормона этилена: ингибитор перцепции этилена ионы Ag^+ , ингибитор растительного фермента АЦК-синтетазы ионы Co^{2+} и аминокислоту АЦК. Определяли длину и количество корней и корневых волосков и колонизацию корней бактериями.

Установлено, что ростстимулирующая бактерия *V. paradoxus* 5C-2 стимулировала удлинение основного корня и корневых волосков, а также увеличивали количество корневых волосков, особенно при относительно высокой ($10E6$ кл./мл) плотности вносимого инокулята. Но фитопатогенная бактерия *Ps. brassicacearum* Am3 укорачивала основной и боковые корни, увеличивая длину и количество корневых волосков. Такой эффект штамма *Ps. brassicacearum* Am3 на корневые волоски мог быть связан с укорачиванием клеток корня, а не со стимулированием образования новых волосков. На количество боковых корней бактерии не влияли. Напротив, ингибитор перцепции этилена (Ag^+) стимулировал образование боковых корней, а обработка 10 мкМ АЦК снижала количество боковых корней. Ионы серебра подавляли развитие корневых волосков, в то время как ионы кобальта способствовали их удлинению. Результаты показали важную роль фитогормона этилена в формировании изучаемых компонентов корневой системы. Длина боковых корней, длина и количество корневых волосков у растений инокулированных мутантом *Ps. brassicacearum* Т8–1 была меньше при сравнении с растениями, инокулированными диким типом штаммом Am3. Это указывало на участие бактериальной АЦК дезаминазы в удлинении боковых корней и образовании корневых волосков.

Таким образом, нами впервые проведена количественная оценка влияния контрастных (ростстимулирующих и фитопатогенных) ризосферных бактерий содержащих АЦК-дезаминазу, в сравнении с химическими регуляторами перцепции и биосинтеза этилена на длину и количество корней и корневых волосков у томатов. Бактериальная АЦК дезаминаза улучшает формирование компонентов корневой системы. Эти результаты послужат основой для изучения роли АЦК-утилизирующих ризобактерий в адаптации растений к недостатку влаги.

Таблица. Влияние ризобактерий и химических модуляторов фитогормона этилена на корни томатов сорта Микротом

Варианты опыта	Длина основного корня, см	Длина боковых корней, см	Количество боковых корней, шт. / растение	Длина корневых волосков, мм	Количество корневых волосков, шт. / мм корня
Контроль	22 ± 1 с	29 ± 3 bc	12,1 ± 1,2 b	0,93 ± 0,02 b	72 ± 2 bc
2 μM Ag	24 ± 1 ed	55 ± 4 d	25,7 ± 1,9 c	0,18 ± 0,06 a	10 ± 2 a
2 μM Co	23 ± 1 с	25 ± 2 bc	10,4 ± 0,9 b	1,28 ± 0,02 d	81 ± 3 cd
5C-2 × 10E5	23 ± 1 с	28 ± 3 bc	11,9 ± 1,4 b	1,29 ± 0,04 d	79 ± 3 bcd
5C-2 × 10E6	25 ± 1 e	27 ± 3 bc	11,5 ± 1,2 b	1,40 ± 0,03 e	83 ± 3 d
Am3 × 10E5	21 ± 1 bc	33 ± 4 c	13,7 ± 1,4 b	1,13 ± 0,03 c	86 ± 6 de
Am3 × 10E6	15 ± 1 a	11 ± 1 a	12,3 ± 1,3 b	1,81 ± 0,03 f	122 ± 6 f
T8-1 × 10E5	20 ± 1 b	27 ± 3 b	11,9 ± 1,3 b	1,21 ± 0,05 cd	71 ± 3 b
T8-1 × 10E6	16 ± 1 a	19 ± 3 a	11,2 ± 1,4 b	1,45 ± 0,03 e	95 ± 4 e
1 μM ACC	22 ± 1 с	24 ± b	11,1 ± 1,0 b	0,89 ± 0,02 b	77 ± 5 bc
10 μM ACC	17 ± 1 a	10 ± 1 a	5,1 ± 1,0 a	0,90 ± 0,05 b	113 ± 4 f

Примечание: Штаммы *Variovorax paradoxus* 5C-2, *Ps. brassicacearum* Am3 и его мутант по АЦК дезаминазе T8-1. Указаны средние ± стандартные ошибки средних. Разными латинскими буквами указаны достоверно различающиеся варианты (Критерий НСР Фишера, $P < 0,05$).

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075–15–2020–920 от «16» ноября 2020 г. о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

Литература

- Belimov A.A., Dodd I.C., Safronova V.I., Hontzeas N., Davies W.J. *Pseudomonas brassicacearum* strain Am3 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase can show both pathogenic and growth-promoting properties in its interaction with tomato // Journal of Experimental Botany. 2007. V. 58. P. 1485–1495. doi: 10.1093/jxb/erm010.
- Contesto C., Desbrosses G., Lefoulon C., Béna G., Borel F., Galland M., Gamet L., Varoquaux F., Touraine B. Effects of rhizobacterial ACC deaminase activity on Arabidopsis indicate that ethylene mediates local root responses to plant growth-promoting rhizobacteria // Plant Science. 2008. V. 175. No 1–2. P. 178–189. doi:10.1016/j.plantsci.2008.01.020.
- Shibata M., Sugimoto K. A gene regulatory network for root hair development // Journal of Plant Research. 2019. V. 132. P. 301–309. doi: 10.1007/s10265-019-01100-2.
- Vacheron J., Desbrosses G., Bouffaud M.L., Touraine B., Moënné-Loccoz Y., Muller D., Legendre L., Wisniewski-Dyé F., Prigent-Combaret C. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning // Frontiers in Plant Science. 2013. V. 4. Paper No 356. doi: 10.3389/fpls.2013.00356.

РАЗРАБОТКА КОМПЛЕКСНОЙ ТЕХНОЛОГИИ УСКОРЕННОЙ СЕЛЕКЦИИ РИСА НА ДЛИТЕЛЬНУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ К ПИРИКУЛЯРИОЗУ

Е.Г. Савенко, Ж.М. Мухина, В.А. Глазырина, Л.А. Шундрин

ФНЦ риса, Краснодар, Россия

Для выведения сорта риса требуется в среднем 8 лет, ещё два-три года занимает процесс государственных сортовых испытаний для регистрации в Государственном реестре допущенных к использованию селекционных достижений. Реалии современного рынка семян диктуют острую необходимость интенсификации селекционного процесса. Переход к новой селекционной парадигме, основанной на использовании так называемых постгеномных технологий, геномного подхода, существенно ускоряет темпы и улучшает качество селекции. Такой подход является наиболее перспективным, поскольку выявляет у селекционного материала ДНК-полиморфизмы и их связь с фенотипическим проявлением целевых признаков, что делает отбор селекционно ценных генотипов предельно прицельным. Последующая генетическая стабилизация этих генотипов экспериментальной гаплоидией (получение удвоенных гаплоидов культурой пыльников *in vitro*) в несколько раз ускоряет процесс создания селекционного продукта.

Основной целью исследований являлась разработка комплексной технологии ускоренной селекции риса на длительную устойчивость к пирикуляриозу на основе современных методов фенотипирования, генотипирования и гаметных технологий. В ходе реализации поставленных задач разработана и прошла экспериментальную апробацию первая совместная российско-китайская технология ускоренной селекции риса на длительную устойчивость к пирикуляриозу на основе современных методов фенотипирования, ДНК-генотипирования и экспериментальной гаплоидии. Проведена комплексная оценка образцов риса китайской селекции в условиях рисосеяния юга России, а образцов российской селекции – в южной провинции Китая (остров Хайнань). В результате двухлетних исследований (2019–2020 гг.) отмечена вариабельность биологических и морфологических признаков растений испытываемых генотипов в зависимости от агроклиматических условий стран. Испытуемые сорта проявили себя как ценный исходный материал для включения в селекционные схемы двух стран: России и Китая.

В ходе гибридизации российских сортов (реципиентные формы) с китайскими донорными сортообразцами, несущими гены устойчивости к грибному патогену, с последующей серией беккроссов, получены ВС₂, ВС₃-поколения. Для ускорения селекционной схемы созданы генетически стабильные удвоенные гаплоиды на основе F₁ и ВС₁ – растений от скрещивания российских и китайских сортообразцов. Для проверки генетической однородности удвоенных гаплоидов проведено генотипирование ДНК (микросателлитным) анализом. Создан молекулярный (InDel) маркер для идентификации ДНК-локусов длительной устойчивости селекционного материала риса к пирикуляриозу. Маркер показал свою эффективность на растениях F₂-популяции, полученной от скрещивания контрастных по изучаемому признаку сортов. Выделившиеся на основе комплексной оценки сортообразцы с заданными свойствами являются ценным исходным материалом для селекционных программ на устойчивость риса к пирикуляриозу, проводимых селекционерами России и Китая. Они включены в пополняемую базу данных, которая включает разделы: «Идентификация генов устойчивости риса к пирикуляриозу с использованием ДНК-маркерного анализа»; «Фенотипирование образцов риса по признаку «Устойчивость к локальной популяции возбудителя пирикуляриоза (искусственный инфекционный фон)»; «Характеристика морфо-биологических и хозяйственно-ценных признаков образцов риса китайской селекции в условиях Краснодарского края»; «Результаты гибридизации – скрещивание китайских и российских образцов риса. Получение F₁, ВС₁, ВС₂ – поколений»; «Культивирование изолированных пыльников риса *in vitro*, получение морфогенных каллусных линий и регенерантов»; «Оценка генетической однородности полученных удвоенных гаплоидов риса на основе генотипирования микросателлитных SNP локусов ДНК».

УДК 615.074

РАЗРАБОТКА ИММУНОАНАЛИЗА ПОЛИМИКСИНОВ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И ЛЕКАРСТВЕННОГО МОНИТОРИНГА

И.А. Гальвидис¹, К.М. Буркин^{1,2}, Ю.А. Суровой^{1,2}, М.А. Буркин¹¹ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия² МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Введение. Полимиксины – декапептидные антибиотики, по механизму антибактериальной активности относятся к мембранным катионным поверхностно-активным соединениям, способны связываться с липидом А – частью липополисахаридов грамотрицательных микроорганизмов, вызывать нарушение проницаемости клеточной стенки и гибель возбудителя. Практически значимые полимиксин В (ПМ) и колистин (КОЛ) структурно схожи (Рис. 1), обладают сходным антимикробным действием и механизмом перекрестной резистентности. В настоящее время эти антибиотики являются препаратами «последнего рубежа» – для терапии септических состояний, вызванных устойчивыми грамотрицательными микроорганизмами, особенно *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* и *Klebsiella pneumoniae* [1]. ПМ является активной формой антибиотика, в отличие от КОЛ, который вводится пациентам в виде пролекарства – КОЛ метансульфоната. Последний гидролизуется *in vivo*, приобретая антибактериальную активность. Учитывая узкий терапевтический диапазон и возможность нейро- и нефротоксических проявлений [2], создание простого и быстрого метода для лекарственного мониторинга urgentных пациентов крайне актуально.

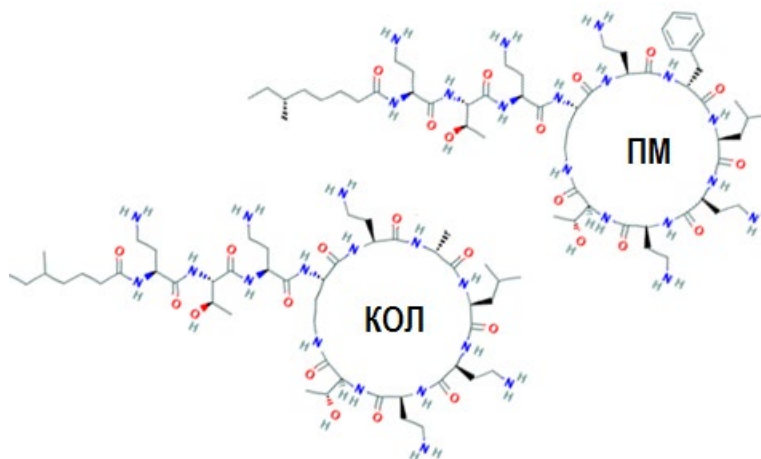


Рисунок 1. Структурные формулы полимиксина В (ПМ) и колистина (КОЛ)

Кроме того, КОЛ используется также для профилактики и лечения инфекций сельскохозяйственных животных и птиц. В качестве мер по борьбе с развитием и распространением устойчивой к антибиотикам патогенной микрофлоры было запрещено использование КОЛ в качестве стимулятора роста, и установлено максимально допустимое его содержание (МДУ) в продуктах животного происхождения в РФ и странах ЕС. Созданию быстрых скрининговых тестов на основе иммуноанализа полимиксинов посвящено крайне ограниченное число работ, а представленные в них методы определения антибиотика характеризовались относительно невысокой чувствительностью с пределом определения 9–30 нг/мл [3, 4].

Настоящая работа посвящена созданию конкурентного иммуоферментного анализа (ИФА), пригодного для количественного определения КОЛ в яйцах и молочных продуктах с МДУ 50 мкг/кг, а также для измерения полимиксинов в сыворотке человека с целью лекарственного мониторинга.

Материалы и методы. Реагенты. ПМ и КОЛ приобретены в AppliChem (Германия). В работе использовали бычий сывороточный альбумин (БСА), полный адъювант Фрейнда, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид (ЭДК), периодат натрия и боргидрид натрия (Sigma-Aldrich, США), желатин (ЖЕЛ) (Bio-Rad, США), фосфатно-солевой буфер с 0.05 % твин 20 (ФСБ-Т) и двухкомпонентный раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) Биосервис (Россия), козы антитела к IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (АК-ПХ) (Россия).

Образцы молока и яиц были приобретены в торговых точках г. Москвы. Сыворотки крови здоровых доноров и реанимационных пациентов с септической пневмонией были получены в клинической больнице МЕДСИ № 1 г. Москвы.

Приготовление конъюгатов. Для иммунизации животных был приготовлен конъюгат на основе ПМ и БСА в качестве белкового носителя. Активацию карбоксильных групп белка осуществляли ЭДК, которые взаимодействовали с аминами ПМ. Непрореагировавшие ингредиенты удаляли посредством диализа.

Для адсорбции ПМ на 96-луночных планшетах синтезировали конъюгированные антигены на основе ЖЕЛ в качестве носителя. ЖЕЛ окисляли периодатом натрия, диализовали в течение ночи против воды при 4 °С и смешивали с 10-кратным мольным эквивалентом ПМ. Таким образом, ЖЕЛ-ПМ синтезировали путем восстановительного аминирования периодат-окисленного гликопротеина. ЖЕЛ-КОЛ был получен в процессе конъюгации с использованием глутарового альдегида в качестве сшивающего агента. Для стабилизации в растворы образованных конъюгатов добавляли боргидрид натрия, а спустя 1 ч инкубации диализовали против воды в течение 2 суток.

Иммунизация и получение антител. Кроликам подкожно в несколько точек на спине инъецировали 100 мкг БСА-ПМ, эмульгированного в полном адъюванте Фрейнда. Последующие иммунизации теми же дозами осуществляли с месячными интервалами. Иммуноген инъецировали в неполном адъюванте Фрейнда. Антисыворотки, взятые через неделю после бустерных иммунизаций, сравнивали по специфической активности и чувствительности. IgG фракции из наиболее активных препаратов использовали в ИФА в качестве антител.

Процедура ИФА. Конкурентный анализ проводился по классической методике. ЖЕЛ-конъюгаты наносили на полистироловые 96-луночные планшеты Costar и оставляли на ночь при 4° С. Неадсорбированный конъюгат отмывали ФСБ-Т. Последующий конкурентный этап анализа включал взаимодействие с иммобилизованным антигеном рабочего раствора антител в присутствии стандартных растворов антигенов или тестируемого образца. После отмывки связанные с иммобилизованным антигеном антитела детектировали с помощью АК-ПХ (1 ч, 37 °С) и ТМБ-субстратной смесью. Окрашенный продукт, образовавшийся в результате ферментативной реакции, регистрировали при 450 нм на планшетном ридере LisaScan (Erba, Чехия).

Зависимость относительного связывания антител (B/B_0) от концентраций аналита выражали в виде калибровочных кривых. Перекрестную реактивность для каждого представителя рассчитывали, как отношение концентраций 50 %-ного ингибирования IC_{50} ПМ/ IC_{50} аналога. Рабочим диапазоном анализа считали диапазон концентраций IC_{20} - IC_{80} , а предел обнаружения (ПО) был рассчитан как $B_0 - 3 \times SD$.

Результаты и обсуждение. Полимиксины являются низкомолекулярными соединениями, неспособными вызывать иммунный ответ. Для выработки антител ПМ конъюгировали с макромолекулярным носителем. У БСА были активированы карбоксильные группы, которые непосредственно участвовали в связывании со стерически доступными аминок группами ПМ. Полученные в результате иммунизации кроликов поликлональные антитела использовали для создания конкурентного формата ИФА. В качестве твердофазных антигенов синтезировали гетерологичные конъюгаты ПМ и КОЛ с желатиной.

Для измерения терапевтического диапазона концентраций ПМ использовали сорбированный конъюгат ЖЕЛ-КОЛ. Рабочий диапазон анализа составил 4,0 – 212 нг/мл, что позволило анализировать образцы сыворотки человека после их 100-кратного разведения буфером. Чувствительность ИФА, выраженная в концентрации IC_{50} , и предел обнаружения ПМ составили 30,5 и 1,0 нг/мл, соответственно (Рис. 2А). Специфичность анализа распространялась и на КОЛ (95 %), который также мог быть адекватно количественно определен в образцах сыворотки при использовании соответствующей калибровки. С помощью разработанного метода было проведено пробное фармакокинетическое исследование пациентов с грамотрицательным сепсисом. Установленные фармакокинетические профили ПМ для ряда пациентов выявили превышение рекомендуемого суточного уровня этого антибиотика ($AUC_{24} > 100$ мг*ч/л), что обуславливает необходимость индивидуального мониторинга для коррекции дозирования препарата. Разработанный метод пригоден для контроля антибиотикотерапии и в дальнейшем будет использоваться для моделирования фармакокинетики ПМ у разных групп тяжелобольных пациентов [5].

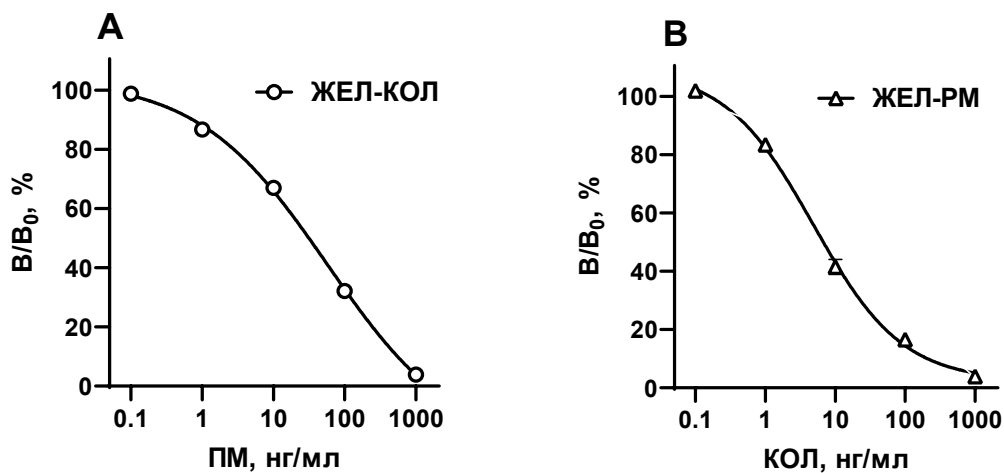


Рисунок 2. Калибровочные кривые ИФА количественного определения полимиксина В в сыворотках больных (А) и колистина (В) для его обнаружения в продуктах питания

Для обнаружения остаточного КОЛ в продуктах животноводства в качестве иммобилизованного антигена использовали гетерологичный конъюгат ЖЕЛ-ПМ, что обеспечило более чувствительное определение аналита ($IC_{50} = 5.7$ нг/мл) и предел определения 0.4 нг/мл (Рис. 2В). Существенное влияние матрикса образцов молока на уровень взаимодействия антител с антигеном было устранено с помощью имитатора матрикса, сухое молоко. Матрикс-эффект разведенного сухого молока соответствовал разведению реальных образцов коровьего молока. Раствор этого реактива использовали для приготовления калибровочных кривых. Благодаря высокой чувствительности анализа содержание КОЛ в молоке и яйцах можно было определять без специальной и трудоемкой предварительной пробоподготовки – посредством простого 10- и 50-кратного разведения соответствующих образцов ФСБ-Т буфером (табл. 1). Разработанная система анализа позволяла регистрировать МДУ КОЛ в молочных продуктах и яйцах, а извлечение аналита составило 89–104 % [6].

Таблица 1. Выявление колистина в образцах молока и яиц при пороговом содержании антибиотика

объекты	Фактор разведения	Концентрация КОЛ, нг/мл		Обнаружено (%)
		введено	найденно	
молоко	10	100	$100 \pm 8,2^*$	$100 \pm 8,2^*$
		50	$47 \pm 3,5$	$94,7 \pm 7$
		25	26 ± 4	104 ± 12
яйца	50	600	$580 \pm 77,9$	$96,7 \pm 13$
		300	$271 \pm 27,5$	$90,6 \pm 9,2$
		150	$133 \pm 2,9$	$88,9 \pm 1,9$

*Стандартное отклонение ($n = 4$)

Заключение. Получены иммунореагенты и разработана ИФА-система для группового выявления полимиксина В и колистина. Благодаря их близкому распознаванию, 100 % и 95 % соответственно, оба этих циклических пептида могли быть выявлены в биологических жидкостях и других объектах анализа. Подобраны параметры анализа для определения терапевтических концентраций ПМ в сыворотке крови больных. На ограниченном контингенте больных с септическим шоком проведено предварительное фармакокинетическое исследование. Показатели экспозиции ПМ варьировали у пациентов в зависимости от особенностей их состояния и терапии, в связи с чем, проведение терапевтического лекарственного мониторинга ПМ у тяжелых пациентов реанимации с помощью предложенного метода целесообразно для поддержания эффективного уровня лекарственного препарата без токсических проявлений. Дальнейшее исследование фармакокинетики ПМ у разных категорий пациентов позволит персонализировать и оптимизировать антибиотикотерапию.

Для обеспечения контроля безопасности продуктов питания разработанный метод адаптирован для измерения КОЛ в молоке и куриных яйцах. Благодаря высокой чувствительности теста выявление пороговых уровней этого антибиотика в продуктах питания могло осуществляться без специальной обработки, после простого разведения образцов.

Литература

1. Velkov T, Roberts KD, Nation RL, Thompson PE, Li J. Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics. *Future Microbiol.* 2013, 8, 711–24.
2. Tsuji BT, Pogue JM, Zavascki AP, Paul M, Daikos GL, Forrest A, et al. International Consensus Guidelines for the Optimal Use of the Polymyxins: Endorsed by the American College of Clinical Pharmacy (ACCP), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), Infectious Diseases Society of America (IDSA), International Society for Anti-infective Pharmacology (ISAP), Society of Critical Care Medicine (SCCM), and Society of Infectious Diseases Pharmacists (SIDP). *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy.* 2019, 39, 10–39.
3. Kitagawa, T., Ohtani, W., Maeno, Y., Fujiwara, K., & Kimura, Y. Sensitive enzyme immunoassay of colistin and its application to detect residual colistin in rainbow trout tissue. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 1985, 68(4), 661–664.
4. Suhren, G., & Knappstein, K. Detection of colistin in spiked and incurred milk samples by LC – and ELISA-technique. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 529(1–2), 97–101.
5. Burkin Maksim A., Galvidis Inna A., Surovoy Yuri A., Plyushchenko Ivan V., Rodin Igor A., Tsarenko Sergei V. Development of ELISA formats for polymyxin B monitoring in serum of critically ill patients. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Volume 204, 10 September 2021.
6. Galvidis Inna A., Eremin Sergei A., Burkin Maksim A. Development of indirect competitive enzyme-linked immunoassay of colistin for milk and egg analysis. *Food and Agricultural Immunology*. Volume 31, 2020 – Issue 1, 424–434.

УДК 54.056, 577.15, 577.29

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БЕЛКОВЫХ ВЕЩЕСТВ
ФАСОЛИ НА АМИЛАЗЫ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ****В.А. Базулева, Е.А. Прутенская, М.Г. Сульман***Тверской государственный технический университет, Тверь, Россия*

Введение. В настоящее время исследователи широко изучают возможности растительного сырья для производства питательных веществ и компонентов пищи. Бобовое сырье является ценным и очень богатым на белки, углеводы с низким гликемическим индексом, минеральные вещества (фосфор, калий, магний, кальций).

Белки бобовых представляют собой ингибиторы α -амилаз и трипсина. Они проявляют узкую специфичность по отношению к амилазам и протеиназам. Специфические ингибиторы ферментов были обнаружены во всех живых организмах. Они выполняют разнообразнейшие функции, такие, как защиту организма от патогенов, регуляцию активности ферментов и другие. Среди них особое место занимают ингибиторы гидролитических ферментов растений, которые являются одним из барьеров, стоящих на пути проникновения фитопатогенов в организм растения [1]. У растений природные ингибиторы отличаются друг от друга, способны приостанавливать прорастание, и играют заметную роль в сохранении покоя семян. Ингибирующая способность природных белков проявляется при нахождении этих веществ в цитоплазме. Ферменты выходят из связанного с белком состояния вследствие увеличения влажности зерна. Возникает вопрос о возможности использовании ингибиторов для хранения зерновых культур, учитывая их безопасность как веществ растительной природы (в отличие от химических реагентов и добавок).

Ингибиторы, содержащиеся в фасоли, проявляют активность к амилазам слюны и поджелудочной железы. Это позволяет использовать их для изготовления антидиабетических биодобавок к пище. Например, для лечения сахарного диабета второго типа можно применять ингибирование ферментов, расщепляющих углеводы для снижения уровня глюкозы в крови. С помощью специфических ингибиторов α -амилазы или α -глюкозидазы можно снижать уровень глюкозы в крови без значительных осложнений для организма. По этой причине ингибирование α -амилазы и α -глюкозидазы рассматривается как одна из перспективных стратегий лечения гипергликемии [2].

Цель работы заключается в изучении химико-биологических свойств полученных белковых веществ и исследование амилолитических характеристик на грибной, панкреатической и зерновой α -амилазах.

Материалы и методы. Для получения белковых веществ из фасоли *Phaseolus vulgaris* (сорта «Кидни» и «Бланш») использовали усовершенствованную технологию для выделения и концентрирования белковых веществ [3]. В качестве тест-системы для биологической активности выделенных белковых веществ использовали грибную α -амилазу *Aspergillus oryzae*, АС (амилолитическая активность) ~ 33 ед./мг, панкреатическую α -амилазу, АС ~ 13 ед./мг. Амилолитическую активность определяли в соответствии с ГОСТ 34440–2018 Ферментные препараты для пищевой промышленности. Методы определения амилолитической активности.

Для определения ингибиторной активности полученных белковых веществ в условиях *in vivo* использовали семена ржи. Проращивание семян и определение энергии прорастания определяли в соответствии с ГОСТ 12038–84 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести. Зерно ржи проращивали в растворах ингибиторов разной концентрации (3 %, 5 %, 7 %, 10 %), осуществляли протравку зерна ингибиторами и проращивали в рулонах [4].

Результаты и обсуждение. Первым блоком исследований было изучение влияния белковых веществ фасоли на грибную и панкреатическую амилазы. Для проведения экспериментов в условиях *in vitro* подбирали концентрацию амилаз, а затем проводили реакции ингибирования.

При концентрации α -амилазы *Aspergillus oryzae* равной 1 % наблюдался полный гидролиз крахмала, при концентрации α -амилазы *Aspergillus oryzae* равной 0,01 % гидролиз крахмала не произошел. Наиболее оптимальной концентрацией оказалась концентрация равная 0,05 %. При данной концентрации происходило постепенное снижение количества крахмала в среде, что позволит наблюдать процесс ингибирования грибной α -амилазы *Aspergillus oryzae* выделенными белковыми веществами из фасоли. В зависимости от величины концентрации белкового вещества, выделенного из фасоли (ингибитор) наблюдалась различная тенденция.

При уменьшении концентрации ингибитора происходило снижение активности. Наибольшее снижение активности наблюдается при добавлении растворов ингибитора с концентраций 0,000001 % и 0,00001 %. Дальнейшее уменьшение концентрации раствора ингибитора приводило к постепенному увеличению активности α -амилазы *Aspergillus oryzae*. Максимальное подавление ферментативной активности в пробах достигается при 0,015 %.

Изучали зависимость активности грибной α -амилазы *Aspergillus oryzae* от времени и ее активность при добавлении растворов ингибитора концентраций 0.000001 % и 0.00001 %. Максимальное ингибирование происходит через 10 минут после начала реакции, затем активность α -амилазы увеличивается. И после 15 минут течение ферментативной реакции приостанавливается. Таким образом, комплекс, образуемый между ингибитором и ферментом, нестабильный и зависит от концентрации ингибитора и субстрата.

Для дальнейших опытов по определению степени ингибирующего действия выделенных белковых веществ из фасоли на активность α -амилазы *Aspergillus oryzae* была выбрана концентрация ингибитора, при которой наблюдалось наибольшее снижение активности фермента – 0,00001 %.

На основе данных результатов можно сделать вывод, что при добавлении ингибитора активность амилазы падает, и меньшая концентрация оказывает большее воздействие на активность.

Для того чтобы определить то, как полученное белковое вещество из семян фасоли будет замедлять активность фермента, необходимо подобрать оптимальную концентрацию панкреатической α -амилазы.

Следующим этапом работы стало определение оптимальной концентрации панкреатической α -амилазы в ферментативной реакции. Диапазон концентрации амилазы варьировался от 0,1 до 2,2 %. Анализ проб осуществляли на 5, 10, 15, 20 минутах.

В процессе проведения экспериментов, было выявлено, что при повышении концентрации панкреатической α -амилазы свыше 1 % происходит полный гидролиз крахмала уже на 5 минуте.

Для лучшего представления об активности панкреатической α -амилазы было рассчитано остаточное количество крахмала в смеси в течение 20 минут ферментативной реакции. Из полученных результатов можно сделать вывод, что наиболее оптимальной концентрацией панкреатической α -амилазы является концентрация равная 0.6 %.

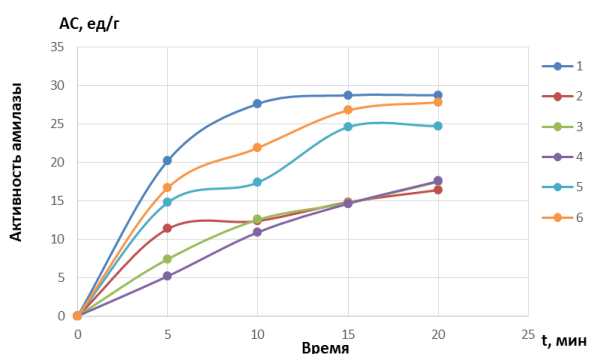


Рисунок 1 – Зависимость активности амилазы при добавлении ингибитора различной концентрации от времени: 1 – Активность амилазы без добавления ингибитора; 2 – активность амилазы при добавлении ингибитора с концентрацией 3 %; 3 – активность амилазы при добавлении ингибитора с концентрацией 2 %; 4 – активность амилазы при добавлении ингибитора с концентрацией 1 %; 5 – активность амилазы при добавлении ингибитора с концентрацией 0,5 %; 6 – активность амилазы при добавлении ингибитора с концентрацией 0,2 %

Наибольшее снижение активности наблюдается при добавлении растворов ингибитора концентраций 1 %.

Максимальное ингибирование фермента через 10 минут после начала процесса. На 20 минуте активность фермента увеличивается на 30 %.

Были взяты следующие концентрации растворов ингибитора: 0,2; 0,5; 1; 2; 3 % (рисунок 1). Для достижения максимального эффекта, необходимо использовать 1 % раствор ингибитора, так как снижение амилалитической активности наиболее эффективно.

Для определения посевных качеств большое значение имеет энергия прорастания. Ряд авторов прибегает к так называемой энергии наклеивания, когда оценивают количество наклевывшихся семян на самых ранних этапах прорастания.

К физиологическим изменениям, индуцируемым при старении семян, можно отнести: уменьшение скорости прорастания и роста проростков и повышенную чувствительность проростков к патогенам [5]. Вторым блоком исследований было изучение влияния белковых ингибиторов на амилазы ржи при прорастании.

При прорастании α -амилазная активность увеличивается, а количество ингибиторов зерна снижается. В результате активируются биохимические процессы роста.

Для эксперимента по торможению процесса прорастания использовали растворы белкового ингибитора с концентрацией в диапазоне от 1 до 10 %. Время проращивания осуществляли в течение 6 суток до становления проростка. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Данные по проращиванию семян ржи в растворах ингибиторов

Концентрация ингибитора, %	% проросших семян		
	2 сутки	3 сутки	6 сутки
0	51,67	60	73,34
1	46,67	51,67	63,33
3	26,67	50	60
5	3,33	28,83	28,83
7	0	0	0
10	0	0	0

Изучаемые ингибиторы существенно влияют на прорастание семян, они способны подавлять амилазы, находящиеся в зернах. Из-за этого количество проростков возрастает, но не так значительно, как в контрольном образце. При увеличении концентрации ингибитора наблюдается замедление роста и развития семян, при концентрации более 3 % процессы число проросших семян не достигает и 30 %. Процесс созревания ржи характеризуется периодическим изменением скорости накопления крахмала и активности амилаз. Следует отметить среднюю длину надземной части и корней проростков на 6 сутки: при контроле средняя длина проростков 0,5 см, корней 1,3 см, при ингибиторе 1 % – 0,24 см и 0,68 см, при ингибиторе 3 % – 0 см и 0,2 см, при ингибиторе 5 % – 0 см и не более 0,1 см, при ингибиторах с концентрацией 7 % и 10 % семена не проросли.

Помимо проращивания в растворе ингибиторов осуществляли протравку зерна растворами ингибиторов с концентрациями 3; 5; 7 %. Из таблицы 2 видно, что с увеличением концентрации ингибитора уменьшает количество проросшего зерна. Можно сказать, что протравка замедляет рост семян, но менее эффективно, чем проращивание в растворе ингибиторов.

Таблица 2 – Данные по проращиванию семян после протравки растворами ингибиторов	
Концентрация ингибитора, %	% проросших семян
0	82,14
3	62,5
5	58,93
7	51,79

«фермент-ингибитор» ослабевает и, может быть, даже разрушается.

Белковые вещества фасоли – ингибиторы оказывают воздействие на амилазы зерна. Они способны замедлять биологическую активность в 1,5 раза. С увеличением концентрации ингибитора, процент прорастания семян снижается в 2,5 раза, а концентрация более 7 % полностью останавливает биологические процессы в зерне.

Данные об энергии прорастания свидетельствуют о том, что ингибиторы фасоли можно использовать для хранения зерновых культур, так как они будут снижать количество микроорганизмов, являются безопасной и экологичной субстанцией.

Исследование ингибиторов ферментов создает базу для внедрения этих веществ в пищевую и медицинскую сферу, например, для лечения сахарного диабета. Фасоль является источником соединений, способных эффективно ингибировать α -амилазу. Преимущество использования растительных ингибиторов в качестве терапевтических агентов при лечении сахарного диабета состоит в их доступности и легком способе выделения при помощи экстракции.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19–08–00185\19

Литература

- Исламов, Р.А. Бифункциональный ингибитор α -амилазы / трипсина из зерна пшеницы / Р.А. Исламов, О.В. Фурсов // Прикладная биохимия и микробиология, 2007, том 43, № 4, с. 419–423.
- Кунакова, Р.В. Растения как перспективные источники ингибиторов амилазы при разработке функциональных продуктов питания и профилактики сахарного диабета / Р.В. Кунакова, Р.А. Зайнуллин, Э.К. Хуснутдинова, Б.И. Ялаев, Е.П. Сегура, А.Д. Ильина // Общая биология. Вестник Академии наук РБ, 2016, том 21, 1 (81).
- Сильченко, В.А. Разработка технологии получения белковых веществ и крахмала из бобовых культур / В.А. Сильченко, Е.А. Савченко // Сборник материалов VIII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего», Санкт-Петербург, 23–24 апреля 2018 г. – СПб.: Изд-во СПХФУ, 2018. – С. 506–508.
- ГОСТ 12038–84 Межгосударственный стандарт. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести Agricultural seeds. Methods for determination of germination. – М.: ИПК Издательство стандартов, 2011. – 32 с.
- Алексейчук, Г.Н. Сила роста семян зерновых культур и ее оценка методом ускоренного старения – Мн.: Право и экономика, 2009. – 44 с.

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ТЕРМОИНАКТИВАЦИИ ОКСИДАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ ИЗ ДРОЖЖЕЙ *OGATAEAPARAPOLYMORPHA* DL1

Д.Л. Атрошенко^{1,2}, М.Д. Шеломов^{1,2}, Ю.А. Ушакова¹, С.С. Савин¹, В.И. Тишков^{1,2}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Оксидаза D-аминокислот (DAAO) – это фермент, который катализирует окисление D-аминокислот в соответствующие α -кетокислоты с образованием пероксида водорода и иона аммония. DAAO играет важную роль как в прокариотах, так и эукариотах. В последних особая роль относится к регуляции нервной деятельности. Пониженный уровень D-Ser приводит к возникновению шизофрении. В случае таких тяжелых нейродегенеративных заболеваний как болезни Альцгеймера и Паркинсона, возрастает уровень D-аланина. Разработка высокочувствительных методов детекции этих D-аминокислот может быть использована для анализа возможности возникновения вышеуказанных нейродегенеративных заболеваний.

В пищевой биотехнологии уровень D-аминокислот можно использовать для определения качества пищевых продуктов. С увеличением времени хранения пищевых продуктов в основном происходит увеличение содержания D-Ala. Это связано с тем, что D-Ala является основной D-аминокислотой пептидогликана клеточной стенки бактерий.

Активно развивающимся подходом для определения уровня D-аминокислот является использование биосенсоров на основе оксидаз D-аминокислот, которые не взаимодействуют с L-аминокислотами. Биосенсоры просты в использовании, экспрессные и относительно дешевые. Основным препятствием стала широкая субстратная специфичность имеющихся DAAO (в первую очередь из почек свиньи, дрожжей *T.variabilis* и *R.gracilis*, которые с D-Ala и D-Ser имеют близкие кинетические параметры). Это особенно важно в случае определения D-Ala, концентрация которого в клетке примерно в 10 раз ниже концентрации D-Ser. Поэтому в настоящее время самой важной задачей является получение препаратов DAAO высокоспецифичных или к D-Ala, или к D-Ser. Нами была получена DAAO из дрожжей *Ogataeapara polymorpha* DL1, высокоспецифичная к D-Ala. Причем его удельная активность оказалась минимум в два раза выше по сравнению с другими DAAO, описанными в литературе.

Важным свойством для подбора условий реакции является температурная стабильность фермента. Детальные данные по кинетике инактивации и знание механизма инактивации фермента позволит подобрать оптимальные условия работы и хранения биосенсора. Кроме того, знание механизма инактивации необходимо при использовании методов рационального дизайна с целью повышения стабильности фермента.

В данной работе изучена термоинактивация OraDAAO1 в диапазоне температур 48–52 °C. Исследовано влияние начальной концентрации фермента и добавления дополнительных количеств молекулы FAD на кинетику термоинактивации. Исходя из полученных кинетических данных, предположен механизм термоинактивации OraDAAO1, проанализирована советующая кинетическая схема и определены константы инактивации OraDAAO1.

Работа выполнена при поддержке Гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук и докторов наук (МК-6239.2021.1.4).

УДК 575.18, 634.742

ПОИСК И КОЛОКАЛИЗАЦИЯ САТЕЛЛИТНЫХ ПОВТОРОВ В *SHEPHERDIA ARGENTEA* (PURSH) NUTT**К.Д. Боне^{1,2}, О.В. Разумова¹, И.В. Киров¹, Г.И. Карлов¹**¹ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия² Российский государственный аграрный университет МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, Россия

Shepherdia argentea (Pursh) Nutt является двудомным растением семейства *Elaeagnaceae*. Ее высокая устойчивость к влажности и нетребовательность к почве привела к широкому распространению этой культуры в Европе, Азии и Северной Америки (1). Высокое содержание в ее ягодах полезных веществ, таких как витамин С, каротин и катехины делает шефердию хорошим помощником в традиционной медицине. На ее корнях обнаружены азотфиксирующие бактерии, что открывает возможность использования шефердии для ремедиации земель. Являясь родственником облепихи, шефердия потенциально может служить донором хозяйственно-ценных признаков для этой, более традиционной для нашей страны культуры, однако слабая изученность этого вида даже у себя на родине, в Америке, затрудняет работу с ней.

Целью нашего исследования было изучение локализации сателлитных повторов *Shepherdia argentea* (Pursh) Nutt на ее хромосомах, так как в настоящее время нет данных по ее геному и кариотипу, не известен механизм детерминации пола, не выявлены половые хромосомы. Хромосомы шефердии мелкие, морфологически не различимы друг от друга.

В своей работе мы просеквенировали ДНК двух растений шефердии, после чего провели кластерный и тандемный анализ полученных сиквенсов (2).

С полученными Illumina сиквенсами двух растений *Shepherdia* провели кластеризацию с помощью программы RepeatExplorer (3). Из обнаруженных тандемных повторов были отобраны кластеры, которые имели высокую вероятность быть сателлитами. Консенсусы сателлитов с вероятностью более 0.4 использовали для подбора праймеров, которые подбирали с помощью программы Primer 3 и Primer-Blast (4). Последующая амплификация на ДНК мужских и женских растений помогла отобрать наиболее эффективные праймеры, демонстрирующие амплификацию характерной для сателлитных повторов «лесенкой». Полученный ПЦР-продукт был использован для изготовления зондов флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH), меченых биотином или дигоксигенином. Метафазные препараты готовились из корневых меристем методом SteamDrop.

Для локализации сателлитных повторов использовался метод с разноцветными зондами (multi-color FISH). В общей сложности локализацию показали 8 сателлитных повторов, которые были локализованы парно на каждом препарате. В основном все кластеры локализовались на субтеломере, но один показал локализацию в прицентромерной области, что требует более подробного изучения. В целом выявленные и локализованные повторяющиеся последовательности позволяют различить некоторые хромосомы шефердии между собой и составить идиограмму. Работа продолжается.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ, соглашение № 20-016-00145 А.

Литература

Sriladda, C., Kratsch, H.A., Larson, S.R., Monaco, T.A., Shen, F., & Kjelgren, R.K. (2016). Interspecific hybrid of xeric *Shepherdia rotundifolia* and riparian *Shepherdia argentea*: Description, and traits suitable for low-water urban landscapes. *HortScience*, 51(7), 822–828.

Fastqc Version 0.11.8: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>; Bolger, A.M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, btu170.

Novak, P., Neumann, P., Pech, J., Steinhaisl, J., Macas, J. (2013) – RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next generation sequence reads. *Bioinformatics* 29:792–793.

Zhang, J. & Madden, T.L. (1997) "PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation." *Genome Res.* 7:649–656. PubMed.

ЭЛЕМЕНТНЫЙ СТАТУС МОЛОКА КОРОВ В СЕЗОННОЙ ДИНАМИКЕ

О.А. Воронина, С.Ю. Зайцев

ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, Дубровицы, Россия

Коровье и козье молоко расцениваются как важные источники основных минеральных элементов, таких как Ca, K, Mg, Na, P, Se и Zn, что еще раз подтверждается в исследовании Astolfi M.L. 2020 г. [1]. Всего же в составе молока обнаружено порядка 50 макро- и микроэлементов [1–3]. Часть из них, такие как Cu и Zn являются тяжелыми металлами. Это означает, что содержание этих элементов не должно превышать 5,0 мг/кг для Zn и 1,0 мг/кг для Cu (СанПиН № 42–123–4889–86, актуализирован 01.01.2021 г.). Известно [4], что количественный состав макро – микроэлементов ММЭ молока напрямую связан с химическим составом кормов и степенью их загрязненности тяжелыми металлами. Различные участки земной поверхности часто характеризуются неравномерным распределением ММЭ [5]. Это во многом определяет состав микроорганизмов, растений и животных [5]. Еще один весомый фактор, связанный с поступлением ММЭ в молоко – это антропогенный фактор [6]. Так, например количество меди в молоке резко увеличивается в период обработки садов и лугов содержащими медь фунгицидами. [7].

Данные ММЭ являются незаменимыми для организма. Например, медь (Cu) стимулирует выработку половых гормонов, тироксина и нейромедиаторов [8, 9], необходима для синтеза гема, мобилизации и транспорта железа, участвует в процессах образования соединительной ткани (связок, стенок сосудов и т. д.). На образование 1 кг молока с жирностью 4 % расходуется порядка 150 мкг меди [10], а её дефицит приводит к снижению биологической доступности железа. Это сопровождается нормоцитарной нормохромной или гипохромной микроцитарной анемией. Цинк (Zn) является компонентом многих металлосодержащих ферментов [8, 9] участвующих в обмене углеводов, белков, липидов и нуклеиновых кислот [10, 11], участвует в регуляции деления клеток, воспроизводстве потомства, выработке белков и пищеварительных ферментов [9, 11]. На образование 1 кг молока с жирностью 4 % расходуется 3,6 мг Zn [10], а его содержание в молоке по разным данным сильно варьирует [12, 13]. Стоит также учитывать, что при балансе ММЭ остро стоит вопрос поступления антагонистов [11]. Так, молибден, сера, железо и цинк снижают всасывание меди [14], медь, кадмий и свинец являются антагонистами цинка.

Исходя из выше сказанного, очевидна необходимость в регулярном контроле содержания цинка и меди в молоке. Целью нашей работы было определение уровня меди и цинка в молоке коров поздней осенью и весной.

В качестве метода исследования использовали атомную абсорбцию в графитовой печи [4]. При изучении уровней концентрации цинка и меди, после кислотного разложения в микроволновой системе пробоподготовки «MARS 5» («CEM», США) пробы молока исследовали с помощью атомно-абсорбционного спектрометра «ZEEnit650P» (Analytik Jena, Германия). При отборе и формировании групп для исследования учитывали количество лактаций и число дойных дней, даты отела, физиологическое состояние животных, уровень молочной продуктивности. Содержание коров привязное, круглогодично.

Таблица 1. Динамика содержания меди в пробах молока за 2020–2021 гг.

Месяц	Ноябрь 2020 г. (n=11)		Март 2021 г. (n=11)		Май 2021 г. (n=11)	
	Cu, мкг/л	Zn, мкг/л	Cu, мкг/л	Zn, мкг/л	Cu, мкг/л	Zn, мкг/л
Минимум	48	2916	109	3888	80	2452
Максимум	351	6272	190	6710	163	6770
Размах	303	3356	81	2822	83	4318
Среднее значение	189	4104	153	4930	118	3752
Стандартное отклонение	95	1122	25	921	25	1119

Содержание меди и цинка в образцах молока поздней осенью (ноябрь) и весной (март, май) стабильно и не выявило достоверных различий (таблица 1). Стоит, однако, обратить внимание, на «разброс» значений внутри групп, особенно в период поздней осени для меди. Самое низкое значение составило 48 мкг/л, самое высокое 351 мкг/л. Относительно стабильно в сравнении с уровнем меди, показал себя уровень содержания цинка (вне зависимости от периода исследования).

По нашему мнению, особенности поступления меди в молоко могут быть связаны с подготовкой к зимнему периоду и индивидуальным перераспределением ее в организме. Участие меди в таких процессах как мобилизация и транспорт железа из депо печени [8, 9] образование соединительной ткани (связок, стенок сосудов и т. д.), синтез половых гормонов требует её присутствия в организме и задерживает выведение с молоком у отдельных животных.

Таким образом, содержание цинка и меди входит в границы предельно допустимых концентраций, и удовлетворяют требованиям СанПиН № 42–123–4889–86 (актуализирован 01.01.2021 г.).

Работа выполнялась при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках выполнения государственного задания Регистрационный номер ЕГИСУ темы НИР ГЗ 2021–2023 – 121052600314–1.

Литература

1. Zamberlin Š., Antunac N., Havranek J., Samaržija D. Mineralelements in milk and dairy products. *Mljekarstvo*, 2012, 62: 111–125.
2. Горбатова К.К., Гунькова П.И. *Биохимия молока и молочных продуктов*. 4-е изд., перераб. и доп. СПб., 2010.
3. Khan I.T., Nadeem M., Imran M., Ullah R., Ajmal M., Jaspal M.H. Antioxidant properties of Milk and dairy products: a comprehensive review of the current knowledge. *Lipids Health Dis.*, 2019, 18(1): 1–14 (<https://doi.org/10.1186/s12944-019-0969-8>).
4. Skalny A.V., Salnikova E.V., Burtseva T.I., Skalnaya M.G., Tinkov A.A. Zinc, copper, cadmium, and lead levels in cattle tissues in relation to different metal levels in ground water and soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019, 26(1): 559–569 ([doi:10.1007/s11356-018-3654-y](https://doi.org/10.1007/s11356-018-3654-y)).
5. Лисеев И.К. ВИ Вернадский: от единства знания к царству разума (цивилизационные мотивы). *Проблемы цивилизационного развития*, 2020, 2(1): 20–34 ([doi:10.21146/2713-1483-2020-2-1-20-34](https://doi.org/10.21146/2713-1483-2020-2-1-20-34)).
6. Безносова Е.А., Безносов Г.А., Устюгов А.Д., Флефель Х.Э. Повышение качества продукции животноводства в зонах рискованного аграрного производства при неблагоприятных факторах окружающей среды. *Аграрный вестник Урала*, 2019, 5(184): 28–32 ([doi:10.32417/article_5d5157e47a3e85.50147466](https://doi.org/10.32417/article_5d5157e47a3e85.50147466)).
7. Габрук Н.Г., Шапошников, А.А. Возможности получения экологически безопасного молока в условиях антропогенного загрязнения окружающей среды. *Региональные геосистемы*, 2007, 5(5): 15–21.
8. Kaneko J.J., Harvey J.W., Bruss M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 6th ed. Amsterdam, 2008.
9. Зайцев С.Ю. *Биологическая химия: от биологически активных веществ до органов и тканей животных*. М., 2017.
10. Харитонов Е.Л. *Физиология и биохимия питания молочного скота*. Боровск, 2011.
11. Скальный А.В. *Микроэлементы: бодрость, здоровье, долголетие*. М., 2019.
12. Dobrzanski Z., Kołacz R., Gorecka H., Chojnacka K., Bartkowiak A. The Content of Microelements and Trace Elements in Raw Milk from Cows in the Silesian Region Polish. *Journal of Environmental Studies*, 2005, 14(5): 685–689.
13. Kinal S., Korniewicz A., Jamroz D., Ziemiński R., Slupczynska M. Dietary effects of zinc, copper and manganese chelates and sulphates on dairy cows. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 2005, 3(1): 168–172.
14. Abramowicz B., Kurek Ł., Chałabis-Mazurek A., Lutnicki K. Copper and iron deficiency in dairy cattle. *Journal of Elementology*, 2021, 26(1): 241–248 (DOI: 10.5601/jelem.2020.25.4.2093).

БИОТЕХНОЛОГИЯ ТВОРОЖНОГО ПРОДУКТА

О.И. Долматова

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Одними из наиболее распространенных и полезных молочных продуктов, пользующихся неизменно большим спросом у населения, являются творожные продукты, которые по пищевой ценности практически ни в чем не уступают таким продуктам животного происхождения как мясо, рыба и яйцо.

Промышленное производство кисломолочных продуктов основано на использовании бактериальных заквасочных культур, флора которых с высокой скоростью сбраживает молочный сахар и создает контролируемый уровень молочнокислого брожения.

Благодаря культивированию заквасок образуются необходимые органолептические свойства молочных продуктов и формируются биозащитные эффекты.

Использование защитных культур заключается во внесении их, как добавочных элементов к основной закваске, для угнетения микрофлоры порчи. Но при этом свойства защитных культур никак не влияют на развитие основной заквасочной культуры, так как их энзимная природа очень похожа. Защитные культуры в пищевом производстве повышают качество и безопасность ферментированной продукции, увеличивают сроки годности без применения различных консервирующих веществ [1].

В настоящее время особенно популярными стали продукты питания функциональной направленности [2 – 4].

Разработано рецептурно-компонентное решение и способ производства творожного продукта с глазурью из сиропа дыни.

С целью продления срока годности продукта на 30 % дополнительно с традиционной заквасочной культурой вносят защитную культуру при выработке творожной основы.

Подготовленные в соответствии с рецептурой компоненты для творожной основы загружают в месильную машину.

Ингредиенты для глазури смешивают до получения однородной массы.

Полученную творожную смесь охлаждают до температуры 9 °С и подают в бункер формовочного аппарата.

Далее творожные сырки направляют в глазировочную машину.

По транспортеру сформированные сырки отправляют в камеру воздушного охлаждения, где при температуре 0 °С продукт окончательно застывает.

Готовые сырки поступают в упаковочный аппарат и укладываются в картонные ящики.

Затем продукт охлаждают в холодильной камере до (2–4) °С.

Полученный творожный продукт отличается улучшенным по сравнению с традиционным продуктом витаминно-минеральным составом.

Литература

1. Долматова О.И., Чернышева Т.Е. Здоровый молочный перекус // Вестник ВГУИТ. 2020. Т. 82. № 2. С. 88–93. doi:10.20914/2310-1202-2020-2-88-93.
2. Гаврилина, А.Д. Кисломолочные продукты как составляющая функционального питания / А.Д. Гаврилина, И.Р. Шелагинова, З.С. Зобкова // Молочная промышленность – 2019. – № 2. – С. 44.
3. Долматова О.И., Зыгалова Е.И. Биотехнология творожного продукта с компонентами растительного происхождения // Вестник ВГУИТ. 2018. Т. 80. № 1. С. 129–132. doi:10.20914/2310-1202-2018-1-129-132.
4. Растительные нутриентные корректоры в технологии замороженных творожных полуфабрикатов / Голубева Л.В., Пожидаева Е.А., Долматова О.И., Болотова Н.В., Илюшина А.В. // Пищевая промышленность. – 2017. – № 1. С. 38–40.

УДК 664.844.002.237

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ КОНЦЕНТРАТОВ ПИЩЕВЫХ ВОЛОКОН,
ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ОВОЩНЫХ СОКОВ****М.А. Кожухова¹, Р.А. Дроздов¹, А.А. Кушнерева², Т.В. Бархатова¹, Т.А. Дроздова¹**¹ Кубанский государственный технологический университет, г. Краснодар, Россия² Кубанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Краснодар, Россия

Создание новых видов продуктов, обогащенных пищевыми волокнами (ПВ), является одним из приоритетных направлений научных исследований, так как данные продукты при регулярном потреблении оказывают антиоксидантное действие на организм человека и способствуют профилактике целого ряда алиментарно-зависимых заболеваний: ожирение, заболевания толстого кишечника, сахарный диабет, атеросклероз, ишемическая болезнь сердца и другие [1, 2].

К ПВ относятся главным образом вещества, образующие клеточные стенки растений и представляющие собой комплекс, сформированный из целлюлозы, гемицеллюлозы, пектина и лигнина. В качестве источников ПВ предложено использовать вторичные сырьевые ресурсы (ВСР) переработки растительного сырья [3]. Значительное количество ВСР (до 40 %) образуется при производстве фруктовых и овощных соков. В большинстве случаев они не находят дальнейшего применения в промышленности, поэтому могут служить недорогим и легкодоступным сырьем для производства ПВ. Установлено, что преимуществами ПВ, полученных из фруктов и овощей, являются высокая водоудерживающая, набухающая способность, устойчивость к действию желчных кислот, ионно-обменные и гелеобразующие свойства, наличие сопутствующих биологически активных веществ: антиоксидантов, витаминов, минеральных элементов [4]. Некоторые ПВ обладают пребиотическими свойствами, то есть способны оказывать позитивный эффект на организм через селективную стимуляцию роста или метаболическую активность нормальной микрофлоры кишечника [5].

Цель нашей работы – определить биотехнологический потенциал концентратов пищевых волокон (КПВ), образующихся при производстве овощных соков, с перспективой их дальнейшего применения в составе пробиотических молочных продуктов.

Объектами исследований служили КПВ, полученные из ВСР, образующихся при производстве соков из тыквы и топинамбура. Для проведения исследований КПВ получали следующим образом: овощи мыли, очищали от несъедобных частей, измельчали, бланшировали острым паром в течение 5 минут для инактивации собственных ферментов, охлаждали и проводили ферментативную обработку препаратом «Pectinex Ultra SP-L» (температура ферментации для тыквы 55±5 °С, для топинамбура – 50±2 °С продолжительности 60 и 70 минут соответственно), затем отделяли сок на лабораторной центробежной соковыжималке «Bosch MES3500». Полученные ВСР (выжимки) собирали, высушивали в поле инфракрасного излучения в сушильном шкафу «Универсал-СД-4» при температуре в центре и на поверхности слоя высушиваемого продукта 55–58 °С до достижения конечного содержания влаги 7–9 %, затем измельчали до порошкообразного состояния (величина частиц 230±30 мкм) и использовали в качестве функциональных добавок в составе кисломолочных напитков, ферментированных пробиотическими культурами. В высушенных и измельченных КПВ определяли: массовую долю сухих веществ – на приборе «Эвлас – 2М», общие и редуцирующие сахара – колориметрическим методом с 3,5 – динитросалициловой кислотой, полисахариды (целлюлоза, гемицеллюлоза, пектин) и полифенолы – по Ермакову А.И. [6], азот – методом Кьельдаля, витамин С – методом капиллярного электрофореза на приборе «Капель-105М», каротин – по ГОСТ 8756.22–80. Образцы ферментированных пробиотических напитков приготавливали следующим образом: высушенные КПВ вносили в молоко в количестве 2,5 %, молочно-растительные смеси пастеризовали в течение 10 минут при температуре 85±2 °С, охлаждали и сквашивали при температуре 37 °С в течение 10 часов с использованием заквасок «Биофлакт-Про» и «Биофлакт-Плюс». В процессе сквашивания контролировали pH и титруемую кислотность (ТК) стандартными методами, ТК выражали в градусах Тернера (Т°). Количество бифидобактерий в сквашенных образцах определяли по ГОСТ 33491–2015. Данные об изменении pH использовали для расчета кинетических показателей: максимальной скорости сквашивания ($V_{\max}$, ед. pH/ч) и времени достижения pH=4,5, по которому судили о продолжительности сквашивания [5]. Контролем служило молоко без добавок.

На первом этапе были проведены исследования по определению химического состава полученных в соответствии с приведенной методикой КПВ тыквы и топинамбура. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Химический состав КПВ

Наименование показателей	Концентрат пищевых волокон	
	Тыквы	Топинамбура
Массовая доля сухих веществ, %	93,46±1,2	93,81±1,2
Растворимые сахара, %		
– общие	21,7±0,2	26,3±0,2
– редуцирующие	10,6±0,1	2,1±0,1
Полисахариды (Пищевые волокна), %	76,70±1,1	75,97±1,1
Азотистые соединения, мг азота/100 г.	234±4	563±5
Витамин С, мг/100г	4,92±0,12	3,33±0,08
Каротин, мг/100г	47,2±0,6	-
Полифенолы, мг/100 г.	392,1±1,5	616,8±1,5

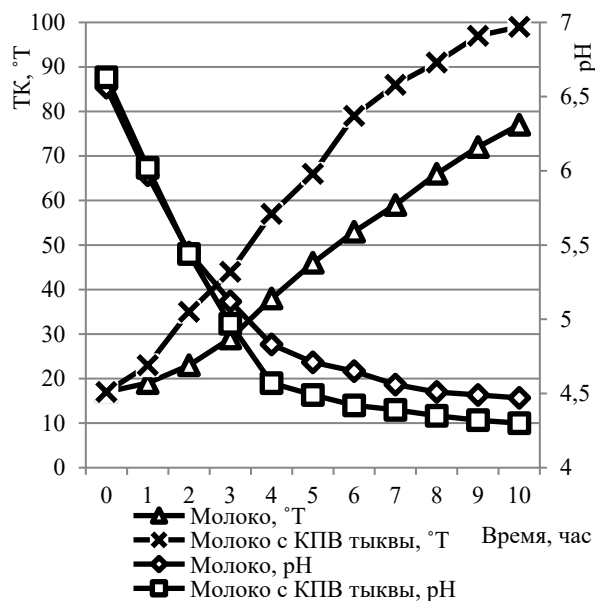
Как видно из полученных данных (таблица 1), в исследуемых КПВ преобладают полисахариды, относящиеся к группе ПВ, которые составляют более 75 % массовой доли сухих веществ. Показано, что данные соединения характеризуются широким спектром позитивного действия на организм человека, они также могут проявлять пребиотические свойства, т. е. стимулировать рост и активность лакто- и бифидобактерий [7, 8].

Установлено также, что в полученных порошках содержатся растворимые сахара, азотистые соединения, присутствуют витамины и полифенолы, обладающие антиоксидантными свойствами. Наличие сопутствующих веществ в составе КПВ повышает эффективность их действия и расширяет сферу функциональной активности. Установлено, что КПВ, полученные из ВСП переработки плодов и овощей, в ряде случаев проявляют более высокую пребиотическую активность по сравнению с очищенными коммерческими препаратами [5].

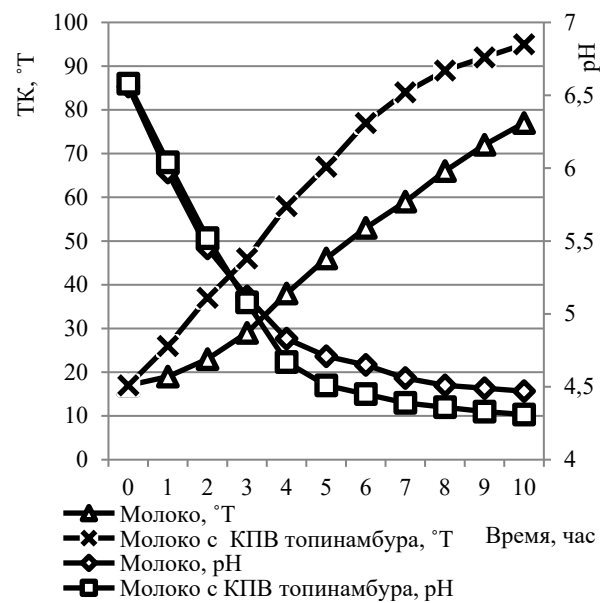
Для оценки биотехнологического потенциала КПВ тыквы и топинамбура их вносили в молочную основу и определяли динамику сквашивания смесей пробиотическими культурами в сравнении с молоком без добавок (контроль).

Результаты, характеризующие изменение кислотности в процессе сквашивания опытных и контрольных образцов, представлены на рисунках 1 и 2. Анализ графических зависимостей показывает, что внесение растительных добавок увеличивает скорость кислотообразования и интенсифицирует весь процесс сквашивания. Так, в опытных образцах конечная кислотность ($pH=4,5$) была достигнута в течение 5–7 часов, в контрольных – в течение 8–9 часов. Наибольший эффект отмечен при использовании закваски «Бифилакт-Про»: максимальная скорость сквашивания в образцах с добавлением высушенного КПВ тыквы составила $V_{1max}=0,515$, с добавлением высушенного КПВ топинамбура – $V_{2max}=0,478$, в то время как в контроле – $V_{kmax}=0,433$. При использовании закваски «Бифилакт-Плюс» аналогичные показатели имели следующие значения: $V'_{1max}=0,488$; $V'_{2max}=0,475$; $V'_{kmax}=0,44$. Микробиологический анализ показал, что сразу после окончания сквашивания закваской «Бифилакт-Про» в опытных образцах количество бифидобактерий было на 2–3 порядка больше, чем в контрольных, а после 8 суток хранения при температуре $4\pm2^{\circ}C$ составило: при внесении высушенного КПВ тыквы – 6×10^{11} КОЕ/г, высушенного КПВ топинамбура – 8×10^{11} КОЕ/г. Это дает основание отнести полученные ферментированные продукты к категории пробиотических.

Таким образом, добавление исследуемых высушенных КПВ к молочной основе интенсифицирует процесс кислотообразования, активизирует рост и повышает стабильность пробиотических культур. Это можно объяснить наличием в составе растительных добавок стимулирующих факторов: сбраживаемых сахаров, биодоступных азотистых веществ, витаминов, минеральных веществ. Важными компонентами, способствующими жизнедеятельности бифидобактерий, являются антиоксиданты, которые снижают негативное воздействие растворенного кислорода на клетки анаэробов. В полученных КПВ тыквы антиоксидантную активность проявляет главным образом каротин и витамин С, в КПВ топинамбура – полифенольные вещества и инулин. В работе [9] показано, что инулин способен проявлять биоантиоксидантные свойства, ингибируя как процессы образования активных форм кислорода, так и реакции цепного перекисного свободнорадикального окисления липопротеидов. Стабилизирует пробиотики и способствует их выживаемости в молочно-растительных средах адгезия микробных клеток на поверхности растительных волокон, что служит защитным барьером для действия различных негативных факторов [10].

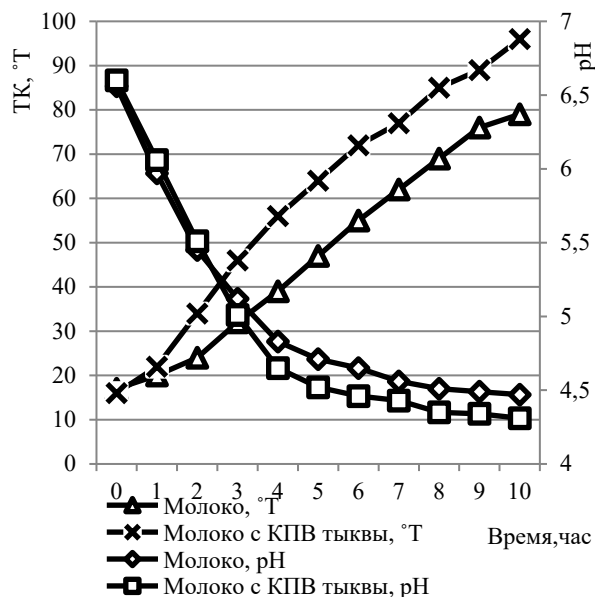


(А)

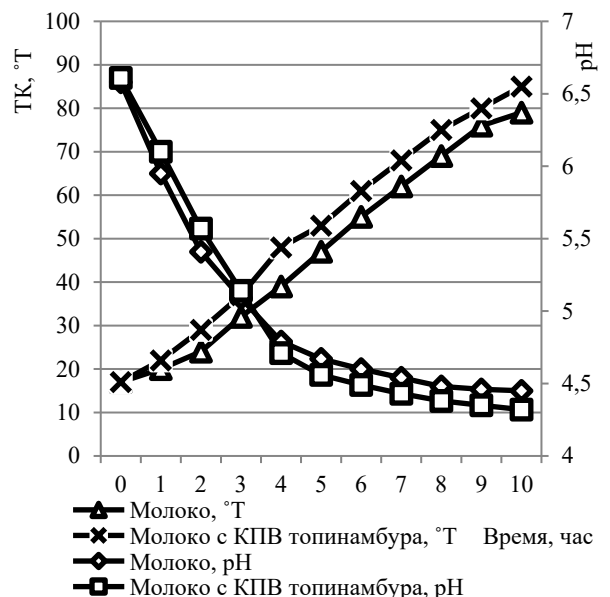


(Б)

Рисунок 1 – Изменение pH и титруемой кислотности (ТК) в процессе сквашивания молочно-растительных смесей с добавлением высушенных КПВ тыквы (А) и высушенных КПВ топинамбура (Б) закваской «Бифилакт-Про»



(А)



(Б)

Рисунок 2 – Изменение pH и титруемой кислотности (ТК) в процессе сквашивания молочно-растительных смесей с добавлением высушенных КПВ тыквы (А) и высушенных КПВ топинамбура (Б) закваской «Бифилакт-Плюс»

В результате проведенных исследований изучены химический состав и биотехнологический потенциал КПВ тыквы и топинамбура, полученных из ВСП сокового производства. Установлено, что внесение данных функциональных ингредиентов в молочную основу позволяет интенсифицировать процесс сквашивания пробиотическими культурами и обеспечить стабильность функциональных свойств продукта в процессе холодильного хранения. Наибольший эффект получен при сквашивании молочно-растительных смесей закваской «Бифилакт – Про». Это дает основание рекомендовать применение КПВ, полученных из ВСП переработки овощей, в биотехнологии пробиотических молочных продуктов в качестве источников пищевых волокон и бифидогенных факторов.

Литература

1. Dhingra, D., Michael, M., Rajput, H., Patil, R. (2011). Dietary fibre in foods: a review. Association of Food Scientists and Technologists. pp. 255–266. DOI: 10.1007/s13197-011-0365-5
2. Rodríguez, R., Jiménez, A., Fernández-Bolaños, J., Guillen, R., Heredia, A. (2006). Dietary fibre from vegetable products as source of functional ingredients. Trends in Food Science & Technology. vol. 17. Issue 1. pp. 3–15. DOI: 10.1016 / j. tifs.2005.10.002
3. Schieber, A., Stintzing, F., Carle, R. (2001). By-products of plant food processing as a source of functional compounds – recent developments. Trends in Food Science & Technology. vol. 12. pp. 401–413. DOI:10.1016/S0924-2244(02)00012-2
4. Ana Paula do Espírito Santo, Nathalie S Cartolano, Thaiane F Silva, Fabiana ASM Soares, Luiz A Gioielli, Patrizia Perego, Attilio Converti, Maricê N Oliveira (2012). Fibers from fruit by-products enhance probiotic viability and fatty acid profile and increase CLA content in yoghurts. International Journal of Food Microbiology. vol. 154. Issue 3. pp. 135–144. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.025
5. Amirtha Puvanenthiran, Chloe Stevovitch-Rykner, Thu H. McCann, Li Day. (2014). Synergistic effect of milk solids and carrot cell wall particles on the rheology and texture of yoghurt gels. Food Research International. vol. 62. pp. 701–708. DOI: 10.1016 / J. FOODRES.2014.04.023
6. Ермаков А.И. Методы биохимического исследования растений // Изд. 2-е, перераб. и доп. – Ленинград: Колос. Ленингр. отд-ние, 1972. – 456 с.
7. Padayachee A. Complexity and health functionality of plant cell wall fibers from fruits and vegetables / A. Padayachee, L. Day, K. Howell, M.J. Gidley // Critical reviews in food science and nutrition. – 2017. – № 57. – P. 59–81
8. Mohammadi R. The starter culture characteristics of probiotic microorganisms in fermented milks / R. Mohammadi, S. Sohrabvandi, A. Mohammad Mortazavian // Engineering in Life Sciences. – 2015. – № 12. – P. 399–409
9. Даниленко А.Л. Изучение антиокислительной активности инулина в модельных тест-системах / А.Л. Даниленко, А.Н. Мамцев, Р.Р. Максютюв и др. // Технологии 21 века в пищевой, перерабатывающей и легкой промышленности. – 2013. – № 7. – С. 142–149. 26
10. Kristo, E., Biliaderis, C.G., Tzanetakis, N. (2003) Modelling of rheological, microbiological and acidification properties of a fermented milk product containing a probiotic strain of Lactobacillus paracasei. International Dairy Journal. vol. 13. pp. 517–528. DOI:10.1016/S0958-6946(03)00074-8

УДК: 633.491+579.64:631.532/535

РАСТИТЕЛЬНО-БАКТЕРИАЛЬНЫЕ АССОЦИАЦИИ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* И *EX VITRO*: ЭФФЕКТ КОИНОКУЛЯЦИИ**Н.В. Евсеева¹, К.Ю. Каргаполова², О.В. Ткаченко², Г.Л. Бурьгин²**¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия²Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, Саратов, Россия

Ассоциативные ризосферные стимулирующие рост растений бактерии (PGPR) с успехом применяются в практике сельского хозяйства. В предварительных исследованиях были изучены штаммы ризобактерий различных таксономических групп, положительно влияющих на рост микрорастений картофеля. Были выделены бактериальные штаммы, способные активизировать развитие корневой системы микроклонов картофеля *in vitro*, стимулировать адаптацию полученных регенерантов к условиям *ex vitro*, а также повышать урожай мини-клубней. В частности, было показано, что ассоциативные ризобактерии *Azospirillum brasilense* Sp245 и *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2. в отдельности обладают способностью стимулировать рост микрорастений картофеля в условиях *in vitro* и *ex vitro* (Tkachenko et al., 2015; Burygin et al., 2019).

Цель исследования – выявление и оценка эффекта коинокуляции бактериями *Azospirillum brasilense* Sp245 и *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2. микрорастений картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сортов Невский и Кондор.

Для работы были использованы бактерии из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН и микрорастения картофеля из коллекции микроклонов картофеля *in vitro* ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ. Микрорастения картофеля, культивировали *in vitro* на безгормональной жидкой питательной среде Мурасиге-Скуга и инокулировали суспензиями бактерий в различных сочетаниях: 1) *A. brasilense* Sp245 на этапе микрочеренкования (0 сутки культивирования); 2) *O. cytisi* IPA7.2 на 14 сутки; 3) двумя штаммами одновременно на 14 сутки; 4) поочередно *A. brasilense* Sp245 на 0 сутки и затем *O. cytisi* IPA7.2 на 14 сутки культивирования. Для инокуляции микрочеренков картофеля использовали суспензии бактерий в концентрации 10^6 кл/мл питательной среды. В контрольном варианте растения выращивали стерильно. 30-ти суточные растения высаживали для адаптации *ex vitro* в сосуды с почвой и выращивали в течение 20 суток в оранжерее. После этого, растения переносили в открытый грунт и выращивали до получения клубней. На всех этапах оценивали физиолого-морфометрические параметры растений (длина побегов и корней, количество и площадь листьев), а также продуктивность растений на заключительном этапе. При культивировании микрорастений картофеля отмечались сортовые особенности: растения сорта Невский достоверно превосходили сорт Кондор по высоте побегов, количеству листьев, длине и количеству корней. Рост-стимулирующий эффект от инокуляции бактериями в условиях *in vitro* и *ex vitro* также сильнее проявлялся именно на сорте Невский. Бактерии *A. brasilense* Sp245 оказывали более существенное положительное влияние на растения в условиях культуры *in vitro*, тогда как рост-стимулирующий эффект от инокуляции штаммом *O. cytisi* IPA7.2 сильнее проявился после высадки растений в сосуды с почвой в оранжерею и затем в открытый грунт. Отмечен положительный эффект коинокуляции после высадки растений в почву в условия оранжереи и поля. При этом по способу инокуляции (между вариантами 3 и 4) предпочтение следует отдать одновременной коинокуляции на 14 сутки, в том числе из-за технологического удобства методики.

По результатам анализа данных экспериментов установлено влияние бактериальных штаммов как по отдельности, так и во взаимодействии, которое по-разному проявлялось на различных этапах культивирования растений. Кроме того, отмечена существенная зависимость рост-стимулирующего эффекта бактерий от генотипа картофеля. Максимальный положительный эффект при взаимодействии двух штаммов отмечен на этапе выращивания инокулированных растений в открытом грунте. Полученные результаты показывают, что использование бактериальной коинокуляции микрорастений при микроклональном размножении может быть признано эффективным приемом в технологии получения оздоровленного посадочного материала картофеля.

Литература

Burygin G.L., Kargapolova K.Y., Kryuchkova Y.V., Avdeeva E.S., Gogoleva N.E., Ponomaryova T.S., Tkachenko O.V. *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 promotes growth of potato microplants and is resistant to abiotic stress. // World J Microbiol Bio-technol. – 2019. – V. 35. – P. 55. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2633-x>

Tkachenko O.V., Evseeva N.V., Boikova N.V., Matora L. Yu., Burygin G.L., Lobachev Y.V., Shchyogolev S. Yu. Improved potato microclonal reproduction with the plant-growth promoting rhizobacteria *Azospirillum* // Agron. Sustain. Develop. – 2015. – V. 35. – P. 1167–1174. doi 10.1007/s13593-015-0304-3

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 19-016-00116.

ИЗУЧЕНИЕ ВИДОВОГО СОСТАВА АКТИВНОГО ИЛА В ПРОЦЕССЕ АДАПТАЦИИ К СТОЧНЫМ ВОДАМ КОНДИТЕРСКОЙ ФАБРИКИ

О.С. Корнеева¹, Э.А. Борисова², Т.В. Свиридова¹, Г.П. Шуваева¹, О.Л. Мещерякова¹

¹ Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

² ООО «КДВ ВОРОНЕЖ», Воронежская область, Рамонский район, Россия

Сточные воды кондитерских фабрик относятся к высококонцентрированным, содержат специфические загрязняющие вещества, образующиеся в процессе переработки сахара, патоки, какао, орехов, молока, фруктового пюре и другого пищевого сырья. Использование пищевых добавок, усилителей вкуса, красителей, ароматизаторов, стабилизаторов, производство нескольких видов изделий за одну смену, многокомпонентная рецептура – приводят к образованию нового, более сложного непостоянного состава сточных вод [1]. Эта особенность определяет специфику качественного и количественного распределения отдельных групп организмов в активном иле и оказывает значительное влияние на эффективность работы очистных сооружений.

На сегодняшний день не все действующие предприятия оборудованы очистными сооружениями, либо работают малоэффективно. При проектировании кондитерских фабрик предусматривали сброс сточных вод в системы городских водоотводящих сетей практически без очистки. Что может привести к зарастанию водоотводящих коллекторов и снижению эффективности биологической очистки сточных вод на городских очистных сооружениях. Поэтому, вопрос организации локальной очистки стоков кондитерской фабрики является весьма актуальным. Одним из наиболее эффективных способов удаления различных растворенных органических загрязнений из сточных вод является биологическая очистка. Для улучшения окислительной мощности аэротенков и управления биохимическим процессом очистки сточных вод необходим активный ил, определенного видового состава, способствующий максимальному извлечению загрязняющих веществ.

В связи с этим, для интенсификации биохимической деятельности организмов активного ила городских очистных сооружений г. Воронежа проводили его адаптацию к стокам кондитерской фабрики в лабораторных и производственных условиях. В процессе адаптации изучали влияние внешних факторов на изменение биоценоза активного ила, контролировали ХПК; концентрацию растворенного кислорода; температуру и рН сточных вод; дозу ила по объему; прозрачность надиловой воды; количество индикаторных микроорганизмов активного ила.

Установлено, что адаптация активного ила городских сточных вод к стокам кондитерской фабрики происходит в течение 6 месяцев, при этом наблюдали изменение соотношения организмов в его составе. В начале адаптационного периода преобладали нитчатые бактерии и бентосные раковинные амёбы. За первые 30 суток адаптации количество нитчатых бактерий увеличилось в 5 раз и бентосных раковинных амёб – 8 раз, что способствовало вытеснению инфузорий и коловраток и снижению эффективности очистки до 25 %. При этом наблюдали вспухание и разрушение хлопьев активного ила. По мере адаптации и подбора условий функционирования активного ила постепенно количество нитчатых бактерий и амёб снижалось, начинали интенсивнее развиваться индикаторы хорошей работы активного ила – свободноплавающие и прикрепленные инфузории. Этому способствовало увеличение растворенного кислорода в очищаемых стоках до 7 мг/дм³ и снижение концентрации загрязняющих веществ в сточных водах до 10000 мг/дм³. Изучение влияния температуры и рН сточных вод на видовой состав организмов активного ила показал, что развитию индикаторных организмов способствует интервал температур 20–30 °С, рН 7–7,5. Повышение температуры приводило к пенообразованию, увеличению численности нитчатых бактерий, развитию гифомицетов, нематод, исчезновению инфузории и появлению застойных зон. При поступлении кислых стоков наблюдали интенсивное развитие гифомицетов, ил становился рыхлым, надиловая вода – мутная, доза ила по объему составляла 975 см³/дм³.

После 6 месяцев адаптации в составе активного ила присутствовали нитчатые бактерии, бентосные раковинные амёбы, свободноплавающие и прикрепленные инфузории, коловратки в соотношении 1 : 1,8 : 3 : 0,3; доза ила по объему составляла 920 см³/дм³, прозрачность надиловой воды – 35 см, эффективность очистки – 99,1 %, а вода соответствовала всем нормативам Росприроднадзора на сброс.

УДК 632.911.2:632.913

ДИАГНОСТИКА ВОЗБУДИТЕЛЯ СОСУДИСТОГО БАКТЕРИОЗА КРЕСТОЦВЕТНЫХ МЕТОДОМ ДОТ-ИММУНОАНАЛИЗА**М.А. Кузнецов¹, А.А. Щербаков¹, С.В. Иващенко¹, О.С. Ларионова¹, М.Н. Киреев²**¹ Саратовский ГАУ им. Н.И. Вавилова, Россия² ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, Россия

Сосудистый бактериоз крестоцветных – широко распространённое заболевание сельскохозяйственных культур, поражающее до 90 % урожая и ведущее к его значительным потерям как на поле, так и – особенно – во время хранения [1]. Возбудителем является *Xanthomonas campestris* (*X. campestris*), широко распространённая в природе и являющаяся опасным фитопатогеном. Заражение растений происходит через корневую систему и поверхность листовых пластин посредством насекомых-вредителей и капель влаги [2]. Важной особенностью возбудителя является способность в неблагоприятных для него условиях вызывать инфекцию, протекающую без внешних признаков поражения растения или с незначительным поражением.

На сегодняшний день, эффективных методов борьбы с фитопатогеном не существует. Приемлемыми способами профилактики заражения и распространения заболевания на сегодняшний день считаются: соблюдение севооборота, выращивание устойчивых сортов и гибридов, использование доброкачественных семян и их протравливание перед высадкой в грунт. Большое значение имеет борьба с сорными растениями семейства крестоцветных, которые способствуют распространению возбудителя и чьи растительные остатки благоприятствуют накоплению возбудителя в почве [3]. Связано это, в том числе, с тем, что развитие инфекции способствует развитию других заболеваний, таких как кила, чёрная ножка и фузариозное увядание – что приводит к массовой гибели рассады и, как следствие, потерям урожая.

Важным является также осуществление санитарного контроля продукции, поступающей на хранение, и мест, где оно производится. Такие заболевания как слизистый бактериоз крестоцветных, точечный некроз, белая и серая гнили, сопутствующие вышеперечисленным инфекциям, способны приводить к порче более 70 % [4] собранного урожая, что приводит к большим экономическим потерям и ухудшает качество товара, поступающего в торговую сеть.

Следует отметить, что, согласно требованиям ГОСТ, предъявляемым к свежей белокочанной капусте [5], наличие признаков поражения перечисленными выше заболеваниями является недопустимым. Однако, визуальные методы контроля, предлагаемые для выявления этих признаков, недостаточны из-за возможности скрытого развития патогена.

Это делает актуальным вопрос о выборе метода выявления сосудистого бактериоза крестоцветных. Основными критериями, которым должен соответствовать метод, являются: точность, скорость выполнения анализа, малая трудоёмкость, минимальные требования к оснащению лаборатории и квалификации персонала.

Применение классических методик визуального обнаружения признаков заболевания и выделения возбудителя в чистую культуру с этой точки зрения нецелесообразно. Они имеют значительную трудоёмкость и требуют больших затрат времени. С учётом размеров выборки из каждой партии (не менее 15 образцов, согласно ГОСТ), это требует содержания при лаборатории большого штата сотрудников и соответствующих расходов – что, с учётом объёмов выращивания капусты белокочанной (837 тыс. тонн по данным 2018 года) [6], крайне нецелесообразно.

На сегодняшний день, наиболее эффективными являются молекулярно-генетические и серологические методы диагностики. Первые представлены различными вариантами и модификациями полимеразно-цепной реакции (ПЦР) и достаточно широко распространены в лабораторной практике. Метод обладает высокой чувствительностью (порядка 10^2 КОЕ/мл) [7] и точностью (погрешность 0,01 %) и хорошо отработан на практике – в частности, для микроорганизмов вида *X. campestris* созданы библиотеки праймеров, позволяющие идентифицировать отдельные их подвиды и патовары [8, 9]. Однако, его серьёзными недостатками являются: дороговизна оборудования и расходных материалов, длительность проведения анализа и относительная сложность пробоподготовки.

Этих недостатков лишены серологические методы.

Наибольший интерес с этой точки зрения представляет метод дот-иммуноанализа (ДИА). Сущность метода заключается во взаимодействии меченых коллоидным золотом специфических антител к антигенам выявляемого возбудителя на нитроцеллюлозной подложке. Основными преимуществами метода являются: скорость выполнения анализа, простота постановки реакции, доступность и относительная дешевизна необходимых расходных материалов. Ярко выраженная цветовая реакция удобна для визуального учёта результатов – при качественном анализе, и для использования в автоматизированных системах – при количественном. Анализ проводится с использованием небольших количеств взаимодействующих веществ, что позволяет не только свести их расход к минимуму, но и проводить несколько исследований одновременно – что позволяет создавать тестовые системы с высокой эффективностью и, в совокупности с другими качествами, делает метод перспективным [10, 11].

Целью данной работы было изучение возможности диагностики возбудителя сосудистого бактериоза крестоцветных методом дот-иммуноанализа. В ходе работы решались задачи по получению гипериммунной сыворотки, содержащей соответствующие антитела, и определению её чувствительности.

Работа была выполнена на базе Саратовского государственного аграрного университета им. Н.И. Вавилова и РосНИИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора (г. Саратов).

Гипериммунную сыворотку получали подкожной иммунизацией кроликов препаратом дезинтегрированных клеточных мембран. Источником микробных клеток для получения препарата служила культура штамма *X. campestris* B-610. Адьювантом выступала химическая полиэлектrolитная субстанция, состоящая из 0,05 %-й раствора полиазолидинамммония, модифицированного гидрат-ионами галогенов, в физиологическом растворе. Для проведения иммунизации использовали 1 мл смеси антигена и адьюванта в соотношении 1:1. Иммунизация проводилась семикратно, с интервалом между последующими иммунизациями в 2 недели, с предварительным отбором крови для определения титра специфических антител [12].

Для дот-иммуноанализа использовались препараты культуры возбудителя, экстракта растений капусты белокочанной (*Brassica oleracea*) сорта «Июньская» без признаков заболевания и экстрактов больных растений. Образцы приготавливались в 1 мл физиологического раствора и брались как в целом виде, так и в разведениях 1:10 и 1:100.

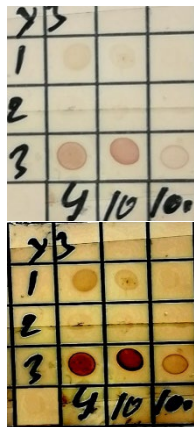
Приготовление маркера – коллоидного раствора золота с диаметром частиц 15–17 нм – осуществляют по методу Г. Френса [13]. Приготовление конъюгата коллоидного золота с белком А стафилококка проводилось методом простой физической адсорбции.

Для постановки дот-иммуноанализа использовали нитроцеллюлозную мембрану фирмы «Миллипор» типа НА с размером пор 0,45 мкм. На её поверхность наносили по 2 мкл исследуемых препаратов в различных разведениях, после чего производили подсушивание на воздухе. Далее, мембрану с нанесёнными на неё образцами помещали в 3 %-й раствор БСА для блокировки неспецифических сайтов связывания, после чего проводили отмывку в 0,05 %-м р-ре Твин 20 и трёхкратно ополаскивали деионизированной водой. Затем подложка помещалась в специфическую гипериммунную сыворотку, взятую в экспериментально установленном оптимальном разведении 1:100 и инкубировалась 30 мин. на шейкере при комнатной температуре. Далее, проводилась отмывка мембраны в растворе Твин 20 и двукратное ополаскивание деионизированной водой. Отмытую мембрану помещали в раствор конъюгата коллоидного золота с белком А и выдерживали до появления окраски.

Результаты дот-иммуноанализа фиксировались при помощи цифровой фототехники. Для улучшения считываемости результатов, снимки подвергались последующей обработке в фоторедакторе с изменением параметров яркости и контрастности.

Анализ полученных результатов представлен на рисунке 1 и показывает, что антиген клеточной стенки возбудителя сосудистого бактериоза крестоцветных определяется в препаратах микробной культуры и поражённых тканей листьев капусты белокочанной сорта «Июньская» в разведениях 1:10 и 1:100, при этом реакция с гомогенатом здоровых растений отсутствует.

Также, обращает на себя внимание различие в интенсивности окраски образцов поражённых возбудителем растительных тканей и чистой микробной культуры. В частности, для уверенного обнаружения цветной реакции с чистой культурой потребовалось фотографирование подложки и последующая ретушь изображения с изменением настроек яркости и контрастности (рисунок 2). В свою очередь, реакция с препаратом заражённых растительных тканей заметна даже при минимально взятом разведении.



На рисунке: 1 – препарат культуры *X. campestris* В-610, 2 – препарат тканей здоровых растений, 3 – препарат тканей зараженных растений

Рисунок 1 – Испытание чувствительности и селективности диагностического препарата на основе антигена клеточной стенки *X. campestris* методом дот-иммуноанализа (до цифровой фоторетуши)

На рисунке: 1 – препарат культуры *X. campestris* В-610, 2 – препарат тканей здоровых растений, 3 – препарат тканей зараженных растений

Рисунок 2 – Испытание чувствительности и селективности диагностического препарата на основе антигена клеточной стенки *X. campestris* методом дот-иммуноанализа (после цифровой фоторетуши)

Полученные результаты свидетельствуют о том, что метод дот-иммуноанализа обладает достаточной чувствительностью и может эффективно применяться для выявления возбудителя сосудистого бактериоза крестоцветных на растительных объектах. Это позволяет говорить о возможности создания индивидуальных и комплексных систем экспресс-тестов, пригодных для использования в том числе в полевых условиях и непосредственно в плодоовощных хранилищах. Как следствие, появляется возможность оперативно отслеживать качество продукции, как поступающей от производителя, так и подлежащей реализации, и надлежащим образом корректировать условия её хранения для минимизации возможных потерь, в том числе связанных с состоянием самих хранилищ. Также, это позволяет объективно и с большей эффективностью проводить сортировку плодоовощной продукции и выбраковку не соответствующих стандартам единиц – что может положительно сказаться на качестве продуктов питания, реализуемых через сеть розничной торговли. Дополнительным эффектом может стать ужесточение требований фитосанитарного контроля, в том числе предъявляемых к импортируемой и экспортируемой продукции, что – благодаря лучшему качеству товара – может создать для отечественного производителя конкурентное преимущество.

Литература

- Игнатов А.Н. Распространение возбудителей опасных бактериозов растений в Российской Федерации // Бактериальные и фитоплазменные болезни сельскохозяйственных растений. Защита картофеля: сб. тр. междунар. науч.-практич. конф. – Большие Вяземы: ВНИИ фитопатологии, 2014 г. № 2. С. 53–57.
- Козулин В.В. Углеводсодержащие биополимеры *Xanthomonas campestris* и их роль в фитопатогенных процессах: Автореф... дис. д-ра биол. наук. Саратов: СГАУ, 2009. – 21 с.
- Мазурин Е.С., Джалилов Ф.С., Игнатов А.Н. Диагностика зараженности семян капусты сосудистым бактериозом методом ИФА // Доклады ТСХА. 2009. Вып. 281. С. 24–26
- Попов Ф.А. Болезни капусты белокочанной в период хранения / Ф.А. Попов // Защита растений и карантин. – 2011. – № 9. – С. 25–28.
- ГОСТ 51809 – 2001 Капуста белокочанная свежая, реализуемая в розничной торговой сети. – М.: Стандартиформ, 2010. – 10 с.
- Плугин А.Г. Посевные площади и валовые сборы капусты в России. Итоги 2018 года [Электронный ресурс] / А.Г. Плугин // Экспертноаналитический центр агробизнеса. – Режим доступа: <https://abcentre.ru/news/posevnyye-ploschadi-i-valovyye-sbory-kapusty-v-rossii-itogi-2018-goda> (дата обращения 22.05.2020).
- Мазурин Е.С., Джалилов Ф.С., Игнатов А.Н., Варицев Ю.А. Усовершенствование диагностики зараженности семян капусты сосудистым бактериозом методом иммуноферментного анализа // Известия ТСХА. 2009. Вып. 1. С. 66–72
- Lema, M. Identification of Sources of Resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Brassica napus Crops / M. Lema, P. Soengas, P. Velasco, M. Francisco, M.E. Cartea // Plant Dis. – 2011. – V. 95. – P. 292–297. 101
- Lizyben, C. Characterisation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolates from South Africa using genomic DNA fingerprinting and pathogenicity tests / C. Lizyben, Cornelius C.B. // Eur J Plant Pathol. – 2012. – V. 133. – P. 811–818.
- Носкова О.А. Применение дот-иммуноанализа для выявления антигенов чумного микроба в посевном материале / О.А. Носкова, Т.Ю. Загоскина, Е.Н. Субычева // Проблемы особо опасных инфекций. – 2014 – Вып.3. – С. 69–71.
- Полтавченко А.Г. Выбор системы детекции для мультиплексного дот-иммуноанализа антител / А.Г. Полтавченко, А.В. Ерш, Ю.А. Крупницкая // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016 – 61 (4) – С. 229–233.
- Кузнецов М.А., Щербаков А.А., Савина С.В., Скоряков В.М., Иващенко С.В., Муртаева В.С. Получение специфических антител к клеточным мембранам *Xanthomonas campestris* // Аграрный научный журнал. 2017. № 6, С. 46–49.
- Frens G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspension // Nature Phys. Sci. 1973. Vol. 241. № 1. P. 20–22.

РАЗРАБОТКА КОРМОВЫХ ДОБАВОК НА ОСНОВЕ ТРАНСФОРМАЦИИ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ ГРИБАМИ-БАЗИДИОМИЦЕТАМИ

*А.В. Кураков¹, А.В. Барков², С.А. Кулачкова¹, А.В. Шнырева¹, Е.Ю. Кожеевникова²,
Е.Г. Кондратьева³, В.А. Терехова¹, В.С. Садыкова⁴*

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Российский государственный университет нефти и газа им. И.М. Губкина, Россия

³ ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии, Институт биохимии им. А.Н. Баха

⁴ Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва, Россия

Одним из путей использования органических отходов, представляющих недорогие органические субстраты в новые ценные продукты, является их биоконверсия в корма. Грибы-базидиомицеты являются перспективными организмами для решения этой задачи. Они способны к деструкции самых разнообразных органических соединений, включая труднодоступные. Это позволяет применять их для создания кормовых продуктов на субстратах, которые не могут использовать дрожжи и многие бактерии. Содержание нуклеиновых кислот в их биомассе значительно меньше, чем в прокариотах. Среди них есть виды, которые обладают ценными питательными и лечебными свойствами [1–3]. Вместе с тем, биотехнологий получения кормовых добавок на основе базидиомицетов, использующих в качестве субстрата органические отходы крайне мало.

Целью работы был поиск штаммов грибов-базидиомицетов для биоконверсии различных органических отходов в кормовые добавки.

Для разработки кормовых добавок в качестве исходных органических отходов и относительно дешевых субстратов были взяты пивная дробина, свекловичный жом, жмых подсолнечника, пшеничные отруби, древесные опилки и пшеничная солома. Для отбора нужных штаммов грибов создали рабочую коллекцию из разных таксонов базидиомицетов из коллекций кафедры микологии и альгологии Московского университета, Российского университета нефти и газа и Ботанического института РАН, а также провели сбор плодовых тел и выделение новых культур.

Для идентификации грибов использовали рекомендуемые ключи [4 и другие]. Большинство коллекционных штаммов и отобранные изоляты были определены также по молекулярно-генетическим признакам (секвенированием ITS1 и ITS2 рДНК) [5]. Нуклеотидные последовательности штаммов, прошедших первичный отбор, депонированы в Генбанке.

Первичный скрининг штаммов основывался на данных в литературе о питательных и лечебных свойствах представителей тех видов, которые были в созданной коллекции, оценке их скорости роста, целлюлазной и фенолоксидазной активностях при росте на агаровых средах, и интенсивности зарастания изучаемых субстратов.

Линейную скорость роста штаммов оценивали на сусло-агаре и картофельно-глюкозный агаре при 28 °С в течение 14-ти суток, измеряя диаметр растущей колонии один раз в сутки [6]. Качественную оценку целлюлазной проводили на среде с добавлением 2,0 г Na-карбоксиметилцеллюлозы в качестве единственного источника углерода [7]. Спустя 5 суток культивирования при 28 °С поверхность чашек заливали на 5 минут аптечным раствором Люголя («Московская фармфабрика», Россия), разведённым дистиллированной водой в соотношении 1:20, после чего раствор Люголя сливали. Целлюлазную активность оценивали по наличию зоны просветления вокруг колонии гриба, рассчитывая коэффициент целлюлазной активности по формуле [8]: $RA = \frac{S_{\text{зоны просветления}} - S_{\text{колонии}}}{S_{\text{колонии}}}$, где RA – коэффициент целлюлазной активности; $S_{\text{зоны просветления}}$ – площадь неокрашенного участка вокруг мицелия; $S_{\text{колонии}}$ – площадь, занимаемая мицелием гриба.

Оценку фенолоксидазной активности проводили по методу Бавендамма на чашках Петри с сусло-агаром с добавлением 3,5 г/л галловой кислоты («Диаэм», Россия) в качестве субстрата [6]. Спустя 5 суток культивирования при 28 °С оценивали интенсивность коричневой окраски субстрата вокруг растущего мицелия с обратной стороны чашки Петри по 4-х-балльной шкале: интенсивная, умеренная, слабая окраска реверса и отсутствие окраски.

Для предварительного тестирования роста грибов на разных субстратах применяли чашки Петри и большие пробирки, затем использовали в пластиковых стерильных плоских контейнерах и флаконах на 500 мл, что позволяло оценить активность разложения субстратов по эмиссии диоксида углерода.

Скорость зарастания органических отходов определяли по интенсивности распространения мицелия при 28° С в чашках Петри и вглубь пробирки, в которых они были помещены, предварительно простерилизованные и увлажненные.

Посевной материал для твердофазного выращивания штаммов на органических отходах получали путем их погруженного культивирования на стандартной глюкозо-соевой среде на ротационном шейкере при температуре 28 °С и скорости вращения 250 об/мин в течение 4–8 суток в зависимости от штамма. Затем получали 5-ти суточные посевные культуры 2-ой генерации.

Последующий отбор штаммов проводили на основе данных по антибиотической и ферментативной активностям посевных культур, эффективности переработки штаммами отходов (динамике выделения CO₂) и обогащению их протеинами, жирами, улучшению перевариваемости.

Антибиотическую активность штаммов определяли в культуральной жидкости методом лунок с тест-культурами *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* 209P, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 2091. Активность КМЦ-азы (КМЦ, Sigma), глюкозидазы, ксиланазы (субстрат – ксилан буковый, Sigma), маннаназы (галактоманнан, Megazyme), полигалактуроназы (калиевая соль ПГК, Sigma) фитазы (фитат риса, Sigma), хитиназы (хитин коллоидный), ламинариназы (ламинарин, Sigma), амилазы (крахмал Экос-16 чда) и пептидаз (казеин) в культуральной жидкости штаммов измеряли согласно рекомендуемым стандартным методам [9–11 и др.]. Все штаммы, прошедшие первичный отбор, были проверены на токсичность к инфузориям *Paramecium caudatum* [12].

Динамику выделения диоксида углерода при твердофазной конверсии органических отходов грибами изучали при 28° С. Активность рассчитывали в мкг C-CO₂/г субстрата (в.с.) в час на 0, 3, 6, 9 и 12–13 сутки. Перед измерением флаконы, в которых были засеянные грибами субстраты, закрывали резиновыми пробками, сразу после этого и через 1 час отбирали пробы воздуха для определения концентрации диоксида углерода. Использовали газовый хроматограф Кристаллюкс 4000М с детектором по теплопроводности (температура детектора 60° С) на колонке с адсорбентом «Полисорб» длиной 3,2 м (температура колонок 50° С). В качестве газа-носителя служил гелий. В качестве контроля были флаконы, в которых внесена среда, не засеянная грибами.

Для твердофазного культивирования штаммов с целью получения кормовых добавок для химических анализов их состава использовали термостойкие пластиковые лотки (170x140x25 мм) с крышкой. В них помещали органические субстраты, стерилизовали автоклавированием, засеивали погруженной культурой штаммов, тщательно перемешивали и инкубировали при 28 °С в течение 12 суток. Исходные образцы субстратов (0 сутки) и после твердофазного культивирования штаммов (на 3, 6, 9, 12 сутки) высушивали в конвекционной сушилке DDV-10 (Rawmid) при 40 °С в течение 9 часов. Сухие образцы измельчали на лабораторной ножевой мельнице и переносили в стерильные пластиковые пробирки с герметичной крышкой. В них определяли содержание общего азота [13], сырого жира [14], сырой клетчатки [15]. Трансформированные грибами органические отходы на 3 и 6 сутки (период максимальной активности роста штаммов) дополнительно анализировали на содержание растворимых сахаров [16], легкогидролизуемых углеводов (крахмал) [16], сырой золы [17], фосфора [18] и кальция [19]. Все анализы сделаны в государственной станции агрохимической службы по стандартным методикам.

Все эксперименты проводили в 3-х кратной повторности, и данные были статистически обработаны.

В результате проведенной работы создана коллекция из 163 штаммов, в которую вошли 95 свежесделанных и 68 коллекционных штаммов, преимущественно из коллекции кафедры микологии и альгологии МГУ. Новые штаммы были выделены из плодовых тел макромицетов, собранных в разных природно-климатических регионах. В целом эта рабочая коллекция включала 96 видов 55 родов представителей Agaricomycotina, главным образом афиллофороидных грибов – сапротрофных ксилотрофов. Для последующего скрининга из неё были отобраны 58 штаммов на основе данных в литературе об их питательной ценности, медицинских свойствах и способности к деструкции лигноцеллюлозных субстратов.

Оценка скорости роста, целлюлазной и фенолоксидазной активности на агаровых средах позволила отобрать 23 из 58 штаммов. Это были виды родов *Laetiporus*, *Ganoderma*, *Trametes*, *Flamulina*, *Pleurotus*, *Lentinus*, *Inonotus*, *Coprinus*, *Hypsizygus*. Сравнительный анализ 23 штаммов по интенсивности распространения и проникновения их мицелия внутрь органических отходов, проведенный в пробирках и чашках Петри, выявил 12 штаммов с максимальными значениями этих показателей. Все они не проявляют токсичных свойств согласно тесту, проведенному с инфузориями *Paramecium caudatum*.

Была отработана технология глубинного выращивания этих штаммов для получения посевного материала. Она позволяла иметь не менее 8–15 г. воздушно-сухой биомассы в 1 л среды на 5 сутки в зависимости от штамма. Максимальная продуктивность установлена у штаммов *Flammulina velutipes*, *Pleurotus ostreatus*, не менее 13 г./л. Дальнейшая оптимизация условий культивирования, как показывают предварительные опыты, может увеличить накопление биомассы до 15–18 г. в 1 л среды большинством штаммов.

Половина из 12 штаммов обладают слабой антибиотической активностью к *Candida albicans* ATCC 2091 и умеренной – к *Bacillus subtilis* ATCC 6633, что, возможно, придаст кормовой добавке свойства ингибировать патогенные микроорганизмы в пищеварительном тракте животных.

Установлено, что штаммы проявляют активность внеклеточных гидролаз, важных для усвоения кормов животными и птицей, но они нередко существенно у них различаются. Протеолитическую активность в диапазоне 23,5–68,6 мкмольТир/(мл мин) продемонстрировали только штаммы рода *Pleurotus*, *Flammulina* и *Ganoderma*. Все штаммы, за исключением одного представителя рода *Trametes*, проявили довольно высокую удельную активность КМЦ-азы и ксиланазы. Практически аналогичная ситуация была с активностью α -амилазы у изученных штаммов. Активности маннаназы, полигалактуроназы, ламинаризы, глюкозидазы проявляли, как правило, 5 или 6 штаммов из 12. Хитиназная и фитазная активности была обнаружена у всех штаммов. Расщепление хитина было более эффективным, чем фитина. Активность у отдельных штаммов достигала 10 ед./мл, и в среднем была на порядок выше, чем фитазная активность, которая лежала в интервале 0,28–0,60 ед./мл.

Интенсивность переработки органических отходов по скорости выделения диоксида углерода при твердофазном культивировании грибов убывала в ряду: пшеничные отруби, пивная дробина, свекловичный жом, пшеничная солома, древесные опилки. Наибольшая скорость эмиссии диоксида углерода была на 3–6 сутки. Она достигала у активно растущих штаммов на пшеничных отрубях 700–1300 мкг С-СО₂ /г субстрата в час, на пивной дробине – 600–1100 мкг СО₂ /(г·час), на свекловичном жоме – мкг 550–800 С-СО₂ /(г·час), на пшеничной соломе – мкг 200–300 С-СО₂ /(г·час) и на опилках 100–200 мкг С-СО₂ /(г·час). Максимальная интенсивность выделения диоксида углерода и быстрое (на 3 сутки в подавляющем большинстве случаев) зарастание субстратов мицелием, конверсия их кормовые добавки, происходит при внесении штаммов рода *Pleurotus* и *Trametes pubescens*, хорошо их заселяли также *Trametes hirsuta* и некоторые другие, пивной дробины – *Ganoderma lucidum*, затем следовали *Trametes hirsuta*, *Pleurotus*, свекловичного жома – *Trametes gibbosa*, *T. pubescens* и ряд других, пшеничной соломы – *Ganoderma lucidum*, *Trametes pubescens*, *T. hirsuta* и древесных опилок – *Ganoderma lucidum*, *Laetiporus sulphureus*.

Проведен анализ изменения концентрации азота (белка), сырого жира, сырой клетчатки, растворимых сахаров, легкогидролизуемых углеводов (крахмала), фосфора и минеральных солей при твердофазном культивировании штаммов на органических отходах. Установлено, что повышение содержания азота, жиров, растет, растворимых сахаров и легкогидролизуемых углеводов при грибной трансформации субстратах происходит, как правило, в период от 3 до 6 суток, затем изменения в них были не столь значимые. То есть для получения кормовых добавок вполне можно достигнуть путем непродолжительной по времени грибной твердофазной трансформации отходов. Это касается пшеничных отрубей, пивной дробины и свекловичного жома, обогащение которых (в среднем на 10–30 %) азотом / белком жирами и доступность к перевариванию достигается к 3 суткам. Трансформация в ценные кормовые добавки пшеничной соломы и опилок требует большего периода и дополнительной предобработки субстратов. Выявлены существенные различия между штаммами в переработке изучаемых органических отходов.

На основе имеющихся данных по отбору эффективных грибов-базидиомицетов для трансформации пшеничных отрубей и пивной дробины в кормовые добавки отобраны штаммы родов *Flammulina*, *Coprinus*, *Laetiporus*, менее эффективными были представители родов *Pleurotus*, *Trametes* и другие, для переработки свекловичного жома помимо вышеуказанных таксонов – штаммы *Lentinula edodes*, *Trametes hirsuta*, родов *Ganoderma* *Hypsizigus*.

Планируется дальнейшая работа по характеристике и улучшению разрабатываемых кормовых добавок и оценке их эффективности в опытах по кормлению животных и птицы.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18–29–25073мк.

Литература

1. Ревин В.В., Н.А. Атыкян, Е.В. Лияськина, Д.А. Кадималнев, В.В. Шутова, Н. Желев, Р.Р. Биглов, Т.В. Овчинникова. Общая биотехнология: учебник. (ред. А.И. Мирошников) 3 изд. – Саранск: Изд-во Мордов. Ун-та. 2019. – 416 с.
2. Kavyani A., Zare Shahne A., PorReza, J., Jalil Haji-abadi S.M.A., Landy N. Evaluation of dried powder of mushroom (*Agaricus bisporus*) as an antibiotic growth promoter substitution on performance, carcass traits and humoral immune responses in broiler chickens // J. Med. Plant Res. – 2012. – Vol.6. – P.94–100.
3. Lee, S.B., Im, J., Kim, S.K., Kim, Y.C., Kim, M.J., Lee, J.S., Lee, H.G. Effects of dietary fermented *Flammulina velutipes* mycelium on performance and egg quality in laying hens // Int. J. Poult. Sci. 2012. – Vol.13. – P. 637–644.
4. Knudsen H., Vesterholt J. (eds.) Funga Nordica. Araricoid, boletoid and cyphelloid genera. Copenhagen. Nordsvamp. 2008. 965 P.
5. Izumitsu K., Hatoh K., Sumita T., Kitade Y., Morita A., Gafur A., Ohta A., Kawai M., Yamanaka T., Nieta Y., Oyta Y., Tanaka C. Rapid and simple preparation of mushroom DNA directly from colonies and fruiting bodies for PCR // Mycoscience. – 2012. – Vol. 53. – P.396–401.
6. Билай В.И. (ред). Методы экспериментальной микологии / Киев: Наукова думка. 1982. 550 с.
7. Kasana R.C., Salwan R., Dhar H., Dutt S., Gulati A. Rapid and easy method for detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine // Current Microbiology. -2008. – Vol. 57. – P. 503–507.
8. Bradner J.R., M. Gillings, Nevalainen K.M.H. Qualitative assessment of hydrolytic activities in Antarctic microfungi grown at different temperatures on solid media // World Journal of Microbiology & Biotechnology. – 1999. – Vol. 15. – P.131–132.
9. ГОСТ 31662–2012. Препараты ферментные. Методы определения ферментативной активности целлюлазы.
10. ГОСТ 55302–2012. Ферментные препараты для пищевой промышленности. Метод определения ксиланазной активности.
11. ГОСТ Р 53360–2009. Препараты ферментные. Методы определения ферментативной активности фитазы.
12. ГОСТ 31674–2012. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности.
13. ГОСТ 13496.4. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения содержания азота и сырого протеина.
14. ГОСТ 13496.15, п. 9.1 Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения массовой доли сырого жира.
15. ГОСТ 31675, раздел 6. Корма. Методы определения содержания сырой клетчатки с применением промежуточной фильтрации.
16. ГОСТ 26176–2019. Корма, комбикорма. Методы определения растворимых и легкогидролизуемых углеводов
17. ГОСТ 26226–95. Корма, комбикорма, кормовое сырье. Методы определения сырой золы
18. ГОСТ 26657–97. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения содержания фосфора.
19. ГОСТ 26570–95. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения кальция

ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА СУБД ДЛЯ ОПИСАНИЯ МАССИВА ДАННЫХ О СВОЙСТВАХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И СЫРЬЯ

О.Н. Мусина, Е.М. Нагорных

Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова, Барнаул, Россия

Государство уделяет большое внимание укреплению здоровья населения, в рамках федеральных и национальных проектов формулируются научно обоснованные рекомендации по питанию, разрабатываются программы по популяризации здорового питания.

Современный уровень развития общества требует современного подхода к решению вопросов о разработке продуктов здорового питания и сбалансированных рационов, ориентируясь не только на профессионализм и квалификацию технологов и нутрициологов, но и на возможности информационных технологий, обобщающих багаж накопленных человечеством знаний [1, 2]. Так, благодаря изучению химического состава пищевых продуктов, расширению перечня получаемых данных о содержании в составе пищевых продуктов пищевых веществ, включая минорные биологически активные вещества, в эпоху цифровой нутрициологии стало возможным создание систематизированных баз данных химического состава пищевых продуктов и сырья [3, 4].

На текущий момент самыми известными мировыми базами данных, содержащими информацию о продовольственном сырье и пищевых продуктах, являются: американская база данных Министерства сельского хозяйства США – база данных USDA [5], система баз данных Продовольственной и сельскохозяйственной организации Объединенных Наций FAO [6], база данных EuroFIR AISBL (содержит информацию о составе продуктов 26 европейских стран, Канады, США, Новой Зеландии и Японии [7], канадская база данных питательных веществ [8], английская база данных Quadram Institute [9], российская база данных ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» [10].

В рамках выполнения Государственного задания № 075–00316–20–01 нами разработана структура и наполнение базы данных о пищевых продуктах и сырье. В базу вошли сырье и продукты, отсутствующие в традиционно используемых технологами и нутрициологами различных вариантах справочников химического состава пищевых продуктов [11–15]. В процессе создания этой базы данных решали следующие задачи:

- получение собственных данных о химическом составе пищевых продуктов;
- поиск, сбор и компиляция данных из научных изданий с высоким качеством публикаций (рецензируемые научные журналы, диссертации);
- анализ известных систем управления базами данных (СУБД) и выбор СУБД для создаваемой БД.

Проанализировав информацию о зарегистрированных Роспатентах базах данных с помощью поисковой системы Федерального института промышленной собственности [16], установлено, что в этих базах данных собрана информация по определенной группе продуктов, об отдельном регионе, об определенном слое населения, или о группе людей с определенным заболеванием. При этом базы данных преимущественно были разработаны в Microsoft Excel. У такого подхода есть определенные недостатки: Microsoft Excel требует однородности (однотипности) данных в столбцах, что осуществимо только для отдельных групп продуктов и сырья, также Excel при больших объемах данных перестает корректно работать и оперативно выдавать результат. Если файлы будут превышать максимально возможный размер в 2–4 Гб, то они просто перестанут открываться.

Нами при проектировании базы данных использовалась реляционная модель, которая является широко распространенной, подходящей для решения поставленных задач, удобной для реализации на компьютере за счет простоты управления и гибкости структуры.

На рынке программного обеспечения существуют разные инструменты для работы с базами данных. Наиболее популярны – Oracle MySQL, Microsoft SQL Server, Microsoft Access и PostgreSQL.

Oracle MySQL – свободная реляционная система управления базами данных, но в рамках лицензии GNU GPL, по которой автор передает свои наработки в общественную собственность.

Microsoft SQL Server и Microsoft Access – коммерческое программное обеспечение, как, впрочем, и Microsoft Excel.

PostgreSQL – свободная реляционная база данных без ограничений на размер базы данных. Языки программирования, которые поддерживаются данной СУБД, это JavaScript, Go, Java, Net, C++, Python. Однако полнофункциональная интегрированная среда разработки этих языков программирования для написания, отладки, тестирования и развертывание кода на любой платформе – это Microsoft Visual Studio, которая является коммерческим продуктом.

С целью минимизации расходов, в качестве системы управления нашей базой данных была выбрано свободное ПО – бесплатная редакция Oracle Database Express Edition, которая позволяет использовать все свойства реляционной базы данных. Эта редакция не имеет ограничений по функциональности, хорошо масштабируется, при этом дается возможность подключать 3 базы данных, общий размер которых может достигать 12 Гб.

Выбор в качестве СУБД именно Oracle Database Express Edition позволит осуществлять миграцию на основе стандартных пакетов импорта / экспорта данных из других СУБД, а также Microsoft Excel и Microsoft Access, что позволит без лишних усилий перенести информацию, которая хранилась в разных файлах Microsoft Excel и Microsoft Access в единую базу данных, а затем продолжить вводить, хранить, обрабатывать, анализировать данные.

Информацию из Oracle Database Express Edition можно будет получать напрямую, используя язык PL/SQL, или через информационные системы, разработанные с помощью различных языков программирования с поддержкой баз данных Oracle. Мы предполагаем использование среды разработки Oracle Application Express, который реализован как веб-приложение, поддерживаемое большим количеством браузеров на любой платформе.

Логическая модель создаваемой базы данных представлена на рис. 1, а скриншоты ее заполнения – на рис. 2.

Логическая модель базы данных состоит из 5 таблиц.

В связи с тем, что для разных видов пищевых продуктов и сырья существуют разные уровни классификации, в базе данных таблица с условным названием «Сырье» будет представлена древовидной структурой, состоящей из элементов двух типов – узлов и листьев. Рассмотрим данную таблицу подробнее.

Узлами 1 уровня в таблице «Сырье» будут являться следующие элементы: Ингредиенты растительного происхождения; Ингредиенты животного происхождения; Ингредиенты прочие.

Узлами 2 уровня в таблице «Сырье» будут являться следующие элементы: Сырье из мяса и мясопродуктов; Сырье из птиц и яиц; Сырье из продуктов речного и морского промысла; Сырье из продуктов пчеловодства и т. д.

Узлами 3 уровня в таблице «Сырье» будут являться следующие элементы: Мясо и субпродукты; Мясо птицы и продукты переработки птицы; Яичное сырье и т. д.

Листьями в таблице «Сырье» будут являться следующие элементы: мясо овцебыка; мясо верблюда; мясо марала; мясо тюленя и т. д.

Для узла 1 уровня «Ингредиенты прочие» узлами 2 уровня будут витамины, микроэлементы, БАДы, и, пропуская узлы 3 уровня, сразу будут указаны листья.

Поскольку разных показателей существуют разные уровни их классификации, таблица «Показатель» также будет представлена древовидной структурой, состоящей из элементов двух типов узлов и листьев.

Узлами 1 уровня в таблице «Показатель» будут являться следующие элементы: белки; липиды; углеводы; энергетическая ценность и т. д.

Узлами 2 уровня в таблице «Показатель» будут являться следующие элементы: аминокислоты; витамины; насыщенные жирные кислоты; полиненасыщенные жирные кислоты и т. д.

Узлами 3 уровня в таблице «Показатель» будут являться следующие элементы: незаменимые аминокислоты; заменимые аминокислоты; насыщенные жирные кислоты; полиненасыщенные жирные кислоты; минеральные вещества (зольность) и т. д.

Листьями в таблице «Показатель» будут являться следующие элементы: вода; пищевые волокна; крахмал; витамин А кальций; валин; лейцин; лизин и т. д.

Таблица «Единицы измерения» будет заполняться следующими элементами: граммы; проценты; килоджоули; килокалории и т. д.

Таблица «Значение» будет заполняться цифровыми значениями каждого показателя для каждого вида пищевого продукта или сырья, погрешностями и указанием на источник(и) информации для значений.

Таблица «Тип значения» будет заполняться следующими элементами: показатель; погрешность.

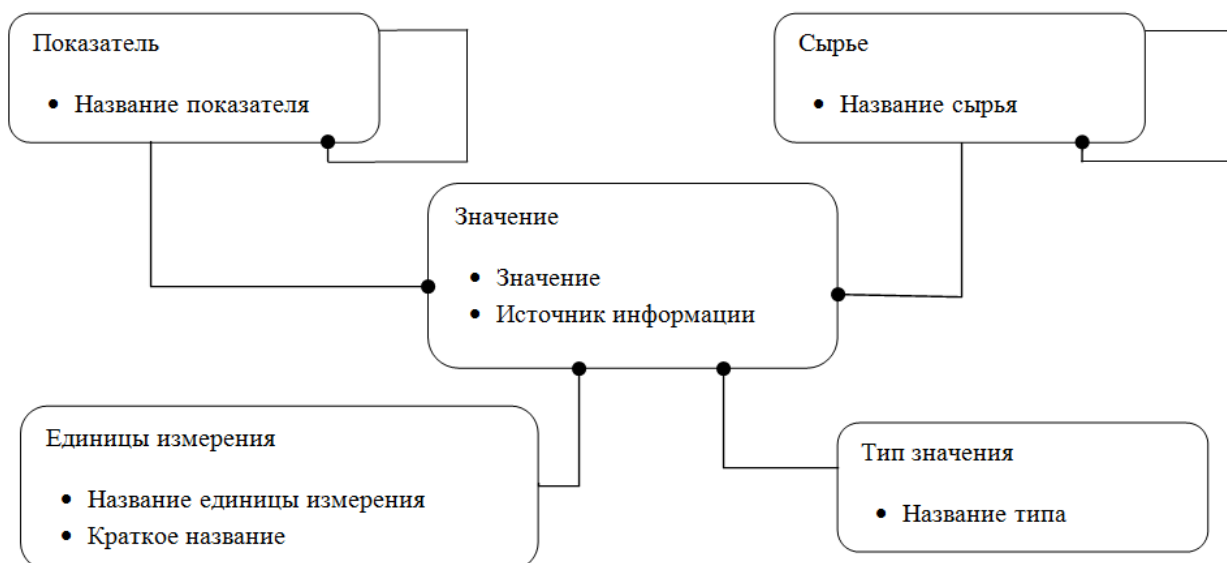


Рисунок 1. Логическая модель базы данных свойств продовольственного сырья

Сырье и продукты растительного происхождения

Сырье и продукты растительного происхождения -> Лекарственное травяное сырье

Сырье и продукты растительного происхождения -> Лекарственное травяное сырье -> Плоды

Сырье и продукты растительного происхождения -> Лекарственное травяное сырье -> Плоды -> Черника обыкновенная

Сырье и продукты растительного происхождения -> Лекарственное травяное сырье -> Плоды -> Черемуха обыкновенная

Сырье и продукты растительного происхождения -> Лекарственное травяное сырье -> Плоды -> Рябина обыкновенная

Сырье и продукты растительного происхождения -> Лекарственное травяное сырье -> Плоды -> Шиповник обыкновенный

Сырье и продукты растительного происхождения -> Лекарственное травяное сырье -> Трава, листья, стебли, побеги

Сырье и продукты растительного происхождения -> Лекарственное травяное сырье -> Трава, листья, стебли, побеги -> Смородина черная (лист)

Сырье и продукты растительного происхождения -> Лекарственное травяное сырье -> Трава, листья, стебли, побеги -> Черника обыкновенная (побеги)

Сырье и продукты растительного происхождения -> Лекарственное травяное сырье -> Цветки и соцветия

Сырье и продукты растительного происхождения -> Лекарственное травяное сырье -> Корни и корневища

Сырье и продукты растительного происхождения -> Плодово-ягодное сырье

Сырье и продукты растительного происхождения -> Орехи

а

-> Общий химический состав
-> Общий химический состав -> Белок
-> Общий химический состав -> Жир
-> Общий химический состав -> НЖК
-> Общий химический состав -> Хол
-> Общий химический состав -> МДС
-> Общий химический состав -> Кр
-> Общий химический состав -> Угл
-> Общий химический состав -> Пищевые волокна (сумма)
-> Общий химический состав -> Пищевые волокна
-> Общий химический состав -> Пищевые волокна -> Клетчатка
-> Общий химический состав -> Пищевые волокна -> Гемичеселлюлозы
-> Общий химический состав -> Пищевые волокна -> Лигнин
-> Общий химический состав -> Пищевые волокна -> Пектин
-> Общий химический состав -> Органические кислоты
-> Общий химический состав -> Зола
-> Общий химический состав -> Энергетическая ценность
-> Общий химический состав -> Вода

б

Рисунок 2. Скриншот заполнения базы данных: а – таблица «Сырье», б – таблица «Показатель»

Данный метод хранения двух основных справочников в древовидной структуре является универсальным и позволит на любом этапе внести новый уровень классификации или несколько новых уровней классификации сырья или показателя, не переделывая уже имеющуюся базу данных.

При разработке базы данных использовались возможности объектно-ориентированной среды Oracle Database Express Edition, позволяющие создавать таблицы, изменять структуры таблиц и редактировать записи. Благодаря такому выбору СУБД, в базе данных возможно без лишних усилий поддержание в актуальном состоянии информации о химическом составе сырья и пищевых продуктов и источнике данных.

Планируется, что эта база данных будет содержать объединенную информацию о химическом составе, аминокислотном составе, включающем в себя незаменимые и заменимые аминокислоты, жирнокислотном составе, углеводном составе, а также минеральном составе, включающем в себя макро- и микроэлементы. Эти показатели в дальнейшем позволят осуществлять расчет пищевой, биологической и энергетической ценности, а также минерального и витаминного состава проектируемых продуктов и рационов. На основе этих данных возможно будет разрабатывать продукцию для отдельных категорий потребителей, составлять индивидуальное меню с учетом особенностей человека или его заболеваний, пересматривать продовольственные корзины с учетом особенностей региона. Применение современных цифровых технологий при проектировании рецептур позволит оперативно произвести выбор сырья и пищевых продуктов с учетом заданных признаков химического состава, выгрузить информацию в Excel, хранить и редактировать данные.

Авторы благодарят за финансовую поддержку Минобрнауки РФ (тема № 075–00316–20–01, FZMMM-2020–0013, мнемокод 0611–2020–013).

Литература

1. Никитина М.А., Сусь Е.Б. Информационная система проектирования пищевых продуктов // Все о мясе. – 2015. – № 1. – С. 36–39
2. Marconi S., Durazzo A., Camilli E., Lisciani S., Gabrielli P., Aguzzi A., Gambelli L., Lucarini M., Marletta L. Food composition databases: considerations about complex food matrices // Foods. – 2018. – Vol. 7. – Issue 1. – P. 2. <https://doi.org/10.3390/foods7010002>
3. Бессонов В.В., Богачук М.Н., Боков Д.О., Макаренко М.А., Малинкин А.Д., Сокурено М.С., Зотов В.А., Шевякова Л.В. Базы данных химического состава пищевых продуктов в эпоху цифровой нутрициологии // Вопросы питания. – 2020. – Т. 89. – № 4. – С. 211–219. <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2020-10058>
4. Musina O., Putnik P., Koubaa M., Barba F.J., Greiner R., Roohinejad S., Granato D. Application of modern computer algebra systems in food formulations and development: a case study // Trends in Food Science & Technology. – 2017. – № 64. – С. 48–59. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.03.011>
5. База данных The United States Department of Agriculture (USDA). [Электронный ресурс]. URL: <https://fdc.nal.usda.gov/ndb/search> (дата обращения 03.07.2021)
6. Базы данных The Food and Agriculture Organization of the United Nations (International Network of Food Data Systems INFOODS). [Электронный ресурс]. URL: <http://www.fao.org/infoods/infoods/tables-et-bases-de-donnees/russia/en/> (дата обращения 03.07.2021)
7. База данных EuroFIR AISBL. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.eurofir.org/> (дата обращения 03.07.2021)
8. База данных The Canadian Nutrient File (CNF). [Электронный ресурс]. URL: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/healthy-eating/nutrient-data/canadian-nutrient-file-about-us.html> (дата обращения 03.07.2021)
9. База данных Quadram Institute. [Электронный ресурс]. URL: <https://quadram.ac.uk/targets/food-composition/> (дата обращения 03.07.2021)
10. База данных «ФИЦ питания и биотехнологии». [Электронный ресурс]. URL: http://web.ion.ru/food/FD_tree_grid.aspx (дата обращения 03.07.2021)
11. Химический состав российских пищевых продуктов: Справочник / Под ред. член-корр. МАИ, проф. И.М. Скурихина и академика РАМН, проф. В.А. Тутельяна. – М.: ДеЛи принт, 2002. – 236 с.
12. Химический состав пищевых продуктов: Справочные таблицы содержания основных пищевых веществ и энергетической ценности пищевых продуктов. Кн. I: / Под ред. И.М. Скурихина и М.Н. Волгарева. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Агропромиздат, 1987. – 224 с.
13. Химический состав пищевых продуктов: Справочные таблицы содержания аминокислот, жирных кислот, витаминов, микро- и макроэлементов, органических кислот и углеводов. Кн. II: / Под ред. И.М. Скурихина и М.Н. Волгарева. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Агропромиздат, 1987. – 360 с.
14. Химический состав пищевых продуктов: Справочные таблицы содержания основных пищевых веществ и энергетической ценности пищевых продуктов / Под ред. А.А. Покровского. – М.: Пищевая промышленность, 1976. – 228 с.
15. Химический состав и энергетическая ценность пищевых продуктов: справочник МакКанса и Уиддоусона / пер. с англ. под ред. Батурина А.К. – СПб.: Профессия, 2006 – 416 с.
16. Федеральный институт промышленной собственности. Программы для ЭВМ, БД и ТИМС. [Электронный ресурс]. URL: <https://www1.fips.ru/iiss/> (дата обращения 03.07.2021)

**ПРИМЕНЕНИЕ БИОФАРАМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ
ДЛЯ ДЕСЕНСИБИЛИЗАЦИИ ПРИ ЛЕЧЕНИИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

А.В. Печерский¹, В.И. Печерский, В.Н. Вильянинов², О.В. Печерская, В.Ф. Семглазов³

¹ Северо-Западный Государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

² Военно-медицинская академия, Санкт-Петербург, Россия

³ НИИ онкологии им. профессора Н.Н. Петрова, Санкт-Петербург, Россия

Антигены групп крови, тканеспецифичные антигены и пептидные копии тканеспецифичных антигенов, связанные с димерами МНС I класса, образуют уникальный антигенный код каждого индивида, на основании которого иммунная система отличает свои антигены от чужих. Ввиду общности филогенетического развития микроорганизмы экспрессируют антигены, сходные с антигенами групп крови (AB0 и других) и с тканеспецифичными аутоантигенами. Иммунный ответ на перекрёстные микробные антигены с поражением собственных тканей организма является одной из причин развития аутоиммунных заболеваний. Интерстициальный цистит имеет аутоиммунную природу, представляя собой гиперчувствительность IV типа, подобно болезни Крона. Клиническая картина (болевого синдром, фиброзирование стенки мочевого пузыря, изъязвление слизистой мочевого пузыря) и гистологические изменения стенки мочевого пузыря (макрофагальнолимфоцитарная инфильтрация с увеличением численности тучных клеток) при интерстициальном цистите аналогичны клинической картине и морфологическим изменениям стенки кишки при болезни Крона. Синдром хронической тазовой боли, как частное проявление миофасциального болевого синдрома, обусловлен реакциями врождённого и приобретённого иммунитета, направленными против собственных тканей. Данные реакции развиваются в ответ на перекрёстные антигены микрофлоры, вызвавшей воспалительные заболевания органов малого таза и органов других локализаций. Патологические реакции врождённого и приобретённого иммунитета приводят к агрегации эритроцитов с последующим микротромбозом мелких сосудов и фиброзированием тканей. Болевой синдром при интерстициальном цистите, синдроме хронической тазовой боли и миофасциальном болевом синдроме обусловлены ишемией тканей и повышением мышечного тонуса. Патологические реакции приобретённого иммунитета у пациентов с хронической тазовой болью, как частного проявления миофасциального болевого синдрома, и с интерстициальным циститом, направленные против собственных тканей, сохраняются после элиминации возбудителя из-за формирования клеток иммунологической памяти. Проведение десенсибилизации при данных заболеваниях является патогенетической терапией. Т-хелперы (Th) могут переключать клеточный иммунный ответ на гуморальный и наоборот – переключать гуморальный иммунный ответ на клеточный. Участие Т-хелперов (Th) в регенерации может быть использовано для десенсибилизации – для переключения ими активизации цитотоксических Т-клеток и В-клеток на образование тканеспецифичных рецепторов у стволовых клеток, участвующих в регенерации тканей, к антигенам которых сформировалась гиперчувствительность иммунной системы.

Литература

1. Pechersky AV, Pechersky VI, Vilyaninov VN, Pecherskaya OV, Semiglazov VF. Regeneration's role in the development of desensitization and immunological tolerance. *Journal of Stem Cells* 2019; 14(2): 75–102.
2. Pechersky AV, Pechersky VI, Aseev MV, Droblenkov AV, Semiglazov VF. Several aspects of the regeneration process carried out by means of pluripotent stem cells. *Tsitologiya* 2008; 50(6): 511–520.
3. Pechersky AV, Pechersky VI, Smolyaninov AB, Vilyaninov VN, Adylov ShF, Shmelev AY, Pecherskaya OV, Semiglazov VF. Regeneration and carcinogenesis. *Journal of Stem Cells* 2015; 10(4): 255–270.
4. Pechersky AV, Pechersky VI, Aseev MV, Droblenkov AV, Semiglazov VF. Immune system and regeneration. *Journal of Stem Cells* 2016; 11 (2): 69–87.

УДК 640

**АНТИВИРУСНЫЕ БИОГЕЛИ ВИТАЛЬГАР ИЗ ВОДОРΟΣЛЕЙ СЕМЕЙСТВА
LAMINARIACEAE****А.В. Подкорытова¹, Л.Х. Котельникова¹, И.А. Шашкина²**¹ Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии, Москва, Россия² ООО НПК «Вита-Ли», Дмитров, Россия

Пандемия коронавируса SARS-CoV-2, вызывающего атипичную пневмонию COVID-19 и, связанные с ней карантинные мероприятия, оказывают влияние на жизнь населения всего мира. Самоизоляция, введенная в России в 2020 г., показала необходимость тщательного подбора рациона в новых условиях, не только для того, чтобы не перебраться в условиях недостаточной физической нагрузки, но и помочь ему в укреплении иммунитета в борьбе с вирусом.

При этом важно употреблять вещества, адсорбирующие и выводящие токсиканты из организма, накапливающиеся, например, в результате, компьютерной томографии при постановке диагноза или антибиотикотерапии при лечении и др. Потребление пищевых волокон также немаловажно для обеспечения нормальной работы кишечника и поддержания здоровой микрофлоры в нём, особенно в условиях самоизоляции и ограничений в передвижении.

Многие врачи считают, что хорошую противовирусную защиту обеспечивают микроэлементы цинка, селена и витамина D в комплексе. Специалистами Сеченовского Университета была выявлена чёткая зависимость между уровнем цинка и селена в крови человека и тяжестью течения болезни, вызванной вирусом COVID-19. При нормальном содержании этих микроэлементов чаще наблюдалось более лёгкое её течение.

Цинк и его противовирусный эффект был известен давно, т.к. он угнетает размножение (репликацию) вируса в клетке. Также цинк укрепляет иммунитет, влияя на многие звенья этой важной для организма системы.

Аналогичное действие свойственно и витамину D. Дополнительный приём витамина D для профилактики коронавирусной инфекции прописан во многих официальных рекомендациях.

Селен положительно влияет на иммунитет, играющий большую роль при создании иммунного ответа заболеванию, вызываемому COVID-19. К тому же селен защищает лёгкие и вместе с цинком важен для ослабления воспалительной реакции, которую может вызвать цитокиновый шторм – самый главный фактор тяжёлого течения болезни. Вероятнее всего, именно селен играет существенную роль в ослаблении тяжести заболевания [<https://www.sechenov.ru/pressroom/news/tsink-selen-i-vitamin-d-kak-zashchishchatsya-ot-covid-19/>].

Таким образом, цинк, селен и витамин D являются оптимальными составляющими профилактики COVID-19, а также при лечении заболевания с самого начала. Все эти компоненты важны для выработки антител и повышения устойчивости иммунитета.

С учетом вышесказанного важно тщательно подбирать рацион питания в «новых» условиях и больше использовать натуральные продукты, содержащие витамины, микроэлементы, пищевые волокна и сорбенты.

Основная масса эссенциальных веществ поступает в организм из пищи. Но в связи с тем, что население России и так страдает дефицитом многих веществ, в том числе цинка, селена, а также витамина D, биосинтез которого обусловлен достаточным количеством солнечных дней в году и получения ультрафиолетовых лучей человеком, очевидно, что только традиционной пищей в полной невозможно поддержать организм в борьбе с вирусом, необходимо дополнительное введение жизненно необходимых веществ, которое может быть обеспечено приемом специализированных пищевых продуктов или БАД.

Коронавирусная инфекция также характеризуется тяжелыми последствиями, в том числе тромбозом сосудов и поэтому многими врачами назначаются также антикоагуляционные (гепариноподобные) препараты для снижения вязкости и свёртываемости крови. Таким образом, гепариноподобные вещества также должны быть в рационе человека для уменьшения тяжелых последствий заболевания, вызванного COVID-19. Они могут быть не только химической природы, так как существуют и натуральные пищевые продукты их содержащие.

Бурые водоросли представляют сырьевую базу чрезвычайно объёмную по биомассе, ценную по содержанию и составу химических веществ, не свойственных наземным растениям. В химическом составе бурых водорослей содержатся полисахариды (альгинаты, фукоиданы, ламинараны), низкомолекулярный углевод (маннит), полный набор жизненно важных микро- и макроэлементов, витамины, пигменты, пищевые волокна, белки и липиды. Они являются источниками витаминов А, В, С, D и Е; рибофлавина; ниацина; пантотеновой и фолиевой кислот.

Альгиновая кислота бурых водорослей – это полисахарид, состоящий из блоков поли-D-маннуриновой кислоты и поли-L-гулуриновой кислоты. Её соли альгинаты обладают разнообразными физико-химическими и биологическими свойствами. Главное свойство – это способность селективно абсорбировать токсиканты и выводить их из организма, так как это природный ионообменник.

Фукоидан – это высокомолекулярный сульфатированный полисахарид, обладающий антиопухолевым, антикоагулянтным и другими биологическими действиями. Его содержание в бурых водорослях порядка *Fucales* достигает 18 %, порядка *Laminariales* – 3–5 %.

Учеными ФГБНУ «ВНИРО» совместно предприятием на ООО НПК «Вита-Ли» разработаны технологии биогелей из морской бурой водоросли *Saccharina japonica* 8 наименований. Каждый из продуктов содержит природный фукоидан, который обладает гепариноподобным действием. Изготавливают биогели на ООО НПК «Вита-Ли» (г. Дмитров) из бурых водорослей семейства *Laminariaceae*, которые содержат все перечисленные природные биологически активные вещества (БАВ), а также обогащены микроэлементами и витаминами.

В настоящее время на ООО НПК «Вита-Ли» (г. Дмитров) производят ассортимент биогелей из ламинарии СПП Селеномарин, Альгокуприн, Хромомарин, Феромарин, Альгацинк и Витальгар минеральный комплекс, содержащие Se, Cu, Cr, Fe, Zn и их комплекс, Витальгар Кардио с калием и магнием и боярышником. Все СПП содержат природный фукоидан, обладающий антикоагулянтными, противопухолевыми и др. свойствами. В таблице 1 представлены основной ассортимент биогелей, их состав и биологическое действие.

Разработана технология нового продукта – биогель из ламинарии, содержащие цинк, селен, водорастворимую форму витамина D и кальций для лучшего его усвоения. Новый СПП будет изготавливаться на основе базового биогеля Витальгар, обладающего статусом диетического лечебного продукта и являющегося источником пищевых волокон, альгинатов, микроэлементов, витаминов, органического йода, а также фукоидана – высокосульфатированного полисахарида, обладающего спектром биологических свойств, в том числе, антикоагулянтных.

Водные коктейли из биогелей Витальгар, включая и с соком, обладают мягким обволакивающим и антацидным действием, устраняют воспалительные процессы и болевые ощущения, оказывают благотворное влияние на иммунитет и общее состояние ЖКТ. Биогели Витальгар – это альгинатсодержащие СПП эффективные адсорбенты, способные выводить токсические вещества из организма, в том числе после массивного приема антибиотиков и других лекарственных средств.

Биогели из ламинарии с микроэлементами цинка, селена, витамином D и фукоиданом – продукты незаменимые для применения в качестве профилактического средства и в комплексном терапевтическом лечении при COVID-19.

Таблица 1 – Основной ассортимент биогелей, их состав и биологическое действие

Наименование продукции	№ госрегистрации	Основное действующее вещество	Предназначение
Витальгар	RU.77.99.19.004.E. 012270 от 15.12.2014 г.	Альгинат натрия, фукоидан, йод в органически связанной форме	Применяется в комплексной терапии лечения ЖКТ. Регулирует деятельность пищеварительной системы, обладает обволакивающим, антацидным, обезболивающим, противомикробным действием. Устраняет изжогу, отрыжку горьким, кислым. Является природным энтеросорбентом, выводит из организма радионуклиды, тяжёлые металлы и другие токсины. Применяется при йододефиците.
Селеномарин	RU.77.99.11.004.E.009230 от 28.09.2015 г.	Альгинат натрия, фукоидан, йод и селен в органически связанной форме	Источник органически связанного селена, который стимулирует антиоксидантную защиту организма, нормализует обмен белков и нуклеиновых кислот, регулирует функцию щитовидной и поджелудочной желез, улучшает репродуктивное здоровье. Селен в составе биогеля препятствует развитию онкологических заболеваний и мутацию генов, защищает от воздействия радиации. Селен, необходим для правильного и достаточного функционирования клеток иммунной системы в развитии противовирусного иммунитета. Селеномарин выводит из организма тяжёлые металлы (например, ртуть, свинец, кадмий, олово) и др. токсины. Применяется в качестве антиоксиданта, иммуномодулятора, регулятора работы гормональной системы, в комплексной терапии ЖКТ, при йододефиците.
Альгокуприн	RU.77.99.11.004.E.0092 28 от 28.09.2015 г.	Альгинат натрия, фукоидан, йод и медь в органически связанной форме	Применяется в качестве антиоксиданта, дополнительного источника меди (для выработки и функционирования всех видов соединительной ткани – стенок кровеносных сосудов, костной, хрящевой, сухожилий и кожи), регулятора гормональной системы. При применении Альгокуприна под действием меди происходит ускорение процесса окисления глюкозы и угнетение распада гликогена печени. Применяется в комплексной терапии ЖКТ, при йододефиците.
Хромомарин	RU.77.99.11.004.E.009229 от 28.09.2015 г.	Альгинат натрия, йод и хром в органически связанной форме	Применяется в качестве регулятора деятельности гормональной системы; при заболеваниях диабетом II типа нормализует углеводный обмен – поддерживает нормальный вес, сжигает избыток углеводов, предотвращает их превращение в жир; дополнительного источника хрома участвует в укреплении костной ткани, обеспечивает профилактику остеопороза; предупреждает гипертонию, нормализуя артериальное давление; Хромомарин – это профилактическое средство от атеросклероза, а также применяется при заболеваниях ЖКТ, йододефиците.

Наименование продукции	№ госрегистрации	Основное действующее вещество	Предназначение
Ферромарин	RU.77.99.11.004.E.009227 от 28.09.2015 г.	Альгинат натрия, йод и железо в органически связанной форме	Ферромарин применяется в качестве источника железа при железодефицитной анемии, содержит в органически связанной форме двухвалентное железо, являющееся составной частью гемоглобина. Железо в составе Ферромарина участвует в кроветворении и транспортировании кислорода из легких в ткани; способствует нормализации процессов биологического окисления, обеспечивающих организм энергией; нормализует работу мышечных и нервных систем. Двухвалентное железо (гемовое) в организме человека играет наиважнейшую роль в образовании красных кровяных телец эритроцитов, борется со слабостью, утомляемостью, малокровием. Ферромарин также применяется при заболеваниях ЖКТ.
Витальгар минеральный комплекс	RU.77.99.19.004.E.0093 50 от 01.10.2015 г.	Альгинат натрия, йод, медь, селен, хром и железо в органически связанной форме	Применяется в качестве источника меди, селена, хрома и железа. Совместно они дают синергетический эффект, т. е. действие всех минеральных элементов в составе геля существенно превосходит эффект каждого отдельного компонента в виде их суммы, так как отдельные составляющие усиливают действие друг друга. Регулирует деятельность пищеварительной системы, применяется при гастроэнтерологических заболеваниях, йододефиците.
Витальгар Кардио	RU.77.99.32.004.E.000799 .02.18 от 26.02.2018 г.	Альгинаты калия и магния, йод в органически связанной форме	Применяется в качестве источника калия и магния (улучшающих работу сосудов и сердечно-сосудистой системы). Регулирует деятельность пищеварительной системы, применяется при гастроэнтерологических заболеваниях, йододефиците.
Витальгар Кардио с боярышником	RU.77.99.32.004.E.00 0895.03.18 от 02.03.2018 г.	Альгинаты калия и магния, флавоноиды боярышника и другие его биоконпоненты, йод в органически связанной форме.	Применяется в качестве дополнительного источника калия и магния (улучшающих работу сосудов и сердечно-сосудистой системы), а также биофлавоноидов боярышника, улучшает деятельность сердечно-сосудистой системы, регулирует ритмы сердца). Регулирует деятельность пищеварительной системы, применяется при гастроэнтерологических заболеваниях, йододефиците.

УДК 636.2:591.39:576.5

ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТИВНОСТИ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА ДОМАШНЕЙ КОРОВЫ В НАПРАВЛЕНИИ НОКАУТА ГЕНА В-ЛАКТОГЛОБУЛИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9**Г.Н. Сингина¹, П.В. Сергиев², М.П. Рубцова², Н.В. Равин³, А.В. Лопухов¹, Т.А. Ворожбит¹,
Е.Н. Шедова**¹ Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, Московская обл., Подольск, Россия² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия⁴ Институт биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

Технология геномного редактирования в сочетании с репродуктивными биотехнологиями, такими как соматическое клонирование имеет широкие перспективы применения для решения задач, направленных на создание новых генотипов, в том числе с измененными хозяйственно – полезными признаками [1–2]. В частности, получение клонированных эмбрионов с использованием эмбриональных фибробластов отредактированных в направлении нокаута гена β – лактоглобулина (BLG) и их трансплантация животным-реципиентам ожидаемо позволит получить коров способных производить молоко с пониженными аллергенными свойствами [3]. В качестве инструментов геномного редактирования в работах на домашних животных все большее применение находит система на основе CRISPR/Cas9 [4]. В представляемой работе была проведена оценка эффективности данной системы геномного редактирования для получения эмбриональных фибробластов крупного рогатого скота с нокаутом гена BLG. Для этого первоначально была получена культура фибробластов плодов крупного рогатого скота известной селекции. Выделенные на 55 день стельности post mortem от 4 телок симментальской породы матки, доставляли в лабораторию, рог маток, содержащий плод, обрабатывали 70 % этиловым спиртом, вскрывали и извлеченные плоды освобождали от головы, конечностей и внутренних органов. Полученную плодную ткань (каждый плод индивидуально) многократно отмывали в фосфотно-солевом буфере (ФСБ), протирали через сито с диаметром пор 100 мкм (ферментативная обработка плодной ткани была полностью исключена на этапе выделения первичной культуры), после чего клеточную суспензию отмывали центрифугированием в ФСБ и культивировали в 100 мм чашках Петри с ростовой средой до образования монослоя. Первичную культуру размножали путем однократного пассирования 1:4, после чего клетки замораживали в среде ДМЕМ с 40 % ФБС и 10 % ДМСО и хранили в криобирках по 1 мл при -196°С до использования. Результаты генотипирования плодов с использованием двух пар праймеров, подобранных к 6 экзону гена Amel1 крупного рогатого скота: Amel1f CAG CCA AAC CTC CCT CTG C и Amel1r CCG CTT GGT CTT GTC TGT TGC показали, что генотип XX имели три плода и генотип XV – 1 плод.

Учитывая, что в геноме крупного рогатого скота ген бета-лактоглобулина дуплицирован и представлен двумя близкими паралогами, собственно BLG (PAEP) и BLG подобным геном (LOC100848610), нами была выбрана стратегия, предусматривающая инактивацию обоих генов-паралогов.

При создании генной конструкции на основе CRISPR в качестве основы для инактивации генов PAEP и LOC100848610 был выбран вектор pX458, содержащий гибридный ген Cas9 и зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein, GFP), кодирующие области которых отделены друг от друга последовательностью, кодирующей P2A пептид. Плазмида pX458 была разрезана эндонуклеазой рестрикции BbsI. С остовом плазмиды были лигированы гибридные олигонуклеотиды, содержащие последовательности гидовых РНК. После лигирования и трансформации компетентных клеток *E. coli* JM109 выросшие колонии были использованы для наращивания биомассы и выделения плазмид, которые на основании подтверждения успешного клонирования конструкций секвенированием были использованы для трансфекции фибробластов крупного рогатого скота. Трансфицированные соматические клетки, содержащие плазмиду кодирующую компоненты системы CRISPR/Cas9, были отделены от нетрансфицированных клеток при помощи высокопроизводительного клеточного сортера BD FACSAria III. Высокопроизводительное секвенирование ампликонов целевых участков генов PAEP и LOC100848610 в предварительно отсортированной популяции эмбриональных фибробластов показало наличие, соответственно, 12 и 7.5 % мутантных последовательностей, содержащих делеции и вставки нуклеотидов в местах предполагаемых разрывов.

Для получения GE-клонов фетальных фибробластов коровы была проведена электропорация эмбриональных фибробластов второго пассажа смесью плазмид, кодирующих Cas9 и гРНК, направленные на инактивацию генов PAEP и LOC100848610. Трансфецированные соматические клетки, содержащие плазмиду, кодирующую компоненты системы CRISPR/Cas9, были отделены от нетрансфецированных клеток как описано выше.

После сортировки общий пул клеток, экспрессирующих гены компонентов системы CRISPR/Cas9, растили в течение 2 суток, после чего клетки высевали индивидуально в 96-ти луночные планшеты и культивировали до получения колоний и формирования ими 80–90 % монослоя. Доля сформированных колоний составила 20.8 % от общего числа клеток (380/1824). Одна часть каждой колонии была заморожена для возможного дальнейшего использования, а другую часть использовали для выделения ДНК и анализа на наличие мутаций. С этой целью, проводили амплификацию фрагментов генов PAEP и LOC100848610, содержащих целевые области, с последующим секвенированием по Сэнгеру. В 4 из 380 полученных колоний индивидуальных фибробластов был установлен нокаут генов PAEP и LOC100848610, что соответствует эффективности геномного редактирования 1.05 %. Полученные клоны будут использованы для получения методом соматического клонирования GE-эмбрионов и потомства женского пола с отсутствием синтеза бета – лактоглобулина.

Литература

1. Salamone D., Baraňao L., Santos C., et al. High level expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow // Journal of Biotechnology. 2006. Vol. 124, N2. P. 469–472.
2. Wang J., Yang P., Tang B., et al. Expression and characterization of bioactive recombinant human alpha-lactalbumin in the milk of transgenic cloned cows // Journal of Dairy Science. 2008. Vol. 91, N12. P. 4466–4476.
3. Yu S., Luo J., Song Z., et al. Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle // Cell Research. 2011. 21. P. 1638–1640.
4. Зиновьева Н.А., Волкова Н.А., Багиров В.А. Геномное редактирование: современное состояние исследований и применение в животноводстве // Биотехнология. 2018. Т.34, № 3. С. 9–22.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18–29–07089) и Министерства науки и высшего образования РФ

УДК 573.6.086.83+577.2

ТЕСТ-РЕАКЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ИЗВЕСТКОВАНИЕ КИСЛЫХ ПОЧВ

Е.А. Прищепенко, И.А. Дегтярева

*Татарский научно-исследовательский институт агрохимии и почвоведения – обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский
научный центр РАН, Казань, Россия*

Введение. В последнее время мировым приоритетом является производство органической продукции. Значимой остается проблема плодородия почв, поскольку это напрямую связано с продовольственной безопасностью всех стран мира. Способность экосистемы почва – микроорганизмы – растение улавливать и накапливать солнечную энергию в виде фитомассы является плодородием почвенного покрова – основой гетеротрофной жизни в целом и человека в особенности. Благодаря неисчерпаемому метаболическому потенциалу микроорганизмы используются человеком для решения многих экологических проблем. По микробному генофонду почва – самый богатый природный субстрат, который выполняет функции биологического поглотителя, разрушителя, нейтрализатора различных загрязнений.

Одной из главных причин низкого плодородия почв и недостаточной эффективности удобрений является снижение значений водородного показателя [1]. Для развития многих растений оптимальное значение pH составляет от 5,5 до 7,5. Поэтому известкованию кислых почв принадлежит важное место в комплексе мер, направленных на повышение продуктивности земледелия, так как в Российской Федерации более 75 млн га кислых почв. Изучением агрохимических свойств различных типов почв в условиях агрогенеза занимаются многие исследователи [2–4].

Важное место в ряду показателей состояния любой почвы принадлежит состоянию ее микрофлоры, так как в зависимости от различных факторов в почве изменяются направленность и интенсивность биологических процессов. Известкование существенно влияет на состав, численность и активность почвенных микроорганизмов [1, 5–6], ведь для большинства агрономически значимых групп микроорганизмов оптимальные значения pH составляют от 6,0 до 7,0. Необходимо отметить, что микробный ценоз черноземных почв изучен не в полной мере.

В отделе агроэкологии и микробиологии Татарского НИИАХП ФИЦ КазНЦ РАН проводятся комплексные многолетние исследования по влиянию агрогенной нагрузки на агрохимические и биологические свойства серых лесных и черноземных почв Республики Татарстан (РТ).

Цель исследований – оценить влияние различных доз извести на биоразнообразие микробного комплекса выщелоченного чернозема при выращивании озимой ржи.

Материалы и методы. Известь вносили в количестве 0,5; 1,0 и 1,5 дозы, рассчитанной по гидролитической кислотности ($8,8 \text{ т/га CaCO}_3 - 1 \text{ г.к., Нг.}$) на естественном и минеральном ($\text{N}_{60} \text{ P}_{60} \text{ K}_{60}$) фонах. Полевой опыт в Предволжской зоне РТ был заложен по схеме: 1 – контроль (почва без растений); 2 – известь 0,5 г.к. ($2,2 \text{ т/га}$ под вспашку + $2,2 \text{ т/га}$ под культивацию); 3 – известь 0,5 г.к. + $\text{N}_{60} \text{ P}_{60} \text{ K}_{60}$ под предпосевную культивацию; 4 – известь 1,0 г.к. ($4,4 \text{ т/га}$ под вспашку + $4,4 \text{ т/га}$ под культивацию); 5 – известь 1,0 г.к. + $\text{N}_{60} \text{ P}_{60} \text{ K}_{60}$ под предпосевную культивацию; 5 – известь 1,5 г.к. ($6,6 \text{ т/га}$ под вспашку + $6,6 \text{ т/га}$ под культивацию); 6 – известь 1,5 г.к. + $\text{N}_{60} \text{ P}_{60} \text{ K}_{60}$ под предпосевную культивацию.

Агрохимическая характеристика выщелоченного чернозема тяжелосуглинистого состава следующая: pH 5,1, низким содержанием гумуса (5,59 %), подвижного фосфора и обменного калия (59 и 42 мг/кг почвы соответственно). Валовое содержание азота 0,38 %, гидролитическая кислотность и сумма поглощенных оснований 6,63 и 36,3 мг-экв/100 г. почвы. Культура – озимая рожь сорта Казанская 560.

Ризосферную почву отбирали из слоя 0–20 см в фазах молочной и восковой спелости озимой ржи. Из пяти точек отбора конкретного варианта составляли средний образец. Численность различных эколого-трофических групп почвенных микроорганизмов определяли путем посева соответствующих разведений на селективные питательные среды по стандартным методикам [7, 8], респираторную активность – газохроматографически [9].

Особое внимание было направлено на изучение количественного и качественного составов азотфиксирующих бактерий и микроскопических грибов как индикаторных микроорганизмов. Все параметры измеряли не менее чем в трехкратной повторности, а статистическую обработку результатов осуществляли с помощью электронных таблиц Excel и программы Origin 4.1.

Результаты. Изучение влияния внесения извести на реакцию среды и микробный состав ризосферы озимой ржи показало, что послойная заделка мелиоранта из-за равномерного распределения его по всей глубине пахотного горизонта оказала более выраженное влияние на почвенную кислотность. Если в начале вегетационного сезона $\text{pH}_{\text{КС}}$ был 5,1, то в фазе восковой спелости озимой ржи в зависимости от доз внесения извести получены разные значения pH: при внесении при 0,5 г.к. – 5,4; при 1,0 г.к. – 5,6; при 1,5 г.к. – 5,8.

Известкование способствовало изменению биоморфологической структуры микробного сообщества в пользу бактериальной составляющей. Вне зависимости от доз извести ризосферная зона характеризовалась более высокой численностью изученных групп микроорганизмов.

Вне зависимости от сроков отбора образцов ризосфера озимой ржи характеризовалась более высокой численностью азотфиксаторов. Информативным показателем являются ризосферный эффект (R/S), который для диазотрофов был более высоким в фазе восковой спелости – до 4,1.

Максимальную их численность ($4,1 \times 10^6 - 6,2 \times 10^6 \text{ КОЕ/г почвы}$) отмечали при дозе извести 1,0 г.к. Помимо этого, при этой дозе активно развивались представители рода *Azotobacter*, что отразилось на повышении урожайности озимой ржи. Положительный факт присутствия этих бактерий состоит в том, что при оптимальном развитии в почве азотобактер может быть антагонистом некоторых микромицетов и бактерий, вызывающих заболевания растений. Сопоставление изучаемых факторов свидетельствует, что доза извести 1,0 г.к. не только снижает кислотность почвенного раствора, но и оказывает активизирующее влияние на численность азотфиксирующих бактерий.

Существенных отличий по количеству денитрифицирующих микроорганизмов между вариантами не обнаружено. Наибольшее количество фосфатмобилизующих микроорганизмов отмечали при дозе извести 1,0 г.к. Следовательно, известкование почвы, снижая кислотность, способствует увеличению агрономически значимых групп микроорганизмов.

Внесение извести в разных дозах привело к изменению не только pH, но и численности микроскопических грибов, заметное снижение количества которых отмечали в вариантах с мелиорантом в дозах 1,5 и 1,0 г.к. Анализ родовой структуры почвенных микромицетов показал, что представители рода *Trichoderma* преобладали при внесении извести в дозах 0,5 и 1,0 г.к., а в сильнокислых доминировали микромицеты рода *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*. Следует отметить доминирование триходермы, которая обладает антагонистической активностью к фитопатогенным грибам. Итак, на выщелоченном черноземе, который является высокобуферной почвой, отмечена корреляция между дозой извести, pH почвенной среды и численностью микромицетов.

Определение интенсивности выделения углекислоты почвенными микроорганизмами дает возможность оценить, насколько активно протекают окислительно-восстановительные процессы в почве. Проведенные исследования показывали, что известкование вызывает стимуляцию почвенного дыхания. Так, в фазе восковой спелости озимой ржи произошло существенное увеличение метаболической активности микроорганизмов, максимальная интенсивность которой отмечена при дозе извести 1,0 г.к. с удобрениями и без них, а также при дозе 0,5 г.к. + N₉₀ P₆₀ K₆₀. В последнем варианте интенсивность дыхания увеличилась по сравнению с фазой молочной спелости в 22 раза.

Наиболее оптимальным считаем внесение извести в дозе 1,0 г.к., рассчитанной по гидролитической кислотности, как на фоне удобрений, так и без них. Именно в этих вариантах отмечали максимальную урожайность озимой ржи. В последнем варианте интенсивность дыхания увеличилась по сравнению с фазой молочной спелости более чем в 20 раз.

Максимальную урожайность озимой ржи отмечали в вариантах с внесением извести в дозе 1,0 г.к., рассчитанной по гидролитической кислотности, как на фоне удобрений, так и без них.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют, что основными микробиологическими индикаторами биогенности выщелоченного чернозема при известковании являются численность diaзотрофных бактерий (при наличии рода *Azotobacter*) и микромицетов (и присутствие представителей рода *Trichoderma*), а также респираторная активность.

Знание направленности микробиологических процессов, протекающих в агроэкосистемах, необходимо для воспроизводства почвенного плодородия. Известкование выщелоченного чернозема является надежным средством увеличения его биогенности. Известь целесообразно заделывать в верхнюю половину пахотного слоя, испытывающего наибольшие антропогенные нагрузки.

Для применения технологий, эффективных для выщелоченного чернозема, на других типах почв необходимо проводить их апробацию с обязательным микробиологическим мониторингом.

Литература

1. Зинченко, М.К. Влияние известкования на численность эколого-трофических групп микроорганизмов в серой лесной почве / М.К. Зинченко, С.И. Зинченко // Успехи современного естествознания. – 2018. – № 7. – С. 43–47.
2. Ломако, Е.И. Почвы Татарии и воспроизводство их плодородия / Е.И. Ломако, Н.Б. Бакиров – Казань: Центр инновационных технологий, 2007. – 340 с.
3. Davlyatshin, I.D. Dynamics of Light-Gray Forest Soils Agrochemical Properties in the Conditions of Agrogenesis / I.D. Davlyatshin, L.G. Gaffarova // Earth and Environmental Science. – 2019. – V. 272. – P. 10–14.
4. Муртазина, С.Г. Свободные и связанные аминокислоты в почвах лесостепи Поволжья и их роль / С.Г. Муртазина, Л.Г. Гаффарова, М.Г. Муртазин, А.С. Ахрарова // Вестник Казанского ГАУ. – 2019. – № 4 (55). – С. 80–84.
5. Дегтярева, И.А. Комплексное применение средств химизации и биологическая активность серой лесной почвы / И.А. Дегтярева, Е.И. Ломако, Ф.К. Алимова // Агрохимический вестник. – 2003. – № 4. – С. 14–17.
6. Дегтярева, И.А. Влияние известковых и минеральных удобрений на биологическую активность выщелоченного чернозема / И.А. Дегтярева, Е.И. Ломако // Эффективность применения средств химизации и ресурсосберегающие технологии в сельском хозяйстве: Труды Татарского НИИ агрохимии и почвоведения. – Казань, 2005. – С. 189–192.
7. Колешко, О.И. Экология микроорганизмов почвы. Лабораторный практикум / О.И. Колешко – Минск: Высшая школа, 1981. – 175 с.
8. Методы почвенной микробиологии и биохимии / под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: МГУ, 1991. – 304 с.
9. Гарусов, А.В. Газохроматографический метод анализа в биомониторинге почвы / А.В. Гарусов, Ф.К. Алимова, Н.Г. Захарова – Казань: Изд-во КГУ, 1999. – С. 32–36.

УДК 575.18

АНАЛИЗ РЕПИТОМА ВЫЯВИЛ ЦЕНТРОМЕРНЫЙ ПОВТОР *CANNABIS SATIVA***О.В. Разумова¹, С.Р. Прокопчук¹, К.Д. Боне¹, Ю.В. Бочаркина² Д.В. Романов¹, Г.И. Карлов¹.***Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия**Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия**Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН, Москва, Россия*

Конопля посевная (*Cannabis sativa* L.) – одна из старейших сельскохозяйственных культур, история ее возделывания насчитывает по разным данным от шести до десяти тысяч лет. Это ценная сельскохозяйственная культура. Волокно и семена конопли являются сырьем для производства множества продукции. Масло, получаемое из семян конопли, обладает уникальным жирнокислотным составом, что позволяет широко применять его как в пищевой, так и в лакокрасочной промышленности. Волокно обладает повышенной прочностью и износостойкостью. Кроме того, в последние годы увеличиваются объемы получения из конопли биокомпозитов, биотоплива, а также бумаги и текстиля. Именно многоцелевое назначение объясняет многократно возросший в последние годы интерес производителей к данной культуре. При этом, несмотря на долгую историю возделывания, с генетической точки зрения культура недостаточно изучена, активный интерес исследователей проявился только в последнее десятилетие.

К настоящему времени получено уже достаточно большое количество полногеномных сиквенсов *Cannabis sativa* различных сортов и происхождения, однако до настоящего времени очень многое в структурно-функциональной организации генома конопли остается неясным, в частности малоизученным является значительная часть генома, состоящая из повторяющихся последовательностей ДНК – репитом.

Одной из фракций повторяющейся ДНК растений являются сателлитные повторы. Как правило это АТ-богатые последовательности ДНК, считающиеся основным компонентом гетерохроматина. Сателлитные повторы как правило сосредоточены в прицентромерных или субтеломерных областях, встречаются большинства эукариот и характеризуются широкой вариабельностью по составу и протяженности. При этом как правило они специфичны для вида или семейства, что делает их удобными объектами при выяснении филогенетических взаимоотношений. Субтеломерные последовательности достаточно часто встречаются у разных видов растений, однако их функция до настоящего времени не известна. Ранее нами была обнаружена субтеломерная последовательность конопли посевной, оказавшаяся молекулярно-цитогенетическим маркером на половые хромосомы. Однако еще один очень важный повтор, центромерный, до настоящего времени не был обнаружен у данного вида. Сателлитные ДНК образуют важный регион центромеры, необходимый для правильного расхождения хромосом во время деления. Несмотря на огромную важность центромеры для клетки, а также эволюционную древность и общность механизма деления для всех эукариот, центромерные повторы очень вариабельны, и могут отличаться не только между близкородственными видами, но даже у разных хромосом внутри одного кариотипа. Данное явление получило название центромерного парадокса.

В своей работе мы провели секвенирование ДНК мужского и женского растения сорта «Зеница» на платформе IlluminaMiSeq. Полученные сиквенсы, после проверки качества загружали в программное обеспечение RepeatExplorer. Для кластеризации были отобраны только наиболее высококопийные повторяющиеся последовательности, доля которых в геноме была не менее 0,01 %. В RepeatExplorer каждый обнаруженный кластер проверялся на гомологию к существующим охарактеризованным последовательностям. Последовательности выявленных сателлитных кластеров проверялись на соответствие имеющимся в базах данных NCBI с использованием BLAST. Последовательности, не показавшие гомологию к уже имеющимся в базах, отправлялись на дальнейший молекулярно-генетический анализ. К ним подбирались праймеры, проводилась амплификация ДНК, с последующим приготовлением ПЦР-зонда для локализации на метафазных хромосомах методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH). Всего было выявлено 5 кластеров, не обнаруживающих соответствия в базе данных NCBI. В результате один из кластеров, CL9–1637nt, показал прицентромерную локализацию. Он локализовался на 10 хромосомах из 20 диплоидного набора.

В настоящее время проводится дальнейшая работа для выявления роли обнаруженного повтора в организации перичентромерной и центромерной областей хромосом *Cannabis sativa*.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, договор № 20–316–70018\19

Литература

- Clarke, R.C., & Merlin, M.D. (2016). Cannabis domestication, breeding history, present-day genetic diversity, and future prospects. *Critical reviews in plant sciences*, 35(5–6), 293–327.
- Divashuk, M.G., Alexandrov, O.S., Razumova, O.V., Kirov, I.V., & Karlov, G.I. (2014). Molecular cytogenetic characterization of the dioecious *Cannabis sativa* with an XV chromosome sex determination system. *PloS one*, 9(1), e85118.
- Gao, S., et.al. (2020). A high-quality reference genome of wild *Cannabis sativa*. *Horticulture research*, 7(1), 1–11.
- Bolger, A.M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, btu170.
- Wang, G., Zhang, X., & Jin, W. (2009). An overview of plant centromeres. *Journal of Genetics and Genomics*, 36(9), 529–537.

УДК 664.681.15/664.681.9

РАЗРАБОТКА РЕЦЕПТУР МУЧНЫХ КОНДИТЕРСКИХ ИЗДЕЛИЙ СО СНИЖЕННОЙ САХАРОЁМКОСТЬЮ

И.М. Святославова, Ю.Ю. Усанова, А.К. Реганян

Московский государственный университет пищевых производств, Москва, Россия

Мучные кондитерские изделия пользуются высоким спросом благодаря своим органолептическим свойствам и низкому ценовому сегменту. Однако вследствие высокой калорийности и гликемического индекса возникает необходимость снижения сахара или сахарной пудры в рецептуре кондитерских изделий [1–3], при этом рационально использовать натуральные ингредиенты, поскольку они содержат моносахариды природного происхождения, которые лучше усваиваются организмом человека [4].

В качестве натуральных компонентов были выбраны яблочно-абрикосовое пюре и яблочные выжимки, так как они содержат также значительное количество пектиновых веществ. За счёт желирующей способности пектина образуются термоустойчивые белково-полисахаридные комплексы, способствующие уменьшению усушки и замедлению очерствения [5–7].

В ходе эксперимента разработана рецептура кекса творожный с добавлением фруктового сырья для снижения сахароёмкости. Опытным путём подбирался процент ввода фруктовых выжимок. Введение в рецептуру фруктового сырья в количестве 7,5 % позволило снизить сахароёмкость с 32,98 % до 30,5 %. Конечный продукт получается хорошего качества, отвечает требованиям физико-химических показателей данного изделия. Добавление выжимок не влияет на структуру и на органолептические показатели, а также проявляется небольшая нотка кисло-фруктового вкуса.

Сахароёмкость в сахарном печенье снизилась с 16,5 до 14,5 %. Полученный продукт имел приятный сладковатый вкус, нежную структуру без следов непромеса, светло-золотистый цвет и запах, характерный данному виду изделия. Готовое изделие соответствовало требованиям ГОСТ 24901–2014 по физико-химическим показателям массовой доли влаги, щёлочности и намокаемости.

Литература

- Кольман О.Я. и др. Перспективы использования шрота калины обыкновенной в производстве мучных кондитерских изделий повышенной пищевой ценности // *Современная наука и инновации*. – 2019. – № 3 (27). – С. 78–86.
- Изучение химического состава нетрадиционных видов муки / Гурьев С.С., Сафонова Э.Э., Малышев Л.Л., Хорева В.И., Смоленская А.Е., Попов В.С. // *Современная наука и инновации*. – 2019. – № 3 (27). – С. 136–144.
- Dewettinck K. Nutritional value of bread: Influence of processing, food interaction and consumer perception / K. Dewettinck [et al.] // *Journal of Cereal Science*. – 2008. – Vol 48. – P. 243–257.
- Дряхлов Е.В. Здоровое питание / Е.В. Дряхлов // *Об утопии к национальной идее* // Хлеб & Ко. – 2018. – № 2. – С. 30–43.
- Ухина Е.Ю. и др. Разработка биотехнологических приемов улучшения качества мучных кондитерских изделий // *Вестник Мичуринского государственного аграрного университета*. – 2011. – № 2–2. – С. 98–101.
- Гурновская Е.Н. Влияние льняной муки и овощного пюре на качество полуфабриката и готового сахарного печенья / Е.Н. Гурновская, Л.А. Мельникова // *Пища. Экология. Качество: Труды XIII международной научно-практической конференции*. – Красноярск: Красноярский государственный аграрный университет, 2016. – С. 311–315.
- Новикова А.В. и др. Разработка нового вида продукции – сахарного печенья с повышенной пищевой ценностью // *Проблемы идентификации, качества и конкурентоспособности потребительских товаров: сборник статей 6-й Международной конференции в области товароведения и экспертизы товаров*. – Курск: Закрытое акционерное общество «Университетская книга», 2018. – С. 243–245.

УДК 640

РОЛЬ TRF-ПОДОБНЫХ БЕЛКОВ В РЕГУЛЯЦИИ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР У *PHYSCOMITRELLA PATENS***А.В. Санникова, Л.Р. Валеева, М.Р. Шарипова, Е.В. Шакиров***Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия*

Одним из важнейших параметров для растительных культур является их жизнеспособность и продолжительность жизни, что напрямую обуславливает их способность к плодоношению и продуктивность. В свою очередь, нормальное функционирование хроматина является первостепенным условием для нормальной жизнедеятельности клеток. Структурами, защищающими большинство ДНК эукариот от повреждений экзонуклеазами и слипания, а также определяющими способность клетки к делению и продолжительность ее жизни, являются теломеры, представляющие собой комплекс повторяющихся последовательностей ДНК и связанных с ней белков. Понимание молекулярно-генетических механизмов регуляции длины теломер и определение генетических маркеров длины теломер, связанным с продолжительностью жизни растений, позволит выявлять более устойчивые линии растений и повысить эффективность процессов селекции новых улучшенных сортов культурных растений. Для изучения теломер и теломер-связывающих белков растений новыми уникальными модельными организмами являются бриофиты – древнейшая группа наземных растений. Бриофиты обладают рядом преимуществ в качестве модельных объектов: они отличаются быстрой регенерацией, внутри и межвидовой изменчивостью в ответ на воздействие окружающей среды, медленной эволюцией геномов. Благодаря своему филогенетическому положению в растительном царстве мох *Physcomitrella patens* предоставляет уникальную возможность проследить эволюцию связанных с теломерами генов от первых примитивных наземных растений до наиболее развитых покрытосеменных растений.

Важным белковым комплексом, участвующим в поддержании длины теломер у млекопитающих, являются белки – компоненты шелтеринового комплекса TRF. Защитная функция шелтерина предотвращает активацию сигнальных путей повреждения ДНК на концах хромосом и блокирует пути репарации двухцепочечного разрыва, который может привести к слипанию концов хромосом и другим неблагоприятным исходам. У большинства исследованных растений также были обнаружены TRF – подобные белки-гомологи, связывающие двухцепочечную теломерную ДНК. Однако в растительных клетках влияние данных белков на теломерную ДНК еще не исследовано. Целью нашей работы было определение функции TRF – подобных белков на длину теломер у *P. patens*.

В результате биоинформационного поиска и филогенетического анализа нами было обнаружено, что геном *P. patens* менее избыточен на примере теломер-ассоциированных белков. Так *P. patens* имеет только 3 гена TRFL, в отличие от арабидопсиса, в геноме которого обнаружено 12 генов TRFL. *P. patens* обладает системой гомологичной рекомбинации, что позволяет получать необходимые линии растений-нокаут по различным целевым генам. Нами была создана векторная конструкция, для проведения трансформации протопластов *P. patens*. Редактирование генома в клетках *P. patens* проходило по механизму гомологичной рекомбинации между последовательностями на гетерологичном векторе и геномной ДНК растений. В результате были получены два индивидуальных растения-нокаута по гену TRFL2. Измерение длины теломер проводили методом TRF совместно с Саузерн-блот анализом. Нами было показано, что для двух растений-нокаут присуще небольшое увеличение длины теломер по сравнению с диким типом. Таким образом, мы предполагаем, что белок TRFL2 является негативным регулятором длины теломер у мха *P. patens*. Дальнейшее изучение других генов TRFL у *P. patens*, а также у растений других групп, позволит установить возможность использования данного гена в качестве одного из генетических маркеров регуляции длины теломер у растений и их жизнеспособности.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 21–14–00147.

ПОДБОР ЗАКВАСОЧНЫХ КУЛЬТУР ДЛЯ ЙОГУРТОВ С ПОВЫШЕННОЙ ПРОБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Д.В. Ключникова, К.Н. Суханова, Д.И. Борисова, А.Р. Пименова

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Ввиду ухудшения экологической обстановки в мире, смена образа и ритма жизни на более ускоренный с преобладанием стрессовых ситуаций, увеличение потребления различных лекарственных препаратов и биологически активных добавок, необходима профилактика заболеваний. Поэтому в настоящее время развитие функциональных продуктов сейчас идет наиболее активно и производство кисломолочных продуктов, а именно йогурта, с пробиотическими свойствами будет актуально.

Целью работы являлось изучение процесса сквашивания, органолептических и физико-химических свойства йогурта, при использовании различных заквасок с разными микроорганизмами, обладающими пробиотическими свойствами. Была изучена возможность использования заквасочных культур прямого внесения Лيوфаст (Lyofast). Дозировку подбирали с учетом рекомендаций производителя.

В таблице 1 представлены органолептические показатели продукта с использованием различных заквасочных культур.

Таблица 1 – Анализ органолептических показателей продукта

Вид йогурта	Закваска	Состав	Продолжительность сквашивания, ч	Отделение сыворотки	Запах
Бифидоацидофильный	Lyofast YAB 450	Streptococcus thermophilus,	2	0	Молочный
		Lactobacillus	4	+	Слабокислый
		delbrueckii subsp.	6	+	Кислый
		Bulgaricus,	8	++	Выраженный
		Lactobacillus acidophilus,	10	+++	кисломолочный
С добавлением бифидобактерий	Lyofast Y 450+	Bifidobacterium			Сильный
		Streptococcus thermophilus,	2	0	Молочный
		Bifidobacterium	4	+	Слабокислый
			6	+	Кислый
			8	++	Кисломолочный
			10	+++	Сильный
С использованием йогуртных культур	Lyofast Y 450	Streptococcus thermophilus,	2	0	Молочный
		Lactobacillus	4	+	Молочный
		delbrueckii subsp.	6	+	Молочный
		Bulgaricus	8	++	Слабый
			10	+++	кисломолочный
					Кисломолочный

Установлено, что йогурт с бифидоацидофильной закваской достигает необходимой кислотности быстрее остальных образцов ((85–90) °Т). Бифидобактерии и ацидофильная палочка в составе закваски кроме повышенной пробиотической активности придают более выраженный вкус и аромат продукту.

УДК 664.292

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭКСТРАКЦИИ ПЕКТИНА ИЗ ОТХОДОВ ПЕРЕРАБОТКИ ЯБЛОК ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ И НЕИОНОГЕННЫХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Л.Н. Скрыпник, А.Е. Новикова

Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, Калининград, Россия

Введение. Промышленность по переработке фруктов и овощей производит большое количество побочных продуктов, таких как кожура, семена и скорлупа, которые содержат большое количество биоактивных компонентов, включая антиоксиданты (полифенолы, токоферолы), пигменты, ароматические соединения, белки, эфирные масла, ферменты и пищевые волокна. Пектин является одним из наиболее распространенных компонентов в отходах пищевой промышленности и побочных продуктах биомассы, поэтому оптимизация экстракции и извлечения пектина важна для полной оценки этих сырьевых ресурсов [1].

Пектин представляет собой структурный комплекс, состоящий из основной цепи (1–4) остатков α -D-галактуроновой кислоты, которые частично этерифицированы метиловым спиртом по карбоновой кислоте, и некоторых нейтральных сахаров [2].

При производстве яблочных соков пектиновые вещества практически полностью остаются в яблочных выжимках – отходах переработки яблок. Содержание пектина в них составляет 10–17 % в пересчете на сухую массу [3]. Использование яблочных выжимок в качестве сырья для экстракции из них пектина позволит, во-первых, сократить количество отходов переработки яблок и, во-вторых, более экономно расходовать растительные ресурсы.

На сегодняшний день можно выделить несколько основных подходов, используемых при экстракции соединений пектиновой природы. Это классические методы, основанные на способности хорошо растворяться в водно-спиртовых растворах. Также, методы ультразвуковой, микроволновой экстракции [4]. Однако использование пектинов как биологически активных соединений в коммерческих целях требует разработки экологически чистых и экономически эффективных методов экстракции из растительного сырья. В связи с этим, методы экстракции, относящиеся к так называемой «зеленой химии», приобретают все большее значение.

Мицеллярная экстракция – это метод, основанный на использовании поверхностно-активных веществ и позволяющий проводить экстракцию за более короткий промежуток времени, без использования органических растворителей, что важно для сохранения термолабильных компонентов и для сокращения потребления энергии [5]. Другим современным, экологически-чистым способом получения пектина является биотехнологический способ, основанный на применении при экстракции гидролитических ферментов, как правило, микробного происхождения. Ранее было показано, что использование ферментных препаратов позволяет повысить выход пектина при экстракции с сохранением его качественных характеристик [6]. Таким образом, сочетание мицеллярной и ферментативной экстракции должно позволить повысить выход пектина, сократить время экстракции и снизить расход органических растворителей и минеральных солей.

В связи с этим целью данной работы являлся подбор параметров экстракции пектина из отходов переработки яблок с использованием ферментных препаратов и неионогенных поверхностно-активных веществ.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовали отходы переработки яблок сорта Royal Gala (Италия). Яблочные выжимки были получены при отжиме сырья на соковыжималке (Журавинка, Беларусь). Затем полученные отходы высушивали в сушильном шкафу (Binder, Германия) при 60 °C до постоянного веса. Далее высушенный жмых подвергали измельчению до размера частиц 0,1 мм и просеивали. Подготовленные яблочные выжимки хранили в плотно закрывающейся емкости при комнатной температуре.

Экстракцию пектина проводили двумя методами. В качестве контрольного использовался «классический» метод экстракции, основанный на осаждении пектиновых веществ концентрированной соляной кислотой [7].

Для проведения мицеллярно-ферментативной экстракции к 2 г измельченного образца добавляли 60 мл 0,05 н HCl, гидролитические ферменты и ПАВ. Экстракцию проводили в течение 3 часов при

температуре 40 °С, затем экстракт отфильтровывали через марлю. Полученный фильтрат разливали в пробирки, после чего в каждую пробирку добавляли 35 мл 95 % спирта. Эти пробирки отправляли в холодильник на 12 часов. По истечении этого времени пробирки ставили центрифугироваться на 25 минут при 3900 об/мин. Затем полученный осадок промывали 70 % спиртом и снова ставили центрифугироваться в течение 25 минут при 3900 об/мин. Промывание спиртом повторяли 3 раза, после чего полученный пектин высушивали в сушильном шкафу при температуре 60 °С. После полного высыхания пробирки взвешивали и рассчитывали выход пектина из сырья.

В качестве гидролитических ферментов использовали ксиланазу (активность – 10000 ед./г), целлюлазу (активность – 2 500 ед./г) и их смесь, в качестве ПАВ – полисорбат-20 и полисорбат-80. После выбора оптимальных ферментов и ПАВ проводился подбор их эффективных концентраций согласно вариантам эксперимента, представленным в таблице 1.

Таблица 1 – Варианты эксперимента по подбору концентрации ПАВ и гидролитических ферментов для экстракции пектина из яблочной выжимки

Вещество	Варианты эксперимента				
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5
Целлюлаза, мг/г сырья	10	20	30	50	75
Ксиланаз, мг/г сырья	2,5	5,0	25	50	75
ПАВ, %	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5

Выделенный пектин проверяли на содержание в нем галактуроновой кислоты и степень этерификации согласно [8].

Эффективность экстракции оценивали по величине выхода пектина, выраженного в %. Все эксперименты повторялись минимум 3 раза. На графиках представлены средние значения с указанием стандартного отклонения. Полученные экспериментальные данные были обработаны статистически с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Достоверность различий между средними оценивали с помощью критерия Тьюки (при $p \leq 0,05$). Достоверно различимые средние обозначены на рисунках различными латинскими буквами.

Результаты. Мицеллярно-ферментативная экстракция подразумевает под собой использование в ходе экстракции ферментов и поверхностно-активных веществ. Результаты исследования эффективности экстракции пектина при использовании ксиланазы и целлюлазы, а также их смеси представлены на рисунке 1.

Как видно из представленных на рисунке 1 данных, использование смеси гидролитических ферментов позволяет повысить выход пектина в 1,2–1,5 раза по сравнению с применением отдельных ферментных препаратов.

При выборе эффективного поверхностно-активного вещества учитывалась не только его способность повышать выход пектина при экстракции, но и возможность его использования в пищевой или фармацевтической промышленности без вреда для здоровья человека. Среди неионогенных ПАВ к использованию в качестве пищевых добавок разрешены вещества группы полисорбатов. Результаты исследования эффективности экстракции пектина при использовании в качестве экстрагентов растворов полисорбата-20 и полисорбата-80 показали, что применение полисорбата-20 совместно со смесью гидролитических ферментов позволяет добиться более высокого выхода пектина (рисунок 2).

Результаты исследований по подбору концентраций ферментов и полисорбата-20 представлены на рисунке 3.

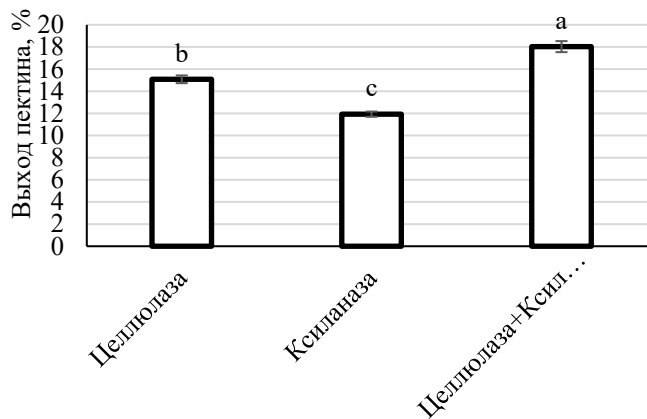


Рисунок 1. Выход пектина при экстракции из яблочной выжимки в зависимости от используемого ферментного препарата

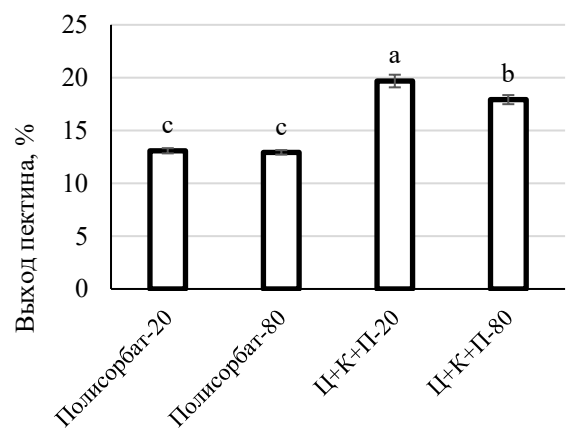


Рисунок 2. Выход пектина при экстракции из яблочной выжимки в зависимости от используемого ПАВ и ферментов (Ц – целлюлаза, К – ксиланаза, П-20 – полисорбат-20, П-80 – полисорбат-80)

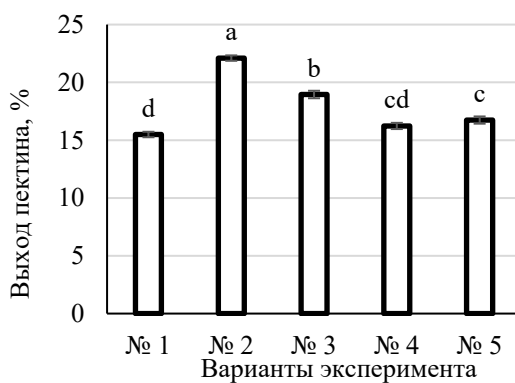


Рисунок 3. Содержание пектина в яблочной выжимке, в зависимости от концентраций ПАВ и ферментов (номера вариантов экспериментов соответствуют номерам, представленным в таблице 1)

Оптимальными концентрациями для проведения мицеллярно-ферментативной экстракции пектина из яблочной выжимки являлись: для полисорбата-20 – 1 % водный раствор, для целлюлазы – 20 мг и для ксиланазы – 5 мг на 1 г сырья.

Сравнительная характеристика выхода пектина и его качественных характеристик при использовании «классического метода экстракции» и мицеллярно-ферментативной экстракции представлены в таблице 2.

Как видно из представленных в таблице 2 данных выделенный с использованием ферментных препаратов и ПАВ пектин отличался высокой степенью этерификации ($74,1 \pm 0,8$ %) и содержанием галактуроновой кислоты ($75,1 \pm 0,3$ %), что позволяет использовать данный пектин в пищевой промышленности.

Таблица 2 – Результаты сравнительного анализа выхода пектина и его качественных характеристик при использовании «классического» метода и мицеллярно-ферментативной экстракции

Показатель	«Классический» метод экстракции	Мицеллярно-ферментативная экстракция
Выход пектина, %	$18,3 \pm 0,4$	$22,1 \pm 0,2$
Массовая доля галактуроновой кислоты, %	$68,4 \pm 0,6$	$75,1 \pm 0,3$
Степень этерификации, %	$76,7 \pm 1,1$	$74,1 \pm 0,8$

Дискуссия

Основными промышленными источниками для извлечения пектина являются яблочные выжимки и кожура citrusовых, представляющие собой отходы после соковых производств. «Классические» методы экстракции пектина основаны на использовании концентрированных минеральных кислот и высоких температур. При этом очень низкие значения pH и высокие температуры вызывают риск коррозии и быстрого износа оборудования. Применение ферментных препаратов позволяет преодолеть указанные недостатки кислотной экстракции, поэтому представляет собой выгодную альтернативу «классическому» методу.

Как показали проведенные нами исследования использование отдельно целлюлазы или ксиланазы при экстракции пектина из яблочных выжимок не позволяла достигать выхода, получаемого при кислотной экстракции. При использовании смеси ферментов выход пектина был соизмерим с выходом при кислотной экстракции (18,0 % и 18,3 % соответственно). Ранее в работе [9] также было показано, что при использовании целлюлазы выход пектина был практически в два раза ниже по сравнению с «классическим» методом. При этом данные, представленные в работе [6], свидетельствуют об эффективности использования эндо-ксиланазы при экстракции пектина из яблочных выжимок.

Использование поверхностно-активных веществ является эффективным решением при экстракции биологически активных соединений из растительного сырья. Мицеллярная экстракция дает преимущество растворения различных типов гидрофильных и липофильных соединений и возможность концентрирования растворенных веществ, что приводит к высокой эффективности экстракции и извлечению продукта. Кроме того, этот вид экстракции может быть принят как экологический, эффективный и дешёвый метод [10]. В нашем исследовании установлено, что добавление полисорбата-20 в экстракционную среду, содержащую гидролитические ферменты, позволяет повысить выход пектина на 20 % по сравнению с «классическим» кислотным методом. Ранее было показано, что использование сурфактантов совместно с микроволновым излучением повышает эффективность экстракции пектина из кожуры апельсинов [11].

Галактуроновая кислота является основным компонентом пектиновых полисахаридов что делает его определение очень важным шагом в анализе химической структуры пектина. В высокомолекулярном пектине насчитывают от 300 до 1000 остатков галактуроновой кислоты. Считается, что используемый в промышленности пектин должен содержать не менее 65 % галактуроновой кислоты [9]. Другим важным показателем, определяющим способность пектина образовывать гели является степень этерификации, представляющая собой отношение числа этерифицированных карбоксильных групп к общему содержанию карбоксильных групп в пектине. К высокоэтерифицированным пектинам относятся пектины со степенью этерификации более 50 %. Таким образом, выделенный в нашем исследовании пектин является высокоэтерифицированным (степень этерификации – $74,1 \pm 0,8$ %) с высоким содержанием галактуроновой кислоты (более 65 %).

Заключение. В ходе проведенного исследования было выявлено, что использование при экстракции пектина из отходов переработки яблок смеси ферментов (целлюлазы и ксиланазы) и неионогенного ПАВ (полисорбата-20) позволяет повысить его выход на 20 %. Высокий выход пектина достигался при относительно низкой температуре экстракции – 40 °С, а выделенный пектин характеризовался высоким содержанием галактуроновой кислоты и степенью этерификации, что позволяет использовать данный пектин в пищевой промышленности в качестве гелеобразователя.

Литература

- 1) Chen M., Lahaye M. Natural deep eutectic solvents pretreatment as an aid for pectin extraction from apple pomace // *Food Hydrocolloids*. 2021. Vol. 115. P. 106601.
- 2) Wang S., Chen F., Wu J., Wang Z., Liao X., Hu X. Optimization of pectin extraction assisted by microwave from apple pomace using response surface methodology // *Journal of food engineering*. 2007. Vol. 78(2). P. 693–700.
- 3) Sharma P.C., Gupta A., Kaushal, P. (2014). Optimization of method for extraction of pectin from apple pomace // *Indian journal of natural products and resources*. 2014. Vol. 5 (2). P. 184–189.
- 4) Marić M., Grassino A.N., Zhu Z., Barba F.J., Brnčić M., Brnčić S.R. An overview of the traditional and innovative approaches for pectin extraction from plant food wastes and by-products: Ultrasound-, microwaves-, and enzyme-assisted extraction // *Trends in Food Science & Technology*. 2018. Vol. 76. P. 28–37.
- 5) Plotka-Wasyłka J., Rutkowska M., Owczarek K., Tobiszewski M., Namieśnik, J. Extraction with environmentally friendly solvents // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2017. Vol. 91. P. 12–25.
- 6) Wikiera A., Mika M., Starzyńska-Janiszewska A., Stodolak, B. Endo-xylanase and endo-cellulase-assisted extraction of pectin from apple pomace // *Carbohydrate polymers*. 2016. Vol. 142. P. 199–205.
- 7) Ольховатов Е.А., Родионова Л.Я., Щербакова Е.В. Разработка методики определения количества пектиновых веществ в сырье и продуктах его переработки // *Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета*. 2017. № 128 (04). С. 665–678.
- 8) Peng X., Yang G., Shi Y., Zhou Y., Zhang M., Li S. Box–Behnken design based statistical modeling for the extraction and physicochemical properties of pectin from sunflower heads and the comparison with commercial low-methoxyl pectin // *Scientific reports*. 2020. Vol. 10 (1). P. 1–10.
- 9) Dranca F., Vargas M., Oroian M. Physicochemical properties of pectin from *Malus domestica* 'Fălticeni' apple pomace as affected by non-conventional extraction techniques // *Food Hydrocolloids*. – 2020. Vol. 100. P. 105383.
- 10) Skrypnik L., Novikova A. Response Surface Modeling and Optimization of Polyphenols Extraction from Apple Pomace Based on Nonionic Emulsifiers // *Agronomy*. 2020. Vol. 10. P. 92.
- 11) Su D.L., Li P.J., Quek S.Y., Huang Z.Q., Yuan Y.J., Li G.Y., Shan Y. (2019). Efficient extraction and characterization of pectin from orange peel by a combined surfactant and microwave assisted process // *Food chemistry*. 2019. Vol. 286. P. 1–7.

УДК 579.647

БАКТЕРИИ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ УРОЖАЙНОСТИ СОИ

И.Э. Смирнова, А.К. Саданов

Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

Введение. Одной из проблем сельскохозяйственного сектора является дефицит белка в питании людей и недостаточность кормовой базы для развития животноводства. Возможным решением этих проблем является увеличение производства высокобелковых зернобобовых культур и, прежде всего, сои (*Glycine max* (L.) Merr.) [1]. В мировом масштабе соя по важности сопоставима с пшеницей, рисом и кукурузой. Высокое содержание в зерне полноценного по аминокислотному составу белка (до 45–48 %) и высококачественного масла (до 25 %) определяют её широкое применение [2].

Для повышения урожайности сои применяют минеральные азотные и фосфорные удобрения. Применение высоких доз этих удобрений позволяет добиться высоких урожаев, но при этом наносит существенный урон здоровью почвы. Одним из основных элементов питания растений является азот. Недостаток азота вызывает существенную задержку роста и развития растений, замедляет их цветение, завязывание бобов и вызывает общее ослабление иммунитета растений [3]. Для улучшения азотного питания сои применяют химические и биологические удобрения, но упор делается на применение препаратов на основе клубеньковых бактерий. В Казахстане также используют препараты под культуру сои на основе клубеньковых бактерий, но в основном, импортного происхождения, отечественных препаратов нет [4]. Однако применение импортных препаратов часто оказывается малоэффективным, что связано с неприспособленностью бактерий к почвенно-климатическим условиям Казахстана, плохой приживаемостью бактерий на корнях сои и антагонистическими взаимоотношениями с почвенной микрофлорой [5]. Другим не менее важным питательным элементом для сельскохозяйственных культур является фосфор, он ускоряет рост, развитие растений, процесс их созревания, увеличивает холодостойкость и устойчивость культур к вредителям и болезням [6]. Однако чрезмерное и систематическое использование фосфорных удобрений приводит к загрязнению воды, почвы и другим негативным последствиям [7]. Альтернативным путем повышения доступности фосфатов почвы является применение фосфатмобилизирующих микроорганизмов. Эти микроорганизмы способствуют мобилизации нерастворимых минеральных фосфатов и повышению их биодоступности растениями как из почвы, так и из минеральных фосфорных удобрений [8]. В результате их применения до 20–30 % труднодоступных фосфатов за вегетационный период превращаются в доступные растениям формы [9]. Целью данного исследования было выделение и получение высокоактивных штаммов клубеньковых и фосфатмобилизирующих бактерий, создание их ассоциаций для повышения урожайности сои. Новизна данного исследования заключается в том, что для повышения урожайности сои будут одновременно применяться биосовместимые штаммы разных групп почвенных бактерий. Использование таких бактерий в сельскохозяйственном производстве предлагает наиболее выгодное и экологически безопасное увеличение продуктивности сои без дополнительного внесения минеральных удобрений.

Материалы и методы. Выделение фосфатмобилизирующих бактерий проводили из почв, собранных в ризосфере сои в Алматинской области Казахстана. Почвы отбирали в соответствии с ГОСТ с соблюдением правил асептики и помещали в стерильную тару. [10]. Фосфатмобилизирующие бактерии выделяли на среде NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate growth medium) [11]. Для выделения бактерий 15 г. почвы разводили 90 мл дистиллированной стерильной воды и перемешивали на шейкере при 180 об/мин в течение 2 часов. Посев микроорганизмов проводили из разведений в чашки Петри с агаризованной средой, затем чашки помещали в термостат при 28° С и выдерживали до появления четких прозрачных зон в среде (зон «гало») вокруг колоний бактерий (2–3 суток). Выделение клубеньковых бактерий проводили из клубеньков на корнях сои. От корня пинцетом были отделены крупные клубеньки, их помещали в 70 % раствор этанола на 30 секунд, затем обрабатывали 0,1 % HgCl_2 2 мин. После этого клубеньки многократно промывали стерильной водой, переносили в чашку Петри и скальпелем разрезали на части. Содержимое клубенька размазывали шпателем по поверхности агаризованной среды Мазе [12]. На среде Мазе клубеньковые бактерии образовывали бесцветные или молочно-белые слизистые колонии,

Биосовместимость фосфатмобилизирующих и клубеньковых бактерий изучали методом перпендикулярных штрихов [13]. Клубеньковые бактерии высевали штрихом по центру чашки Петри на агаризованную среду Мазе, фосфатмобилизирующие бактерии высевали перпендикулярно к штриху клубеньковых бактерий. Через 3–5 дней проводили изучение наличия или отсутствия зон задержки роста фосфатмобилизирующих бактерий от центрального штриха. Штаммы бактерий, не обладающие антагонизмом, будут расти в непосредственной близости от центрального штриха.

Для изучения способности клубеньковых бактерий образовывать клубеньки (нодуляция), бактерии выращивали в жидкой среде Мазе на шейкере при скорости 180 об/мин и температуре 28° С в течение 5 суток. Семена сои перед посевом инокулировали суспензией бактерий с титром клеток 10^8 кл/мл, в течение двух часов при температуре 23° С. Затем семена высевали в вегетационные сосуды. В качестве субстрата для роста растений использовали стерильный вермикулит, для питания проростков применяли жидкую среду Кноппа. Контролем служили семена без инокуляции бактериями. Подсчет количества и массы клубеньков проводили через 45 дней выращивания.

Фосфатмобилизирующую активность бактерий изучали по методике Сеги [14]. В агаризованной среде NBRIP, содержащей нерастворимый трикальцийфосфат в виде тонкого осадка, придающего питательной среде однородную мутность, пробивали стерильным буром лунки диаметром 7 мм и помещали 0,5 мл бактериальной суспензии с концентрацией 10^8 кл/мл. В качестве контроля в лунки помещали стерильную среду NBRIP. Чашки инкубировали при 28 °С в течение 3 суток до образования прозрачных зон (гало) вокруг лунок. Фосфатмобилизирующую активность бактерий оценивали по диаметру зон гало в мм.

Нитрогеназную активность клубеньковые бактерии определяли ацетиленовым методом [15]. Для этого бактерии выращивали на среде Мазе в условиях аэрации до концентрации 10^8 кл/мл. Суспензию бактерий помещали в сосуды на 10 мл, ацетилен вводили до концентрации 10 % (по объему). После инкубации культур в течение 1,5 ч в атмосфере ацетилена пробы газа отбирали шприцем по 1 мл из сосуда и определяли наличие этилена на газовом хроматографе “Agilent Technology 7890 B” (США) с пламенно-ионизационным детектором.

Для изучения влияния бактерий на всхожесть семян и развитие растений сои фосфатмобилизирующие и клубеньковые бактерии выращивали отдельно. Затем суспензии бактерий смешивали в соотношении 1:1. Семена перед посевом инокулировали ассоциацией бактерий с титром 10^8 клеток/мл в течение двух часов при 23 °С. Обработанные семена высевали в вегетационные сосуды объемом 500 мл, по 15 растений на сосуд. Контролем служили семена без обработки. Всхожесть семян определяли подсчетом количества проросших семян в вариантах и контроле. Для оценки ростостимулирующей активности измеряли длину стебля, корней, считали число листьев на одно растение и сравнивали их с показателями в контроле.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ «STATISTICA 10.0» [16].

Результаты и обсуждение. Из почв Алматинской области Казахстана, собранных в ризосфере сои, были выделены фосфатмобилизирующие бактерии. Установлено, что численность бактерий в ризосфере сои была низкой и составляла 5–7 % от общей численности бактериальной микрофлоры. Всего было выделено 32 чистые культуры фосфатмобилизирующих бактерий. Установлено, что бактерий различались по основным культурально-морфологическим свойствам. Колонии, в основном, были округлые с ровным краем от 0,9 до 2,5 мм в диаметре, кремового и бледно-желтого цвета. Клетки бактерий были палочковидной формы, спорообразующими и неспорообразующими. Некоторые бактерии с возрастом приобретали кокковидную форму. Бактерии были грамположительными и грамотрицательными, и характеризовались подвижностью клеток. Исследование физиолого-биохимических признаков бактерий показало, что культуры были аэробами или факультативными анаэробами, каталазоположительными. Показано, что бактерии различались по способности утилизировать соединения углерода, образовывать индол, сероводород и разжижать желатину.

Идентификация бактерий молекулярно-генетическими методами показала, что были они, в основном, относятся к родам *Bacillus* и *Pseudomonas*.

Для оценки способности бактерий мобилизовать фосфаты, бактерии выращивали в жидкой среде NBRIP в течение 5 суток. Начальный титр бактерий составлял 10^5 КОЕ/мл. Через трое и пять суток определяли активность мобилизации фосфатов. В качестве контроля использовали среду того же состава. В таблице 1 представлены данные по изучению фосфатмобилизирующей активности шести штаммов, показавших наиболее высокие результаты.

Таблица 1 – Рост и активность мобилизации фосфатов штаммами бактерий

Штаммы бактерий	Длительность культивирования, сут.					
	3			5		
	КОЕ/мл	pH	Диаметр зоны гало, мм	КОЕ/мл	pH	Диаметр зоны гало, мм
Контроль	-	6,8	0	-	6,8	0
<i>Bacillus sp.</i> FL-2	$3,9 \times 10^6$	5,1	14,2	$7,8 \times 10^8$	4,3	17,8
<i>Bacillus sp.</i> FU-3	$3,5 \times 10^7$	4,9	13,9	$7,8 \times 10^8$	4,4	18,2
<i>Pseudomonas sp.</i> FT-4	$4,4 \times 10^7$	4,7	14,8	$7,6 \times 10^8$	4,2	18,3
<i>Pseudomonas sp.</i> FM-9	$4,0 \times 10^7$	4,5	12,9	$6,4 \times 10^8$	4,6	16,2
<i>Bacillus sp.</i> F-11	$4,1 \times 10^6$	4,6	11,7	$6,9 \times 10^8$	4,5	15,8
<i>Pseudomonas sp.</i> F-30	$3,3 \times 10^6$	4, 7	12,9	$6,3 \times 10^8$	4,4	16,1
Примечание: $p < 0,05$						

Данные таблицы 1 показывают, что бактерии обладали высокой способностью к мобилизации фосфатов. Из шести штаммов три штамма характеризовались средней активностью мобилизации фосфатов (15,8–16,2 мм) и три штамма FL-2, FU-3, FT-4 – высокой. Диаметр зон растворения фосфатов этими штаммами составлял 17,8–18,3 мм. Максимальную активность фосфатмобилизации отмечали у штамма FT-4 (18,3 мм). Установлено, что активность у штамма FU-3 была практически на уровне штамма FT-4.

Из клубеньков на корнях сои были выделены клубеньковые бактерии. Для выделения были собраны здоровые растения сои с хорошо развитой коневой системой. Был проведен мониторинг и выбраны растения с большим числом клубеньков на корнях. В результате проведенной работы из клубеньков было выделено 26 изолятов бактерий. Идентификация бактерий молекулярно-генетическими методами показала, что они относятся к родам *Bradyrhizobium* и *Rhizobium*, к видам *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium cajanii*, *Bradyrhizobium liaoningense* и *Rhizobium lupini*.

Далее провели изучение нитрогеназной активности и нодуляции штаммов бактерий. Семена перед посевом обрабатывали суспензией клубеньковых бактерий как описано в разделе «Материалы и методы». В качестве контроля семена замачивали в воде. В таблице 2 приведены данные семи наиболее перспективных штаммов клубеньковых бактерий.

Таблица 2 – Активность нитрогеназы и образование клубеньков штаммами бактерий

Штаммы бактерий	Нитрогеназная активность, мкмоль C_2H_4 /мл/ч	Количество клубеньков на растение, шт.	Сухой вес клубеньков, мг/растение
Контроль	-	0	0
<i>B. liaoningense</i> RMA-1/27	3,87	16,8	128,3
<i>Rh. lupini</i> RH-2/19	2,32	14,6	130,2
<i>B. japonicum</i> RH-3/42	5,25	21,1	142,2
<i>R. lupini</i> RH-4/39	3,65	18,6	137,5
<i>B. japonicum</i> RH-6/47	6,31	27,2	153,2
<i>B. japonicum</i> RH-7/54	6,34	28,4	158,5
<i>B. japonicum</i> RH-8/21	7,84	32,3	198,4
Примечание: $p < 0,05$			

Результаты, приведенные в таблице 2 показывают, что штаммы бактерий активно фиксируют азот атмосферы и образуют клубеньки на корнях сои. Три штамма бактерий обладали средней активностью азотфиксации и нодуляции, один штамм выше средней и три штамма *B. japonicum* RH-6/47, *B. japonicum* RH-7/54 и *B. japonicum* RH-8/21 высокой способностью к нодуляции и фиксации азота. Максимальную активность отмечали у штамма RH-8/21.

Поскольку планируется создание совместное применение бактерий провели изучение биосовместимости штаммов фосфатмобилизирующих и клубеньковых бактерий. Установлено, что штаммы бактерий биосовместимы и не обладали антагонизмом по отношению к друг к другу.

На основе полученных данных были созданы ассоциации бактерий, в которые были включены наиболее активные и перспективные штаммы фосфатмобилизующих и клубеньковых бактерий. С созданными ассоциациями были поставлены модельные опыты по изучению их влияния на рост и развитие сои и образование клубеньков на ее корнях. Было показано, что все исследуемые ассоциации повышали всхожесть семян, увеличивали длину стебля и корня и число клубеньков на корнях сои. На рисунке 2 приведены данные влияния трех наиболее эффективных ассоциаций (Ассоциации 2, 5 и 17) на рост сои и нодуляцию корней.

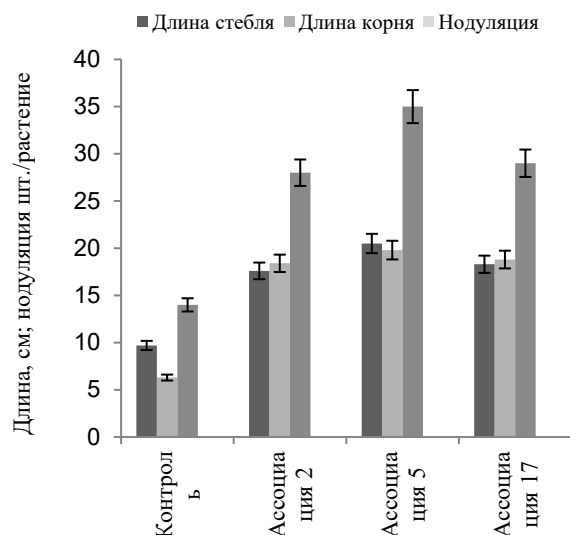


Рисунок – Влияние ассоциаций на длину стеблей, корней и образование клубеньков на корнях сои

На рисунке 2 видно, что ассоциации обладают высокой ростостимулирующей активностью. Так, инокуляция семян ассоциациями увеличивала длину стебля сои в среднем в 1,8–2,0 раза, корня – в 2,9–3,1 раза, количество клубеньков на одно растение возросло в 2,0–2,5 раза по сравнению с контролем (рисунок). Все это свидетельствует о высокой перспективности применения этих групп бактерий для выращивания сои.

Закключение. Клубеньковые и фосфатмобилизующие бактерии играют важную роль в питании растений. Однако их совместное влияние на рост, развитие и продуктивность сои изучено недостаточно. В нашем исследовании проведено выделение клубеньковых и фосфатмобилизующих бактерий из ризосферы сои и клубеньков на ее корнях. В общей сложности было выделено 32 чистые культуры фосфатмобилизующих и 26

культур клубеньковых бактерий. Проведено изучение основных культурально-морфологических признаков штаммов бактерий и установлено их таксономическое положение молекулярно-генетическими методами. Показано, что фосфатмобилизующие бактерии в основном принадлежат к родам *Bacillus* и *Pseudomonas*, а клубеньковые – к родам *Bradyrhizobium* и *Rhizobium*, к видам *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium cajanii*, *Bradyrhizobium liaoningense* и *Rhizobium lupini*. Изучение способности бактерий к мобилизации фосфатов, исследование нитрогеназной активности и способности к нодуляции, позволило отобрать высокоактивные штаммы клубеньковых и фосфатмобилизующих бактерий. Проведено изучение биосовместимости отобранных штаммов. Установлено, что штаммы бактерий биосовместимы. На основе наиболее перспективных штаммов созданы три ассоциации бактерий. Показано, что ассоциации обладают высокой ростостимулирующей активностью, положительно влияют на формирование растений и увеличивают число клубеньков на корнях сои.

Результаты исследований указывают на высокую перспективность совместного использования клубеньковых и фосфатмобилизующих бактерий при возделывании сои. Под влиянием ассоциаций улучшается азотное и фосфорное питание растений сои. Полученные результаты позволяют предложить новые подходы к повышению продуктивности сои или других зернобобовых растений. Высокая ростостимулирующая активность, улучшение азотного и фосфорного питания растений, свидетельствуют о возможности совместного использования этих групп бактерий для повышения урожайности сои.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан (грант AP09259080).

Литература

- Gaweda D., Nowak A., Haliniarz M. Yield and economic effectiveness of soybean grown under different cropping systems. *International Journal of Plant Production*. 2020. Vol. 14. P. 475–485. <https://doi.org/10.1007/s42106-020-00098-1>.
- Wijewardana C., Reddy K.R., Bellaloui N. Soybean seed physiology, quality, and chemical composition under soil moisture stress. *Food Chemistry*. 2019. Vol. 278. P. 92–100. doi: 10.1016/j.foodchem. 2018.11.035.
- Ерматова Д.Е., Рахимова Х.М., Ибрагимова С.Ю. Рост и развитие соевых бобов при комбинированном внесении азотных удобрений с инокуляцией. *Молодой ученый*. 2018. Т. 17(203). С. 148–150.
- Кадырбекова Л.К. Биопрепараты в сельском хозяйстве. Аграрник Казахстана. <http://abkaz.kz/biopreparaty-v-selskom-hozyajstve>. (опубл. 10.06.2021).
- Pannecoucq J., Goormachtigh S., Ceusters J., Debode J. Temperature as a key factor for successful inoculation of soybean with *Bradyrhizobium* spp. under cool growing conditions in Belgium. *Journal of Agricultural Science*. 2018. Vol. 156. P. 493–503. <https://doi.org/10.1017/S0021859618000515>.
- Wiel C.C.M., Linden C.G., Scholten O.E. Improving phosphorus use efficiency in agriculture: opportunities for breeding. *Euphytica*. 2016. Vol. 207. P. 1–22. <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1572-3>.
- Ali W., Nadeem M., Ashiq W. The effects of organic and inorganic phosphorus amendments on the biochemical attributes and active microbial population of agriculture podzols following silage corn cultivation in boreal climate. *Scientific Reports*. 2019. Vol. 9. ID 17297. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53906-8>.
- Sharma S.B., Sayyed R.Z., Trivedi M.H., Gobi T.A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springerplus*. 2013. Vol. 2. P. 587–591. doi: 10.1186/2193-1801-2-587.
- Alori E.T., Glick B.R., Babalola O.O. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers Microbiology*. 2017. Vol. 2(8). P.971–978. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>.
- ГОСТ 17.4.4.02–2017. Охрана Природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа. М.: Стандартинформ, 2017. 12 с.
- Mohamed A.E., Nessim M.G., Abou-el-Seoud I.I. Isolation and selection of highly effective phosphate solubilizing bacterial strains to promote wheat growth in Egyptian calcareous soils. *Bulletin of the National Research Centre*. 2019. Vol. 43. P. 203. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0212-9>.
- Stiles W. Trace Elements in Plants. New York: Cambridge University Press, 2013, 249 p. doi:10.1017/cbo9781316530412.
- Нетрусов А.И., Котова И.Б. Микробиология: теория и практика. М.: Юрайт, 2019. 315 с.
- Сегі Ю. Методы почвенной микробиологии. М.: Колос, 1983. 162 с.
- Das S., De T.K. Microbial assay of N₂ fixation rate, a simple alternate for acetylene reduction assay. *Methods X*. 2018. Vol. 5. P. 909–914. doi: 10.1016/j.mex.2017.11.010.
- Боровиков В.П. Популярное введение в современный анализ данных в системе STATISTICA. М.: Stat Soft, 2013. 268 с.

УДК 664

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ЙОГУРТНОГО ПРОДУКТА С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ**Е.А. Пожидаева, Л.В. Голубева, Я.А. Дымовских, Е.С. Попов***Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия*

Экзополисахаридам, синтезируемым пробиотическими микроорганизмами в процессе ферментации молочных или безмолочных систем, отводится важная физиологическая и технологическая роль. Данные биообъекты могут выступать не только в качестве эффективного альтернативного заменителя пищевых добавок, улучшающего потребительские свойства продуктов, но и выступить в роли фактора, расширяющего спектр их функциональных свойств, например, повышения адгезионной активности лакто- и бифидобактерий на слизистых поверхностях желудочно-кишечного тракта [1, 2]. Имеются данные об антиканцерогенных, противовирусных, пребиотических, иммуномодулирующих и гипохолестеринемических свойствах экзополисахаридов [3, 4]. В результате синтеза микробных экзополисахаридов происходит их накопление в ферментируемой системе одновременно с накоплением кислоты, что сопровождается дополнительным связыванием влаги.

Исследуемые объекты – обезжиренные ферментированные пробиотические молочные продукты, содержащие лиофилизированные бактериальные заквасочные культуры прямого внесения YF-L812, YO-PROX 501, YO-PROX 753, YO-PROX 777. В состав заквасочных культур входили определенные штаммы микроорганизмов: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. Перед внесением заквасочных культур обезжиренное молоко подвергалось пастеризации при 85⁰ С в течении 3–5 с и охлаждению до 38–40⁰ С. В подготовленную молочную среду вводили заквасочные культуры с последующей ферментацией в течении 4,5–5 часов до достижения в системе pH=4,6–4,7 и охлаждением до 4–6⁰ С.

Для определения количества вырабатываемых экзополисахаридов микроорганизмами заквасочных культур применяли фенол-серный метод. В ходе проведения исследований получены экспериментальные данные по оптической плотности растворов (табл. 1).

Таблица 1 – Показатели оптической плотности

Наименование заквасочной культуры	Оптическая плотность, А			
	Опыт № 1	Опыт № 2	Опыт № 3	Опыт № 4
YO-PROX 777	640	640	643	644
YO-PROX 501	474	473	476	475
YF-L 812	450	448	451	448
YO-PROX 753	561	560	557	561

На основе данных оптической плотности и концентрации раствора глюкозы получен калибровочный график (рис. 1), позволяющий идентифицировать концентрацию полисахаридов в растворе, согласно которому определена концентрация экзополисахаридов в ферментированных системах (табл. 2).

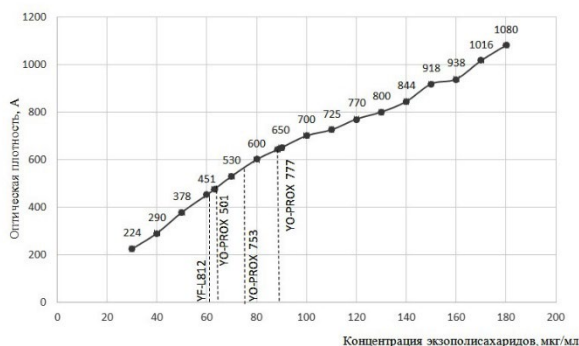


Таблица 2 – Содержание экзополисахаридов в ферментированных системах

Заквасочная культура	Концентрация экзополисахаридов, мкг/мл
YO-PROX 777	89
YO-PROX 501	64
YF-L 812	61
YO-PROX 753	75

Рисунок 1 – Калибровочная кривая раствора глюкозы

Установлено, что наибольшая концентрация экзополисахаридов содержится в ферментированной системе с использованием заквасочной культуры «YO-PROX 777» – 89 мкг/мл.

Таким образом, показана возможность применения бактериальных заквасочных культур YF-L812, YO-PROX 501, YO-PROX 753, YO-PROX 777 в технологии ферментированных систем функционального назначения. Полученные данные подтверждают позволяют констатировать наличие выраженной экзополисахаридной активности у исследуемых заквасочных культур и перспективность включения ферментированных продуктов в рационы питания биокорректирующего, профилактического и лечебного действия для различных групп населения.

Работа выполнена при поддержке Гранта Президента Российской Федерации (регистрационный номер – МД-5536.2021.5).

Литература

1. Артюхова С.И., Моторная Е.В. Об актуальности использования при производстве биопродуктов для функционального питания молочнокислых бактерий, синтезирующих экзополисахариды // Международный журнал экспериментального образования. – 2015. – № 5–1. – С. 76.
2. Дифференциально-термический анализ в оценке экзополисахаридной активности консорциумов пробиотических микроорганизмов / Родионова Н.С., Попов Е.С., Родионов А.А., Разинкова Т.А. // Известия Вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2018. – Т. 8. – № 4. – С. 95–105.
3. Хамагаева, И.С., Хазагаева С.Н., Замбалова Н.А. Создание консорциума пробиотических микроорганизмов с высокой биохимической активностью и экзополисахаридным потенциалом // Вестник ВСГУТУ, Улан-Удэ. – 2014. – № 1 (46). – С. 97–102.
4. Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium / S. Petry [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – Vol. 66. – P. 3427 -3431.

УДК 579.647

БИОЛОГИЧЕСКИЙ СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ ВСХОЖЕСТИ КОРМО-БОБОВЫХ КУЛЬТУР

И.Э. Смирнова, А.К. Саданов

Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

Введение. Главным сдерживающим фактором развития животноводства является недостаточность кормовой базы. В условиях высоких цен на минеральные удобрения, получение полноценных и дешевых кормов возможно путем развития кормопроизводства с использованием кормо-бобовых культур, которые дают большой урожай зеленой массы с высоким содержанием протеина. Основными кормо-бобовыми культурами являются люцерна (*Medicago sativa* L.) и донник (*Melilotus officinalis* (L.) Lam.). Люцерна является главным источником производства кормов для животноводства. Она характеризуется стабильным урожаем, содержит много протеина, каротина, кальция, витамины и других полезных веществ для животных [1]. Другой не менее важной культурой является донник, который недостаточно используется в кормопроизводстве. Донник обладает комплексом ценных хозяйственных и эколого-биологических особенностей: нетребователен к плодородию почв, зимостоек, дает высокий урожай раннего корма в засушливых условиях и является солеустойчивой культурой [2]. Кроме того, донник является признанным растением-фитомелиорантом, что крайне актуально для засоленных почв [3]. Однако при выращивании донника и люцерны существует проблема низкой всхожести семян. Так, часто при высеве донника и люцерны ¼ засеянных полей остается пустыми, что объясняется их низкой всхожестью. Низкая всхожесть связана с присутствием твердых семян, содержание которых доходит до 40–60 % [4]. Такие семена имеют очень плотную и твердую оболочку, препятствующую их всхожести. [5]. При посеве они не дают дружных всходов, что вызывает разреженность посевов и существенно снижает урожайность зеленой массы культур с единицы площади. Для повышения всхожести семян применяют разные способы, наиболее часто используют механическую скарификацию, которая разрушает твердую оболочку семян [6]. Однако механическая скарификация вызывает повреждение зародыша семени, что приводит к его поражению фитопатогенами, загниванию и гибели растений. Целью данного исследования является разработка принципиально нового биологического способа повышения всхожести семян донника и люцерны, основанного на применении целлюлолитических бактерий. Эти бактерии способны синтезировать ферменты целлюлазы, которые частично разрушают твердую оболочку семян, делают ее легкопроницаемой для прорастания и, тем самым, повышают всхожесть культур.

Материалы и методы. Объектом исследования является штамм целлюлолитических бактерий *Bacillus sp.* С-81. Штамм был выделен из целлюлозосодержащих растительных остатков (листовой опад, корешки и др.), собранных в ризосфере здоровых растений люцерны в Алматинской области Казахстана в 2018 году.

Бактерии культивировали на среде Гетчинсона следующего состава (г/л): K_2HPO_4 – 1,0, $CaCl_2$ – 0,1, $MgSO_4$ – 0,3, $NaNO_3$ – 2,5, $NaCl$ – 1,0, $FeCl_3$ – 0,01, дрожжевой экстракт – 5,0. Целлюлазную активность бактерий определяли методом Мандельс-Вебера [7].

Определение ферментов целлюлазного комплекса штамма бактерий проводили в соответствии с протоколом ГОСТ Р 55293–2012 [8]. Субстратом для тестирования фермента эндо-1,4-β-эндоглюканазы (ЕС 3.2.1.4) служил раствор Na-KМЦ (Serva, Германия); в качестве субстрата для определения активности целлюобиогидролазы (ЕС 3.2.1.91) использовали хлопковые волокна; для определения β-глюкозидазы (ЕС 3.2.1.21) – целлюбиозу (Sigma-Aldrich, Германия). Активность ферментов выражали в международных единицах – моль гидролизованных связей в единицу времени (мин), и относили к весу фермента.

Нитрогеназную активность бактерий определяли ацетиленовым методом [9]. Для этого бактерии выращивали на среде Эшби в условиях аэрации до концентрации 10^8 клеток /мл. Ацетилен вводили в сосуды с культурами до концентрации 10 % (по объему). После инкубации культур в течение 1,5 ч в атмосфере ацетилена пробы газа отбирали шприцем по 1 мл из сосуда и определяли наличие этилена на газовом хроматографе “Agilent Technology 7890 В” (США) с пламенно-ионизационным детектором [10].

Витамины группы В определяли микробиологическим методом, основанном на учете интенсивности роста витаминзависимых культур микроорганизмов [11].

Полевые опыты проводили на полях Алматинской области Казахстана. Тип почвы – серозем обыкновенный, агрохимические показатели: гумус – 1,28 %, легкогидролизуемый азот – 63,5 мг/кг почвы, подвижный фосфор – 38,4 мг/кг почвы. Семена люцерны сорта «Карабалыкская-18» и донника сорта «Калдыбанский» перед посевом обрабатывали бактериями С-81 из расчета 200 мл суспензии с титром 1×10^8 кл/мл на 1 кг семян. Обработанные семена высевали порционной сеялкой СК-2 в течение 10–20 ч. Норма высева семян составляла 10–12 кг/га, глубина посева 4–5 см. Контролем служили необработанные семена.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ «STATISTICA 10.0» [12].

Результаты и обсуждение. Для повышения всхожести семян кормо-бобовых культур был выделен и отселекционирован штамм целлюлолитических бактерий С-81. Установлено, что клетки штамма С-81 имеют форму палочек, размер клеток – $2,4 \times 0,3$ – $4,5 \times 0,5$ мкм. Клетки грамположительные, располагаются поодиночке, парами или короткими цепочками, имеют перетрихальное жгутикование. Овальные споры размером 0,5–0,8 мкм в диаметре расположены центрально, форма клеток при спорообразовании не меняется. Колонии белые или светло-серые, край ровный, диаметром 3–4 мм. Факультативный анаэроб. Рост на синтетических средах хороший, штамм не требует внесения в среду витаминов или других факторов роста. При росте на мясопептонном агаре (МПА) колонии округлые, поверхность и край колоний ровный, цвет белый или светло-серый, колонии непрозрачные, пигмент в среду не выделяется.

Штамм использует для роста следующие углеводы: глюкозу, декстрозу, фруктозу, сахарозу с образованием кислот, арабинозу, галактозу, ксилозу, лактозу, маннит с подщелачиванием среды. Энергично разлагает целлюлозу. Крахмал гидролизует, аммиак, индол и сероводород не образует. Желатину разжижает. Нитраты восстанавливает до нитритов. Дает положительную реакцию на каталазу. Растет на безазотистых средах, фиксирует молекулярный азот атмосферы.

На основе изучения основных культурально-морфологических и биохимических признаков штамм отнесен к роду *Bacillus*. Проведена молекулярно-генетическая идентификация штамма С-81 методом Сенгера. Филогенетический анализ путем сравнения нуклеотидной последовательности штамма с последовательностями 16S rRNA родственных штаммов в базе данных ICBN показал, что в филогенетическом отношении штамм относится к роду *Bacillus* (степень гомологии 98 %) и наиболее близок в виду *B. cereus*.

Исследование состава целлюлазного комплекса бактерий установило, что комплекс состоит из трех ферментов: 1,4-β-эндоглюканаза (ЕС 3.2.1.4), β-глюкозидаза (ЕС 3.2.1.21) и целлобиогидролаза (ЕС 3.2.1.91). Исследование количественных показателей этих ферментов показало следующее: содержание 1,4-β-эндоглюканазы составляло $8,9 \pm 0,4$ ед./г, β-глюкозидазы – $15,4 \pm 0,8$ ед./г и целлобиогидролазы – $37,2 \pm 1,1$ ед./г.

Проведено изучение целлюлазной и нитрогеназной активности, и способность штамма к синтезу биологически активных веществ, таких как витамины группы В (таблица 1).

Таблица 1 – Целлюлазная и нитрогеназная активность, биосинтез витаминов штаммом *B. sp.* С-81

Штамм	Общая целлюлазная активность, ед./мл	Нитрогеназная активность, μ моль C_2H_4 /мл/ч	Витамины группы В, μ г/г АСБ*			
			В ₁	В ₃	В ₅	В ₆
С-81	5,4	4,37	18,4	169,9	21,4	15,8
Примечание: $p < 0,01$; АСБ* – абсолютно сухая биомасса						

Установлено, что целлюлазная активность бактерий составляет 5,4 ед./мл, штамм фиксирует молекулярный азот атмосферы и синтезирует витамины группы В: В₁ (пирофосфат тиамин), В₃ (никотиновая кислота), В₅ (пантотеновая кислота) и В₆ (пиридоксальфосфат) (таблица 1).

Полевые опыты, проведенные в течение двух лет (2019–2020 гг.) в Алматинской области, показали высокую перспективность применения биологического метода повышения всхожести семян люцерны и донника (таблица 2).

Таблица 2 – Влияние штамма *B. sp.* С-81 на их всхожесть семян и урожайность донника и люцерны в полевых условиях

Варианты	Всхожесть, %	Высота растений, см	Густота всходов, шт./м ²	Урожайность зеленой массы, ц/га
Люцерна				
Контроль	52,4	68,3	79,8	128,2
<i>B. sp.</i> С-81	79,8	77,5	167,4	143,4
Донник				
Контроль	49,6	75,3	76,3	115,5
<i>B. sp.</i> С-81	74,6	96,9	153	132,8
Примечание: $p \leq 0,05$				

Из результатов, представленных в таблице 2 следует, что предпосевная обработка семян донника и люцерны штаммом *B. sp.* С-81 увеличила густоту всходов, кустистость растений и повышала урожайность зеленой массы культур. Так, при обработке семян люцерны штаммом С-81 количество всходов составляло 167,4 шт./м², в контроле этот показатель составлял только 79,8 шт./м², высота растений в варианте с обработкой семян люцерны штаммом была 77,5 см, в контроле – 68,3 см. Количество всходов в варианте с обработкой семян донника штаммом *B. sp.* С-81 составляло 153 шт./м², в контроле – 76,3 шт./м², растения донника имели большую высоту растений (96,9 см), чем растения контрольного варианта (75,3 см). Вес зеленой массы донника и люцерны в варианте с инокуляцией семян штаммом значительно увеличился по сравнению с контролем и составлял для донника 132,8 ц/га (контроль – 115,5 ц/га), для люцерны 143,4 ц/га (контроль 128,2 – ц/га).

Закключение. Таким образом, разработан биологический способ повышения всхожести семян кормо-бобовых культур донника и люцерны. Биологический способ основан на применение штамма целлюлолитических бактерий, который способен активно повышать всхожесть, стимулировать рост и развитие культур. Предпосевная обработка семян донника и люцерны штаммом повышает урожайность зеленой массы донника на 17,3 ц/га и люцерны – на 15,2 ц/га.

Механизм действия биологического способа можно объяснить следующим образом: под действием ферментов целлюлаз, продуцируемых бактериями, происходит разрушение клеточных стенок оболочки семян и в ней образуются микротрещины, то есть целлюлазы бактерий частично деградируют твердую оболочку семян (биологическая скарификация), при этом оболочка становится более мягкой для прорастания. Через образующиеся микротрещины ускоряется доступ воды и растворенных в ней минеральных и питательных веществ к зародышу семян, что является дополнительным фактором для повышения всхожести и дальнейшей стимуляции роста и развития проростка. Кроме того, штамм обладает способностью фиксировать молекулярный азот атмосферы и синтезирует витамины группы В, что создает добавочный стимул для роста культур.

Применение биологического способа экологически безопасно и соответствует требованиям охраны окружающей среды. Сам штамм не токсичен, не патогенен и не фитотоксичен. Применение штамма не приводит к загрязнению почвы и нарушению биологического равновесия, так как целлюлолитические бактерии являются полезными представителями микрофлоры почвы, которые участвуют в процессе почвообразования. Использование биологического способа дает возможность избежать применения механических и других способов повышения всхожести семян и химических стимуляторов роста растений, отрицательно влияющих на здоровье почв и нарушающих систему: почва-растение-продукты питания. Производство биомассы целлюлолитических бактерий для биологического способа повышения всхожести кормо-бобовых культур может быть налажено на основе простых и дешевых сред, содержащих в качестве источника углерода пшеничную солому, и не требует использования факторов роста. Способность штамма к спорообразованию обеспечивает его сохранность на длительный период времени в почве, что улучшает ее плодородие в последующие годы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан (грант АР08855656).

Литература

- Волгин В.И., Романенко Л.В., Прохоренко П.Н., Федорова З.Л., Корочкина Е.А. Полноценное кормление молочного скота – основа реализации генетического потенциала продуктивности. М.: РАН, 2018. 260 с.
- Косолапов В.М., Костенко С.И., Пилипко С.В. Направления и задачи селекции кормовых трав в России // Достижения науки и техники АПК. 2018. Т. 32. № 2. С. 21–24. doi: 10.24411/0235–2451–2018–10205
- Rigal M., Rigal L., Vilarem G., Vandenbossche M., Virginie. Sweet clovers, a source of fibers adapted for growth on wet and saline soils // Journal of Natural Fibers. 2016. Vol. 13(4). P. 410–422. 10.1080/15440478.2015.1029202ff.
- Boe A., Kephart K.D., Berdahl J.D., Peel M.D., Brummer E.C., Xu L., Wu Y. Breeding alfalfa for semiarid regions in the Northern Great Plains: History and additional genetic evaluations of novel germplasm // *Agronomy*. 2020. Vol. 10(11). P. 1686.
- Шатский И.М., Иванов И.С., Переправо Н.И., Золотарев В.Н и др. Селекция и семеноводство многолетних трав в Центрально-черноземном регионе России. Воронеж: ОАО «Воронежская областная типография», 2016. 236 с.
- Jones C.D., Stevens M.R., Jolley Von D., Hopkins B.G., Jensen S.L., Turner D., Stettler J.M. Evaluation of thermal, chemical, and mechanical seed scarification methods for 4 Great Basin lupine species // Native Plants Journal. 2016. Vol. 17(1). P. 5–17.
- Zhang D., Lax A.R., Raina A.K., Bland J.M. Differential cellulolytic activity of native-form and C-terminal tagged-form cellulase derived from *Coptotermes formosanus* and expressed in *E. coli* // Insect Biochemistry and Molecular Biology. 2009. Vol. 39. P. 516–522.
- Государственный стандарт ГОСТ Р 55293–2012. Препараты ферментные для пищевой промышленности. Метод определения активности целлюлаз. М.: Стандартинформ, 2014. 14 с.
- Das S., De T.K. Microbial assay of N₂ fixation rate, a simple alternate for acetylene reduction assay // Methods X. 2018. Vol. 5. P. 909–914. doi: 10.1016/j.mex.2017.11.010.
- Kaushal M., Kaushal R. Acetylene reductase activity and molecular characterization of plant growth promoting rhizobacteria to know efficacy in integrated nutrient management system // Indian Journal of Biotechnology. 2015. Vol. 14. P. 221–227.
- Ball G.F.M. Microbiological methods for the determination of the B-group vitamins. In: Water-soluble Vitamin Assays in Human Nutrition. Boston, MA: Springer, 1994. P. 317–364. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2061-0_7.
- Боровиков В.П. Популярное введение в современный анализ данных в системе STATISTICA. М.: Stat Soft, 2013. 268 с.

УДК 633.81:581.17

ОСОБЕННОСТИ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ ЛАВАНДЫ УЗКОЛИСТНОЙ

В.С. Власова¹, Н.А. Егорова¹, Л.А. Хасанова², З.М. Хасанова²¹ Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма, Симферополь, Россия² Академия наук Республики Башкортостан, Уфа, Россия

Значимость лаванды узколистной (*Lavandula angustifolia* Mill.), как эфиромасличной культуры, предполагает выведение высокопродуктивных и устойчивых сортов данного растения. В связи с этим особый интерес представляет клональное микроразмножение, широко используемое для ускоренного размножения ценных генотипов отдельных видов растений и получения оздоровленного посадочного материала [1–3].

Для *L. angustifolia*, традиционно возделываемой в Республике Крым эфиромасличной культуры, методы клонального микроразмножения недостаточно разработаны. Хотя имеются сведения о влиянии различных факторов на развитие каллусных культур, индукцию в них морфогенеза, а также развитие эксплантов на разных этапах микроразмножения сортов *L. angustifolia* [4]. В связи с этим целью работы была оптимизация условий клонального микроразмножения лаванды *in vitro*. В качестве эксплантов при введении в культуру *in vitro* использовали меристемы из растений, выращенных в условиях закрытого грунта, или адаптированных *in vivo* регенерантов.

Ключевым фактором, определяющим развитие изолированных меристем лаванды, является состав питательной среды. На основании предварительных опытов в качестве основной была выбрана модификация питательной среды Мурасиге и Скуга [4], дополненная цитокининами. Подобный выбор был обусловлен тем, что введение в среду, наряду с цитокининами, ауксинов часто приводило к образованию каллуса. При использовании разных цитокининов было установлено преимущество кинетина по сравнению с 6-бензиламинопурином (БАП) и зеатином. Среда с добавлением БАП индуцировала развитие каллуса с частотой 46,8–100 %. Добавление в питательную среду зеатина приводило к снижению основных показателей по сравнению с кинетином (почти в 2 раза уменьшились длина и количество побегов, число узлов). Введение в среду, наряду с кинетином и гибберелловой кислотой (ГК₃), ауксинов (β -индолил-3-масляной и β -индолил-3-уксусной кислот) также было неэффективным.

В результате исследований было установлено, что наиболее подходящими для культивирования меристем *L. angustifolia* были среды с добавлением 1–2 мг/л кинетина и 0,5 мг/л ГК₃. На этих средах развивалось до 100 % эксплантов и формировались микропобеги длиной 10–15 мм с 3–4 парами листьев, при этом наблюдали множественное побегообразование с частотой до 100 % и формирование из меристемы в среднем от 1 до 9 побегов.

Литература

- Калашникова Е.А. Клеточная инженерия растений / Е.А. Калашникова. – М.: Юрайт, 2020. – 333 с.
Картель Н.А. Биотехнология в растениеводстве / Н.А. Картель, А.В. Кильчевский. – Минск: Тэхналогія, 2005. – 310 с.
Cardoso J.C., Gerald L.T.S., Teixeira da Silva J.A. Micropropagation in the Twenty-First Century / J.C. Cardoso, L.T.S. Gerald, J.A. Teixeira da Silva // Plant cell culture protocols. – Eds.: V.M. Loyola-Vargas, N. Ochoa-Alejo. New York, NY: Humana Press, 2018. – P. 17–46.
Егорова Н.А. Биотехнология эфиромасличных растений: создание новых форм и микроразмножение *in vitro*. – Симферополь: ИД «Автограф», 2021. – 315 с.
Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant, 1962. – Vol. 15 (№ 3). – P. 473–497.

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОРОЩЕННОЙ ЧЕЧЕВИЦЫ В ТЕХНОЛОГИИ БЕЛКОВЫХ ПРОДУКТОВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**Л.В. Антипова, А.О. Дарьин***Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия*

Питание это один из показателей, характеризующий здоровье человека. Важной задачей по улучшению качества питания – это разработка продуктов с высокой пищевой и биологической ценностью. Особый интерес представляют продукты из растительных источников сырья. Безусловный приоритет здесь принадлежит различным белковым основам. В зарубежных странах большую популярность в потреблении получил соевый белковый продукт – сыр «Тофу», среди россиян этот продукт пользуется большим спросом в связи с устойчивым желанием к употреблению продуктов здорового питания, а также во время поста. Однако отечественное производство растительных сыров отсутствует. Цель работы состояла в оценке возможностей отечественного растительного сырья в получении белковых основ, пригодные к производству сыров. В качестве объекта исследования выбрана чечевица. В экспериментах использовали красную чечевицу, купленную в воронежском гипермаркете Лента. Чечевица – это ценный пищевой продукт, который обладает богатым содержанием белка, углеводов, минеральных веществ, хорошо усваиваемый организмом человека. Помимо питательных свойств, чечевица также обладает лечебными свойствами, способствуя лечению желудочно-кишечных, нервных болезней, а также снижению уровня сахара в крови. Проращивание это процесс, в ходе которого культуры обогащаются различными питательными компонентами, обеспечивающих человеку жизненные силы и много энергии. Пророщенные в подобранных условиях культуры являются незаменимо полезным источником питания для людей. За рубежом интенсивно развивается тренд потребления пророщенных культур, одной из которых является чечевица [1]. Проращивание оказывает существенное влияние на потребительские и технологические свойства сырьевых растительных основ из бобовых. Нами установлено нивелирование специфического запаха, отсутствие постороннего привкуса, требуемые показатели по цвету, внешнему виду. Пророщенная чечевица является значимым продуктом для сыроедов, вегетарианцев и сторонников здорового питания. При проращивании чечевицы увеличивается содержание полезных веществ, таких как антиоксиданты, клетчатка, витамин С и др. Также пророщенная чечевица выполняет роль профилактического средства от вирусных болезней [2, 3].

Проращивание зерен проходит при $t = 4-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 7–8 суток, а модификация питательной среды дополнительно обогащает основу органическим йодом. При внесении подобранных в ходе экспериментальных исследований ингредиентов, формируется сырная масса, обладающая следующими физико-химическими показателями: массовая доля жира 9,5 %, массовая доля белка 6,0 %, массовая доля влаги 72,0 %.

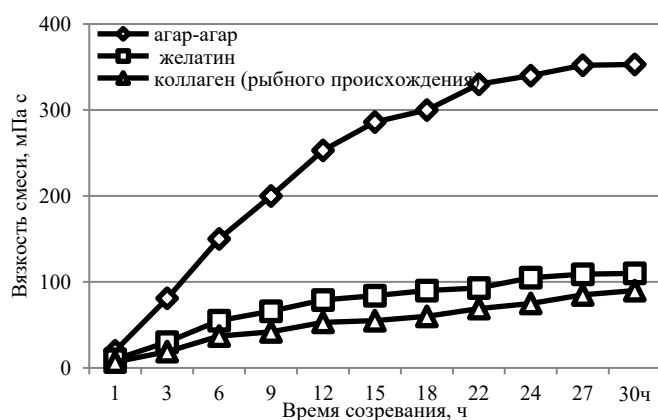


Рисунок 1. Показатели динамической вязкости растительного сыра из пророщенных зерен чечевицы

В производстве сыра большое значение имеет образование сгустка. Получение сыра проводилось с использованием загустителей: агар-агар, желатин, коллаген (рыбного происхождения). На рисунке 1 показаны результаты изменения динамической вязкости под действием различных загустителей получения сыра с использованием различных загустителей, которую определили в процессе образования сгустка.

На рисунке 1 видно, что загустители коллаген, желатин животного происхождения коллаген, желатин оказывали гораздо менее выраженное действие на структурообразование.

Иная картина отмечена при использовании ага-агара. К 15–21 часам формировался белковый сгусток с требуемыми реологическими характеристиками применительно к технологии сыров. Полученный по традиционной технологии продукт сыр типа «Тофу» отличался от контроля (из сои) лучшими органолептическими показателями по вкусу и цвету. Консистенция устойчиво сохранялась на всем периоде хранения. В отличие от контроля отмечено отсутствие выделения влаги [4].

Аминокислоты, говоря простым языком, представляют собой строительный материал для образования белков в организме. Аминокислотный состав и рассчитанная биологическая ценность изучаемых объектов представлены в таблице 1.

Таблица 1. Аминокислотный состав

Наименование аминокислоты	Аминокислотный состав, г/100г белка	
	Белковый продукт из пророщенных зерен чечевицы	Соевый сыр типа «Тофу»
Изолейцин	4,09	4,7
Лейцин	7,26	8,15
Лизин	5,82	6,03
Метионин	3,08	1,25
Фенилаланин	4,65	5,43
Треонин	3,54	3,83
Триптофан	0,6	1,47
Валин	4,92	4,71
БЦ, %	69,8	34,5

Из полученных результатов установлено, что аминокислотный состав анализируемых объектов незначительно различается, но при этом биологическая ценность белкового продукта из пророщенных зерен чечевицы в 2 раза выше, чем в соевом сыре типа «Тофу» [5,6].

Литература

1. Антипова Л.В. Оценка потенциала источников растительных белков для производства продуктов питания [Текст] Л.В. Антипова // Пищевая промышленность. 2013. № 8. С. 10–12.
2. Асланов С.И. Функциональные свойства белкового препарата чечевицы (БПЧ) в системе белок – вода [Текст] / С.И. Асланов, Л.В. Антипова, В.Б. Крылова, В.Э. Супин / Ред. журн. "Естественные и точные науки, техника" – Деп в ВИНТИ, 1992. – № 8.
3. Friedman M. Nutritional value of proteins from different food sources // J. Agric. Food Chem. – 1996. – P. 44
4. Антипова Л.В., Толпыгина И.Н., Мартемьянова Л.Е. Текстураты растительных белков для производства продуктов питания // Пищевая промышленность. 2014. № 2. С. 20–23
5. Мельникова, Е.И. Современные методы исследования свойств сырья и продуктов животного происхождения. Лабораторный практикум [Текст]: учебное пособие/Е.И. Мельникова, Е.С. Рудниченко, Е.В. Богданова; Воронеж. гос. ун-т инж. технол. – Воронеж: ВГУИТ. 2014–96 с.
6. Сырская А.О. Аминокислоты глазами химиков, фармацевтов, биологов: в 2-х т. Том 1 / А.О. Сырская, Л.Г. Шаповал, В.А. Макаров, В.Н. Петюнина, Е.Р. Грабовецкая, С.В. Андреева, С.А. Наконечная, Р.О. Бачинский, Л.В. Лукьянова, С.Н. Козуб, О.Л. Левашова. – Х. «Щедра садиба плюс», 2014 – 228 с.

КОМПЛЕКСЫ СУКЦИНИЛИРОВАННОГО ХИТОЗАНА С ПЕПТИДАМИ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ МОЛОКА

Т.Н. Головач¹, В.П. Курченко¹, Р.В. Романович¹, М.П. Бондаренко¹, Е.И. Тарун²

¹ Белорусский государственный университет (БГУ), Минск, Беларусь

² Международный государственный экологический институт имени А.Д. Сахарова БГУ, Минск, Беларусь

Введение. Коровье молоко представляет собой уникальную поликомпонентную белковую систему. Пищевая и биологическая ценность белков казеиновой и сывороточной фракций обусловлена специфичностью аминокислотного состава, высокой усвояемостью в желудочно-кишечном тракте человека [1–3]. Вместе с тем, коровье молоко содержит ряд белков, обладающих высоким аллергенным потенциалом (β-лактоглобулин, казеин). Для снижения аллергенных свойств и повышения питательной ценности белков молока применяют ряд технологических приемов: гидролиз ферментными препаратами, термоденатурацию, микроволновое воздействие и др. [4, 5].

Белковый компонент молока относят к перспективным источникам получения гидролизатов с глубокой степенью гидролиза. Однако глубокие ферментативные гидролизаты имеют выраженный горький вкус, что ограничивает их применение в пищевой промышленности [6–8].

Увеличение производства молочных продуктов приводит к росту количества отходов переработки, в частности объема получаемой молочной сыворотки. Для наиболее полного и рационального использования сыворотки молока применимы технологии, основанные на выделении белка с использованием анионных и катионных полисахаридов [9, 10]. Поликатионный характер хитозана обуславливает его активное применение для разделения молока на белковую и безбелковую фракции, а также для фракционирования белков сыворотки молока [11].

Связывание двух биополимеров «белки молока – хитозан» обусловлено взаимодействием разноименных зарядов макромолекул. Процесс образования электростатических комплексов представляется как последовательное присоединение лигандов (макроионы белков сыворотки молока и казеина) к ядру комплекса (макроион хитозана). После присоединения лигандов заряд комплекса понижается, что впоследствии приводит к формированию электронейтрального биокомпозита, состоящего из хитозана и белков молока [10, 12].

Актуальность исследования связана с установлением влияния комплексообразования с хитозаном и его производными на физико-химические, органолептические и биологически активные свойства пептидов молока.

Цель работы – изучить физико-химические и органолептические показатели, антиоксидантное действие комплексов сукцинированного хитозана с пептидами сыворотки молока.

Материалы и методы. В работе использовали сукцинированный хитозан (СХТ) производства ЗАО «Биопрогресс» (степень ацетилирования 98 %, степень замещения – 75,1 %); гидролизат сывороточных белков (ГСБ) Peptigen IF 3080 WPH с массовой долей белка 80 % (Arla Foods Ingredients Group, Дания).

В эксперименте 1 к 0,1 % раствору СХТ (50 мл) добавляли 15 % раствор ГСБ в количестве 250 мкл и интенсивно перемешивали. Всего произвели 20 циклов внесения гидролизата, что в итоге составило 5 мл раствора ГСБ. После каждого добавления определяли активную кислотность и оптическую плотность растворов СХТ–ГСБ.

В эксперименте 2 готовили растворы, содержащие 0,25 % ГСБ и 0,005–0,1 % СХТ (20 образцов с растворами СХТ–ГСБ). Полученные образцы тщательно перемешивали, затем определяли pH и оптическую плотность ($\lambda = 640$ нм) растворов СХТ–ГСБ.

Оценку органолептических свойств полученных жидких образцов проводили согласно методике, описанной в работе [13]. В качестве контроля при дегустации использовали растворы гидролизата сывороточных белков и сукцинированного хитозана.

Для определения антиоксидантной активности (АОА) опытных образцов применяли флуориметрический метод, основанный на измерении уменьшения интенсивности флуоресценции флуоресцеина (ФЛ) при его связывании с кислородными радикалами [14]. Строили графики зависимости интенсивности флуоресценции от содержания сухого вещества и белка в анализируемых образцах.

Согласно полученному уравнению рассчитывали концентрацию пробы IC_{50} , соответствующую 50 % ингибированию флуоресценции. Результаты независимых экспериментов представлены как среднее арифметическое значение $\pm$ доверительный интервал.

Результаты и их обсуждение

Для получения комплексов с сукцинилированным хитозаном использовали глубокий гидролизат сывороточных белков молока Peptigen IF 3080 WPH с выраженным горьким вкусом, что обусловлено высокой степенью расщепления белковых субстратов, коррелирующей с образованием специфических «горьких» пептидов.

Изучен процесс взаимодействия сукцинилированного хитозана с различным количеством гидролизата. При увеличении доли пептидов в растворе 0,1 % СХТ установлено снижение активной кислотности среды с 7,5 до 6,75 ед. рН, что отражено на рисунке 1. По данным рН-метрии точка эквивалентности СХТ достигается при содержании гидролизата 0,22–0,29 %. Вместе с тем, оптическая плотность образцов практически не изменялась.

На следующем этапе охарактеризован процесс взаимодействия гидролизата с различным количеством сукцинилированного хитозана. При возрастании концентрации СХТ в диапазоне 0,005–0,1 % в растворе 0,25 % ГСБ установлено снижение активной кислотности среды на 0,2 ед. рН, наряду с отсутствием изменений оптической плотности, как показано на рисунке 2.

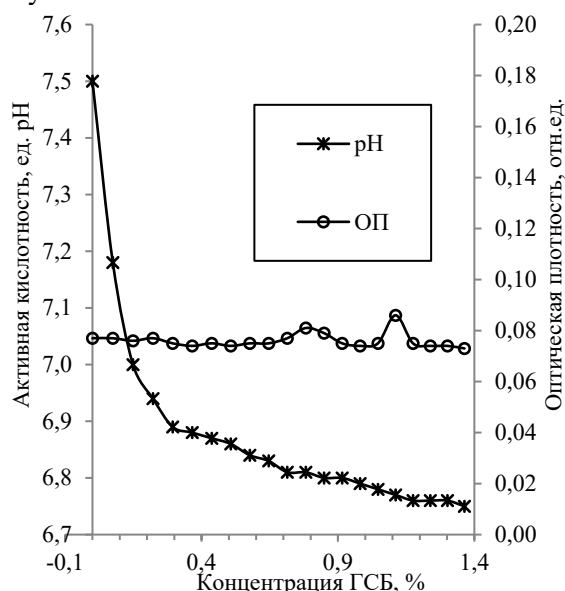


Рисунок 1 – Зависимость активной кислотности и оптической плотности раствора СХТ (0,1 %) от концентрации ГСБ (0,08–1,4 %)

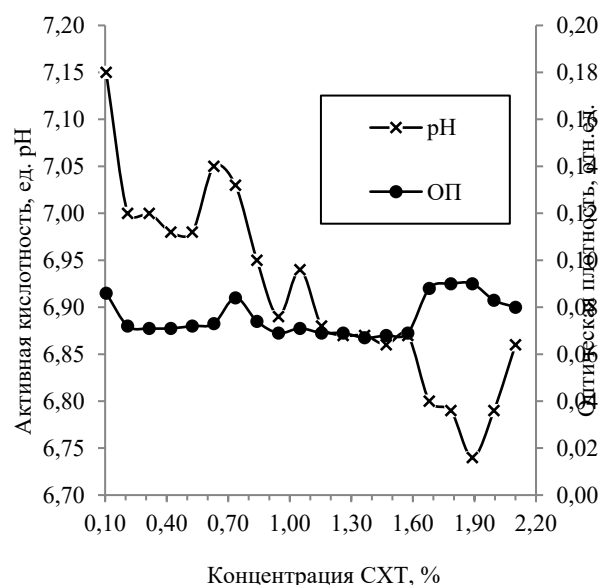


Рисунок 2 – Зависимость активной кислотности и оптической плотности раствора ГСБ (0,25 %) от концентрации СХТ (0,005–0,1 %)

В целом, образование комплексов сукцинилированного хитозана и гидролизатом сопровождается выходом в среду протонов, что определяет снижение активной кислотности смеси. Наряду с этим, не выявлены изменения оптических свойств растворов. Это обусловлено образованием наноструктур СХТ–ГСБ, не способных к коагуляции по причине сохранения одноименных зарядов на поверхности комплексов.

Проанализированы органолептические свойства глубокого гидролизата, сукцинилированного хитозана и комплексов СХТ–ГСБ. Результаты испытаний представлены в таблице 1. По итогам эксперимента специфическим горьким вкусом обладают как глубокий гидролизат сывороточных белков, так и сукцинилированный хитозан. Интенсивность ощущения горечи определяется концентрацией компонентов в растворе.

Таблица 1 – Органолептические свойства ГСБ и комплексов СХТ–ГСБ

Описание образца	Характеристика вкуса	Горечь (0–10 баллов)
ГСБ 5 %	Ярко выраженный горький вкус	10
ГСБ 0,25 %	Безвкусный	0
СХТ 0,1 %	Слабо выраженный горький вкус	5
ГСБ 1,4 % + СХТ 0,1 %	Выраженный горький вкус	9
ГСБ 0,25 % + СХТ 0,1 %	Слабо выраженный горький вкус	4
ГСБ 0,25 % + СХТ 0,005 %	Безвкусный	2

Определена антиоксидантная активность комплексов сукцинированного хитозана с пептидами сыворотки молока. Получены зависимости интенсивности флуоресценции ФЛ от концентрации гидролизата, его комплексов с полисахаридом. Исследования проведены в диапазоне концентраций тестируемых соединений 0,005–0,5 мг сухого вещества/мл. Экспериментальные образцы восстанавливали флуоресценцию ФЛ до 78–91 %. Графически определены показатели IC_{50} – концентрации образцов, соответствующие 50 % ингибированию активных форм кислорода, что отражено на рисунке 3.

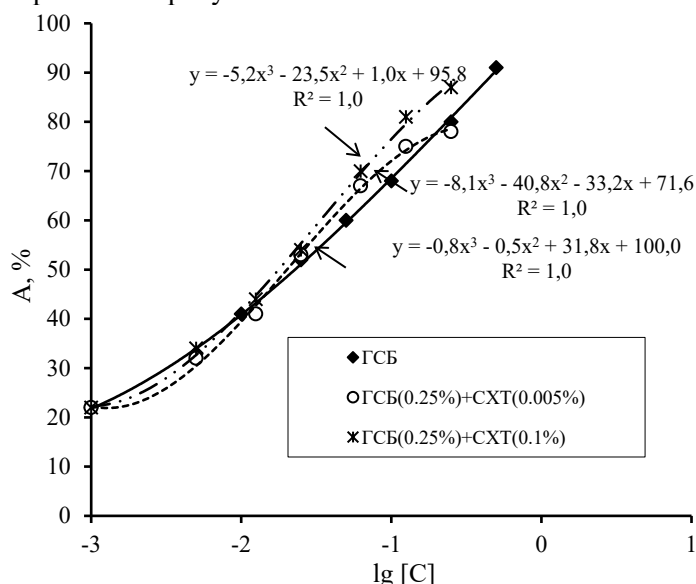


Рисунок 3 – Зависимость интенсивности флуоресценции (A, %) от концентрации сухого вещества (C, мкг/мл) в образце гидролизата (ГСБ) и его комплексов с сукцинированным хитозаном (СХТ)

По итогам расчета значений IC_{50} на содержание сухого вещества и белка гидролизат сывороточных белков молока обладает достаточно высоким антиоксидантным потенциалом – $22,0 \pm 1,6$ и $17,6 \pm 1,3$ мкг/мл соответственно.

Таблица 2 – Показатели АОА гидролизата сывороточных белков молока, комплексов сукцинированного хитозана с гидролизатом

Наименование образца	IC_{50} , мкг (сухого вещества)/мл	IC_{50} , мкг(белка)/мл
Гидролизат сывороточных белков (ГСБ)	$22,0 \pm 1,6$	$17,6 \pm 1,3$
Сукцинированный хитозан (СХТ)	н/о	н/о
Комплекс ГСБ (0,25 %) + СХТ (0,005 %)	$20,9 \pm 1,5$	$16,7 \pm 1,2$
Комплекс ГСБ (0,25 %) + СХТ (0,1 %)	$18,5 \pm 1,4$	$14,8 \pm 1,1$

При изучении образца комплекса с содержанием СХТ 0,005 % не установлено достоверное изменение уровня АОА. Вместе с тем, после увеличения концентрации СХТ до 0,1 % показано возрастание радикал-восстанавливающих свойств пептидов сыворотки молока в 1,2 раза.

Возрастание антиоксидантных свойств полученных биоконпозитов может быть обусловлено увеличением растворимости пептидной фракции в составе комплексов с сукцинилизированным хитозаном. Планируется продолжение исследований радикал-восстанавливающих свойств различных производных хитозана, а также их комплексов с пептидами молока.

Заключение. По итогам экспериментальной работы получены комплексы сукцинилизированного хитозана с глубоким гидролизатом сывороточных белков молока. Согласно данным рН-метрического и спектрофотометрического методов определены параметры взаимодействия полисахарида с пептидами. Оценены органолептические свойства опытных образцов комплексов.

По результатам флуориметрических исследований глубокий гидролизат сывороточных белков молока обладает достаточно высоким антиоксидантным действием. Так показатель IC_{50} гидролизата составляет $22,0 \pm 1,6$ и $17,6 \pm 1,3$ мкг/мл при расчете на содержание сухого вещества и белка соответственно. При взаимодействии пептидов (0,25 %) с сукцинилизированным хитозаном (0,1 %) показано возрастание радикал-восстанавливающего эффекта в 1,2 раза.

Перспективным представляется использование биологически активных комплексов хитозана и его производных с пептидами молока в качестве технологического и функционального компонента молочных продуктов питания.

Литература

- Park, Y.W. Bioactive peptides in milk and dairy products: a review / Y.W. Park, M.S. Nam // Korean J. Food Sci. Anim. Res. – 2015. – Vol. 35, № 6. – P. 831–840.
- Milk derived bioactive peptides and their impact on human health: a review / D.P. Mohanty [et al.] // Saudi J. Biol. Sci. – 2016. – Vol. 23. – P. 577–583.
- Bhat, M.Y. Casein proteins: structural and functional aspects / M.Y. Bhat, T.A. Dar, L.R. Singh // Milk Proteins – From Structure to Biological Properties and Health Aspects – InTech, 2016. – P. 3–18.
- Tsabouri, S. Cow's milk allergenicity / S. Tsabouri, K. Douros, K.N. Priftis // Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets. – 2014. – Vol. 14, № 1. – P. 16–26.
- Cheese whey catalytic conversion for obtaining a bioactive hydrolysate with reduced antigenicity / A. Torkova [et al.] // Curr. Res. Nutr. Food Sci. – 2016. – Vol. 4, SI.2. – P. 182–196.
- Drake, M.A. Sensory properties of dairy proteins / M.A. Drake, R.E. Miracle, J.M. Wright // Milk Proteins / M.A. Drake. – Academic press, 2008. – Ch. 15. – P. 429–448.
- Sensory directed flavour analysis of off-flavour compounds in infant formula with deeply hydrolyzed milk protein and their possible sources / P. Yang [et al.] // LWT–Food Sci. Technol. – 2020. – Vol. 119. – e108861.
- Kim, H.O. Quantitative structure-activity relationship study of bitter peptides / H.O. Kim, E.C. Lichan // J. Agric. Food Chem. – 2006. – Vol. 54. – 10102e10111.
- Characterization of casein micelle precipitation by chitosans / S.F. Ausar [et al.] // J. Dairy Sci. – 2001. – Vol. 84, Vol. 2. – P. 361–369.
- Influence of molecular weight of chitosan on interaction with casein / V.P. Kurchenko [et al.] // Appl. Biochem. Microbiol. – 2018. – Vol. 54, № 5. – P. 501–504.
- Use of chitosan for selective removal of β -lactoglobulin from whey / E. Casal [et al.] // J. Dairy Sci. – 2006. – Vol. 89, № 5. – P. 1384–1389.
- Использование хитозана для выделения β -лактоглобулина из смеси белков молочной сыворотки / А.В. Бакулин [и др.] // Биотехнология. – 2011. – № 1. – С. 34–41.
- The use of 2D NMR to study β -cyclodextrin complexation and debittering of amino acids and peptides / G.A. Linde [et al.] // Food Res. Int. – 2010. – Vol. 43. – P. 187–192.
- Ou, B. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe / B. Ou, M. Hampsch-Woodill, R.L. Prior // J. Agric. Food Chem. – 2001. – Vol. 49, № 10. – P. 4619–4626.

КОНЦЕПЦИЯ СНИЖЕНИЯ АЛЛЕРГЕННОСТИ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Е.И. Мельникова, Е.В. Богданова

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Повысить конкурентоспособность отечественной молочной отрасли в настоящее время невозможно без применения ресурсосбережения и экологичности производства. Приоритетность этих направлений определена в рамках реализации курса на устойчивое развитие государства, который предусматривает в том числе и внедрение наилучших доступных технологий для организации переработки молочной сыворотки и производства функциональных продуктов нового поколения на ее основе [1]. В связи с возрастающими объемами получения целесообразность рационального использования молочной сыворотки не имеет альтернативы и обоснована как с экономической, так и с экологической точек зрения. Существенным недостатком ее применения в производстве продуктов питания является высокая аллергенность сывороточных белков [2].

Для ее снижения авторами предложена биокаталическая конверсия УФ-концентрата подсырной сыворотки под действием смеси эндо- и экзопептидаз в соотношении 3 % Flavorpro 766MDP и 1,5 % Promod 439L. Средняя гидрофобность образовавшихся пептидов составила 1274,8 ккал / моль, что доказывает отсутствие горького привкуса полученного гидролизата. Сбалансированное содержание незаменимых аминокислот в его составе обеспечивает высокую биологическую ценность (91,94 %) и максимально эффективное усвоение в организме. Доказано, что гидролизированный УФ-концентрат подсырной сыворотки содержит производные β -лактоглобулина, способные проявлять антимикробную активность относительно грамположительных бактерий и ингибировать ангиотензинпревращающий фермент. В результате протеолиза сывороточных белков в УФ-концентрате подсырной сыворотки его антиоксидантная активность увеличилась в 2 раза, что характеризует полученный полуфабрикат как эффективное средство для борьбы с окислительным стрессом. Целесообразно его применение в технологии широкого ассортимента молочных и кисломолочных продуктов для снижения остаточной антигенности готовых продуктов и обогащения их минеральными веществами и витаминами.

Авторами разработаны рецептуры молокосодержащего напитка, кефирного, йогуртного и творожного продукта, а также напитка для спортивного питания, предусматривающие замену до 40 % обезжиренного молока гидролизатом сывороточных белков при составлении нормализованной смеси [3, 4]. Доказано, что наличие большого количества свободных аминокислот и пептидов в нормализованных смесях с гидролизатом активизирует способность заквасочных культур к синтезу легколетучих ароматических веществ, что позволяет замаскировать сывороточный привкус готового продукта.

Выполненные исследования и предлагаемые технологии получения функциональных продуктов заданного уровня качества реализованы в запатентованных технических решениях и соответствуют приоритетам национальных проектов в области АПК и медицины. Практическая значимость подтверждена социальной и экономической эффективностью.

Работа осуществлялась в рамках гранта Президента РФ на 2020–2021 гг. для молодых ученых – кандидатов наук, соглашение № 075–15–2020–322 (МК-1267.2020.11).

Литература

1. Храмцов, А.Г. Вопросы реализации наилучших доступных технологий в пищевой промышленности / А.Г. Храмцов и др. // Известия ВУЗов. Пищевая технология. – 2020. – № 2–3. – С. 8–13.
2. Головач, Т.Н. Аллергенность белков молока и пути ее снижения / Т.Н. Головач, В.П. Курченко // Труды Белорусск. госуд. ун-та. Сер: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2010. – Т. 5. – Ч. 1. – С. 9–51.
3. Мельникова, Е.И. Белковая композиция для кисломолочных напитков / Е.И. Мельникова, Е.В. Богданова, М.И. Багацкая // Молочная промышленность. – 2012. – № 10. – С. 66.
4. Подбор заквасочных культур для кефирного продукта со сниженной аллергенностью / Р.П. Коржов, А.Н. Пономарёв, Е.И. Мельникова, Е.В. Богданова // Молочная промышленность. – 2015. – № 4. – С. 30–31.

УДК 636.5.033:636.085.16

ВЫРАЩИВАНИЕ ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МУЛЬТИЭНЗИМНОЙ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ**К.С. Нечитайло, Е.А. Сизова***Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий РАН, Россия*

Введение. Для реализации высокого генетического потенциала современных высокопродуктивных кроссов птицы, требуется полное соответствие питательности кормов и потребности животных в нутриентах. Исходя из экономической целесообразности с учётом стоимости кормовых ингредиентов, производители вынуждены использовать более дешёвые и доступные компоненты. Недостатком которых является наличие антипитательных факторов: арабиноксиланы, целлюлоза, β -глюканы, олигосахариды, эруковая кислота, глюкозинолат, фитат и т. д. (Kiarie E. et al., 2013). Одним из рациональных путей преодоления сложившейся ситуации является применение мульти- и моноэнзимных препаратов в рационах цыплят-бройлеров (Mohammadagheri N. et al., 2016).

В настоящее время общепризнано, что экзогенные ферменты действуют на антипитательные факторы (Cheng G. et al., 2014). Механизм антипитательного действия некрахмалистых полисахаридов заключается в их вязкой природе. Увеличение объема и вязкости кишечного содержимого снижает скорость диффузии субстратов, пищеварительных ферментов и препятствует их взаимодействию на поверхности слизистой оболочки (Мирошников С.А., 2000; Мирошников С.А., 2005).

Помимо влияния ферментов на усвояемость питательных веществ, они также воздействуют на состав микробиоты кишечника. Изменения микрофлоры, вызванные ферментами, в основном косвенные и, как полагают, опосредуются несколькими механизмами. Во-первых, это сокращение непереваренных субстратов, во-вторых – образование короткоцепочечных олигосахаридов из некрахмалистых полисахаридов клеточной стенки с потенциальными пребиотическими эффектами (Kiarie E. et al., 2013, Mohammadagheri N. et al., 2016). Эти механизмы влияют на поступление питательных веществ и кишечный микробиом, тем самым изменяя взаимодействие бактериальных консорциумов (Cheng G. et al., 2014, Rios A.C. et al., 2016). Потенциал использования кормовых ферментов для улучшения продуктивности в птицеводстве весьма значителен.

Целью исследования была оценка эффективности применения кормовой добавки на основе мультиэнзимной композиции в рационах цыплят-бройлеров.

Материалы и методы. Для проведения экспериментальных исследований были отобраны цыплята-бройлеры кросса Арбор Айкрес в возрасте 7 суток ($n=30$) и поделены методом пар-аналогов на две группы: контрольная и опытная. Условия содержания, рационы кормления соблюдены в рамках рекомендаций ВНИТИП (2010). За основу рациона была взята пшенично-кукурузно-ячменная кормосмесь.

В рацион опытной группы была введена мультиэнзимная кормовая добавка, содержащий в своём составе энзимы эндо – 1,4 – бета-ксилазу с активностью не менее – 4000 ед./г, альфа-амилазу с активностью – 400 ед./г, субтилизин (протеаза) с активностью не менее – 8000 ед./г, дозировкой – 0,5 мг/кг корма.

В ходе экспериментальных исследований проводилась оценка роста и развития подопытной птицы, путем ежесуточных индивидуальных взвешиваний с последующим расчетом среднесуточного прироста. Ежедневно вели учет поедаемости и сохранности. В ходе балансовых физиологических опытов устанавливали переваримость питательных компонентов рациона по методикам ВНИТИП (Фисинин В.И. и др., 2010). Исходя из результатов ежесуточного учета массы помета, производили расчет потерь веществ с установлением усвоенного количества корма. Исследования морфологических показателей крови были выполнены на гематологическом анализаторе URIT-2900 Vet Plus, (URIT Medial Electronic Co., Китай). Биохимические исследования на анализаторе CS-T240 («Dirui Industrial Co., Ltd», Китай) с использованием наборов ДиаВетТест (Россия). Лабораторные исследования выполнены на базе ЦКП ФНЦ БСТ РАН.

Статистическая обработка полученных данных осуществлена с применением программного пакета «Statistica 12.» («StatSoft Inc.», USA) and «Microsoft Excel». Проверка на нормальность распределения данных была проведена с использованием критерия согласия Колмогорова-Смирнова. Для оценки статистической значимости использовали параметрический t – критерий Стьюдента независимых групп.

Результаты и обсуждение. На протяжении всего эксперимента показатель сохранности поголовья во всех исследуемых группах составлял 100 %. Включение мультиэнзимной кормовой добавки увеличивало поедаемость корма цыплятами-бройлерами (таблица 1). Так, за весь период выращивания, разница с контролем составила 6,25 %.

Таблица 1 – Фактическое потребление кормов подопытными цыплятами-бройлерами по периодам выращивания

Группа	Потребление, г/гол		
	Рацион		За весь период
	Стартовый	Ростовой	
Контроль	1325	1480	2805
Опыт	1482	1511	2992

При введении мультиэнзимной добавки, спустя три недели эксперимента отмечалась разница живой массы цыплят-бройлеров опытной группы 8,1 % ($P \leq 0,01$) в сравнении с контролем. К концу экспериментального периода в данной группе разница по увеличению живой массы бройлеров составила 13,8 % ($P \leq 0,001$) (Таблица 2). Таким образом, к концу экспериментального периода был отмечен продуктивный эффект в опытной группе в сравнении с контролем.

Таблица 2 – Динамика живой массы цыплят-бройлеров, г ($M \pm m$)

Группа	Сутки эксперимента					
	0	7	14	21	28	35
Контроль	197,2 $\pm 5,1$	333 $\pm 16,8$	570 $\pm 15,9$	907,6 $\pm 20,4$	1 361,2 $\pm 23,3$	1 905,2 $\pm 42,8$
Опыт	195,4 $\pm 8,1$	350,6 ± 18	617,4 $\pm 17,8$	980,8 $\pm 13,5^b$	1 513,2 $\pm 27,4^b$	2 167,2 $\pm 20,2^c$

Примечание: ^a – $P \leq 0,05$; ^b – $P \leq 0,01$; ^c – $P \leq 0,001$

Скармливание мультиэнзимной кормовой добавки привело к увеличению прироста живой массы на 15,2 % ($P \leq 0,001$) в сравнение с контролем (таблица 3), при этом, стоит отметить, затраты корма на 1 кг прироста живой массы в данной группе на 7,9 % ниже.

Таблица 3 – Прирост живой массы и затраты корма

Показатель	Группа	
	Контроль	Опыт
Прирост живой массы за эксперимент, кг	1,71 $\pm 0,04$	1,97 $\pm 0,07^c$
% к контролю	100	115,2
Затраты корма на 1 кг прироста живой массы, кг	1,64	1,52
% к контролю	100	92,7

Примечание: ^a – $P \leq 0,05$; ^b – $P \leq 0,01$; ^c – $P \leq 0,001$, при сравнении контрольной и опытных групп

Анализ морфологических (таблица 4) и биохимических (таблица 5) показателей крови выявил ряд особенностей изменения величин в рамках физиологической нормы.

Скармливание мультиэнзимной добавки приводит к интенсификации метаболических процессов, стимуляции эритропоэза, что подтверждается увеличением количества эритроцитов на 4,12 % ($p \leq 0,05$) по отношению к контролю.

Характер изменения показателя среднего содержания гемоглобина в эритроците (MCH) совпадал с концентрацией гемоглобина. В опытной группе прослеживалась тенденция к его увеличению. Исследуемая добавка приводила к метаболическим изменениям в организме цыплят-бройлеров, что в первую очередь отражалось трансформацией состава сыворотки крови птицы (таблица 5).

Введение мультиэнзимной добавки приводит к увеличению концентрации глюкозы на 3,92 % ($p \leq 0,05$) в сравнении с группой контроля. При высоком уровне энергетического материала, превышающим контрольные значения, обеспечиваются интенсивные темпы прироста живой массы цыплят-бройлеров.

Таблица 4 – Морфологические показатели крови цыплят бройлеров

Показатель	Группа	
	Контроль	Опыт
Лейкоциты, 10^9 /л	32,84 ±1,93	34,08±0,95
Лимфоциты, %	56,18±1,43	56,34±1,15
Моноциты, %	7,32±0,12	6,92±0,05
Гранулоциты, %	32,3±2,24	36,74±0,99
Эритроциты, 10^{12} /л	3,64±0,13	3,77±0,06 ^a
Гемоглобин, г/л	109,0±1,18	109,8±4,84
Гематокрит, %	19,98±0,09	21,66±0,74 ^a
МСН, пг	60,92±2,23	62,78±0,88
Тромбоциты, 10^9 /л	60,4±1,21	72,2±1,25

Примечание: ^a – $P \leq 0,05$; ^b – $P \leq 0,01$; ^c – $P \leq 0,001$, при сравнении контрольной и опытных групп

В опытной группе отмечено снижение уровня креатинина на 1,4 % ($p \leq 0,05$). Вероятно, данный эффект связан с интенсификацией биохимических путей и переходом данного метаболита в креатинфосфат. О положительном влиянии исследуемой добавки свидетельствует также повышение уровня общего белка в опытной группе на 3,69 % ($p \leq 0,05$) в сравнение с контрольными значениями.

Кальций и фосфор, как показатели минерального обмена, увеличивались при добавлении энзима на 9,8 % ($p \leq 0,05$) и на 2,18 % ($p \leq 0,05$), соответственно относительно контроля.

Таблица 5 – Биохимические показатели крови цыплят бройлеров

Показатели	Группа	
	Контроль	Опыт
Глюкоза, ммоль/л	11,22 ±0,52	11,66 ±0,32 ^a
Общий белок, г/л	32,83±0,94	34,04 ±0,6 ^a
Холестерин, ммоль/л	2,5 ±0,06	2,59±0,13
Мочевина, ммоль/л	0,42±0,02	0,48±0,09
Креатинин, мкмоль/л	25,62±0,35	25,26±1,01 ^a
Mg, ммоль/л	1,12±0,04	1,16±0,08
Ca, ммоль/л	2,66±0,06	2,92±0,17 ^a
Фосфор, ммоль/л	2,29±0,07	2,34±0,05 ^a

Примечание: ^a – $P \leq 0,05$; ^b – $P \leq 0,01$; ^c – $P \leq 0,001$, при сравнении контрольной и опытных групп

Заключение. Из анализа результатов экспериментальных исследований следует, что для повышения эффективности производства продукции птицеводства целесообразно применение мультиэнзимной кормовой добавки с целью интенсификации метаболических процессов, снижения затрат корма на 1 кг прироста и как следствие увеличение продуктивности цыплят-бройлеров.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ 20–16–00078.

Литература

- Мирошников С.А., Канавина О.Н. Опыт оптимизации энзимсодержащих диет по минеральным веществам // Вестник Оренбургского государственного университета. 2005. № 2–2. С. 42–43
- Мирошников С.А., Мартыненко С.С. Стабилизирующее действие мультиэнзимной композиции на организм цыплят-бройлеров при смене состава рациона // Докл. Рос. акад. с.-х. наук. 2000. № 2. – С. 47–49.
- Фисинин В.И. Егоров И.А., Околелова Т.М., Имангулов Ш.А. Кормление сельскохозяйственной птицы, г. Сергиев Посад, 2010, 375 с.
- Cheng G., Hao H., Xie S., Wang X., Dai M., Huang L., Yuan Z. Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry? Front Microbiol., 2014, 5: 217 (doi: 10.3389/fmicb.2014.00217).
- Kiarie E., Romero L.F., Nyachoti C.M. The role of added feed enzymes in promoting gut health in swine and poultry // Nutr. Res. Rev. 2013. V. 26. P. 71–88.
- Mohammadagheri N., Najafi R., Najafi G. Effects of dietary supplementation of organic acids and phytase on performance and intestinal histomorphology of broilers. Vet Res Forum. 2016 Summer; 7(3):189–195. Epub 2016 Sep 15. PMID: 27872714; PMCID: PMC5094164.
- Rios A.C., Moutinho C.G., Pinto F.C., Del Fiol F.S., Chaud M.V. Alternatives to overcoming bacterial resistances: state-of-the-art // Microbiol Res. 2016. V. 191. P. 51–80.

ВЛИЯНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ НА ВЫХОД СПИРТА И ОБРАЗОВАНИЕ ПОБОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

С.Ф. Яковлева, А.Н. Яковлев, Е.А. Мотина., Т.Н. Тертычная*

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

** Воронежский аграрный университет имени императора Петра 1», Воронеж, Россия*

В настоящее время изучению микробных протеаз уделяется большое внимание, что связано с возможностью их многоцелевого использования для решения практических задач биотехнологических производств. В первую очередь это относится к пищевой промышленности, которая остро нуждается в эффективных комплексных ферментных препаратах, и особенно к бродильным производствам. Спиртовая промышленность – одна из пищевых отраслей, перерабатывающая зерновое сырье методами биотехнологии на спирт и кормопродукты. Технология спирта основана на действии гидролитических ферментов, катализирующих расщепление полисахаридов зерна с образованием растворимых углеводов, которые превращаются дрожжами в этиловый спирт.

Перед спиртовой промышленностью стоят следующие основные задачи: внедрение ресурсо- и энергосберегающих технологий; повышение качества спирта; полная утилизация отходов производства и хозяйственных стоков в соответствии с правилами экологии; увеличение производительности труда.

Одним из путей совершенствования технологии для достижения поставленных задач является замена солода комплексными ферментными препаратами, содержащими не только амилолитические ферменты, но и активные протеазы, обеспечивающие более полное использование составляющих частей сырья, позволяющих увеличить выход спирта из 1 т сырья.

Изучали состав вторичных и побочных продуктов, образующихся при сбраживании суслу, осахаренного ферментными препаратами, которые содержат амилазы и протеазы. Источником протеолитических ферментов служила глубинная культура гриба *Asp.oryzae*. Зрелые бражки с максимальным количеством спирта анализировали газохроматографическим методом.

Введение в производство спирта протеолитического комплекса, содержащего активные пептидазы, позволяет увеличить выход основного продукта на 2,8 % и снизить количество побочных веществ на 19 %. На единицу дрожжевых клеток в опыте приходится в 2,4 раза меньше побочных продуктов, чем в контроле. Снижение концентрации синтезируемых метаболитов подтверждает возможность прямой ассимиляции аминокислот дрожжами.

В результате обеспечения дрожжей азотистым питанием биосинтез белков клетки происходит, за счет ассимиляции аминокислот среды. Таким образом, экономится сахар на построение биомассы дрожжей, углеводы расходуются в основном на анаэробное дыхание и, следовательно, на образование спирта.

Кроме того, уменьшение количества синтезируемых вторичных и побочных продуктов также несколько увеличивает выход основного продукта брожения-этанола. Например, концентрация ацетальдегида в опыте снизилась в 4 раза, а образуется он в результате декарбоксилирования активной формы пировиноградной кислоты. Баланс расхода углеводов на образование продуктов брожения, питание дрожжей и другие побочные реакции рассчитывали на основании усреднённых экспериментальных данных по сбраживанию пшеничного суслу.

Таким образом, увеличение выхода спирта при сбраживании суслу, обогащённого продуктами протеолиза растительного белка, обусловливается проведением более экономичного процесса, повышением степени биоконверсии углеводов в этанол, сокращением потерь крахмала на образование побочных метаболитов.

УДК 663.531

ВЛИЯНИЕ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА ФИТАЗЫ НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ДРОЖЖЕЙ *S. CEREVISIAE* В ПРОИЗВОДСТВЕ СПИРТА**Т.С. Ковалева, А.Н. Яковлев, Г.В. Агафонов, С.Ф. Яковлева***Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия*

Спиртовые дрожжи, применяемые при переработке крахмалистого сырья, должны иметь высокую бродильную активность; полную сбраживаемость сахаров, устойчивость к продуктам метаболизма (особенно к спирту), устойчивость к развитию посторонней микрофлоры.

Для нормального метаболизма дрожжевых клеток в питательной среде должны присутствовать всех необходимые для нормальной жизнедеятельности клеток вещества, а также необходимы условия, исключающие стрессовые воздействия, вызываемые температурами, высокими концентрациями углеводов и этанола.

Для культивирования спиртовых дрожжей использовали зерновое сусло с применением основных ферментных препаратов амилаз (в контроле) и с применением дополнительного ферментного препарата Кингфос (в опытных образцах).

Ферментный препарат Кингфос содержит фитазу с активностью не менее 10000 ед./г (10 %). Продуцент – *Pichia pastoris*. Оптимальные условия действия препарата: pH 5,5–6,5; температура 40–45° С.

Для подсчета клеток дрожжей применяли камеру Горяева.

Количество почкующихся клеток характеризует способность дрожжей к размножению: активные дрожжи содержат 50–70 % клеток с почками. Из дрожжевой суспензии готовили препарат «раздавленная капля» и определяли процентное содержание почкующихся клеток по отношению к суммарному количеству дрожжей с почками и без них.

Процесс культивирования проводили 18–20 ч при температуре 28–30 °С в колбах на 750 см³. Количество выделенного углекислого газа определяли почасовым весовым методом.

Было установлено, что максимальной бродильной активностью обладают дрожжи, культивируемые на сусле, полученном с использованием фитазы. Кроме того, максимальная бродильная активность спиртовых дрожжей в контроле наблюдается к 12 часам роста, а в опытных образцах к 10 часам роста. Прямая ассимиляция аминокислот обеспечивает не только интенсификацию синтеза белка, но и активирует содержащиеся в дрожжевой клетке ферменты, на что указывает высокая бродильная активность. Микроэлементы, такие как кальций, цинк, магний, получаемые при гидролизе фитина, также способствуют повышению бродильной активности дрожжей.

Более высокий уровень почкования дрожжевых клеток в опыте достигался к 12 часам, а в контроле к 14 часам, что соответствует примерно середине логарифмической фазы и составил 50,0 % в опыте и 40,0 % в контроле.

Удельная скорость роста была максимальна в логарифмической фазе, когда брожение протекает слабо и составила 0,35 млн клеток/см³×ч в опытных образцах и 0,25 млн клеток/см³×ч в контроле.

Таким образом установили, что максимальное накопление дрожжевых клеток наблюдается при внесении в сусло ферментного препарата фитазы Кингфос дозировкой 0,5 ед. ФС/г. крахмала, содержание дрожжевых клеток в зрелых дрожжах достигает 170 млн клеток/см³ к 16–18 часам культивирования, дрожжи имеют высокую бродильную активность.

ВЛИЯНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ РЕЖИМОВ НА КОНЦЕНТРАЦИЮ СУХИХ ВЕЩЕСТВ В ПРОЦЕССЕ ВОДНО-ТЕПЛОВОЙ ОБРАБОТКИ ЗЕРНОВОГО СЫРЬЯ

С.Ф. Яковлева, А.Н. Яковлев, Т.С. Ковалева, О.С. Корнеева

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Спиртовая промышленность – одна из пищевых отраслей, перерабатывающая сельскохозяйственное сырье методами биотехнологии на спирт и кормо-продукты. Широкое внедрение ферментных препаратов микробного происхождения, позволяющее отдельно использовать различные амилалитические ферменты на разных стадиях технологического процесса создали предпосылки такой ферментативно-тепловой обработки крахмалистого сырья, которая исключает разваривание под повышенным давлением. В существующих технологиях спиртового производства все методы перевода крахмалсодержащего сырья в растворимое состояние основаны на смешении измельченного зерна с водой и последующей многооперационной водно-тепловой обработке замеса под избыточным давлением пара в агрегатах непрерывного разваривания при температурных режимах 125 °С и выше. Такая технология позволяла достичь высоких концентраций зернового сусла (18–20 %), но не обеспечивала ресурсосбережения и необходимого качества конечных продуктов. Водно-тепловая обработка зернового замеса при «жестком» разваривании способствует накоплению большого количества метанола и других вредных примесей, трудно отделяющихся при ректификации, кроме того, в процессе разваривания сырья под давлением происходят потери сбраживаемых углеводов сырья.

Созданная позднее технология «мягкого» режима с использованием механико-ферментативной обработки зернового сырья не обеспечивала возможность получения сусла с концентрацией сухих веществ более 16–18 %. Кроме того, с внедрением этой технологии повысился риск развития посторонней микрофлоры, инфицирующей процесс спиртового брожения, что вызвало необходимость введения в технологию последующей стадии стерилизации. Используемые в спиртовой промышленности микробные ФП обладали преимущественно амилалитической активностью и в отличие от ранее используемого солода практически не содержали ферментативные системы, эффективно гидролизующие белковые вещества и некрахмальные полисахариды зернового сырья. При водно-тепловой обработке замесов нагрев до температуры выше 60° С приводит к быстрой клейстеризации крахмала и резкому повышению вязкости, вследствие чего перекачивание массы становится невозможным. Она оказывается нетранспортабельной.

Исходя из этого для разжижения и гидродинамической подготовки сырья необходимо применять бактериальные ферментные препараты – источники α -амилазы.

Одним из основных показателей эффективности процесса ВТО является изменение растворимых сухих веществ (%) во времени. Рожь и пшеница подвергались длительной обработке бактериальной α -амилазой путем настаивания с перемешиванием в течение 1–5 ч. Было установлено, что степень гидролиза, определяемая изменением сухих веществ сырья, переходящих в растворимое состояние под действием α -амилазы, зависит от температуры и продолжительности процесса при интенсивном перемешивании. Кроме того, она зависит от дозировки α -амилазы, но только до максимальной дозы, составляющей 1,5–2,0 ед. АС/г условного крахмала. При более высоких дозах степень гидролиза не повышается.

Продолжительность процесса гидроферментативной обработки зерна при температуре 65–70° С можно ограничить 2–3 ч, после чего растворение сухих веществ мало заметно. При этом рН замеса находилась в пределах 6,1–6,4. Величина АС снижалась за 4 ч при 65° С на 15–25 %.

УДК 637.52

**ПЕРСПЕКТИВЫ РАСШИРЕНИЯ АССОРТИМЕНТА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ
ЗА СЧЕТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОДУКЦИИ КРОЛИКОВОДСТВА****Л.В. Антипова, М.С. Болдырева***Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия
Луганский государственный университет им. Владимира Даля, Луганск, Луганская Народная Республика*

Питание является одним из важнейших факторов, который определяет связь человека с внешней средой и оказывает решающее влияние на здоровье, работоспособность, устойчивость организма к воздействию различных факторов окружающей среды. Особое значение для поддержания здоровья, работоспособности и активности человека имеет полноценное и регулярное снабжение его организма всеми необходимыми микронутриентами.

Исследования рынка пищевых продуктов показывают, что торговые предприятия заполнены высококалорийными продуктами с высоким содержанием жиров и низким – белков, пищевых волокон, витаминов и минеральных веществ.

Однако изменить ситуацию, сложившуюся на российском рынке может разработка и повсеместная реализация продуктов функционального назначения. Данная категория продуктов предназначена для систематического употребления в составе рационов всеми возрастными группами здорового населения, снижает риск развития заболеваний, связанных с питанием, сохраняет и улучшает здоровье за счет наличия в составе физиологически функциональных пищевых ингредиентов [1].

В последнее время в технологии мясных продуктов особое место занимает продукция кролиководства. Сегодня рынок данной продукции в России находится на стадии формирования. По состоянию 2020 г. во всех категориях хозяйств поголовье кроликов составило 3445,4 тыс. голов. На сегодняшний день Россия занимает одно из последних мест в мире по производству крольчатины (около 19 тыс. т в год). Для сравнения, в Китае, который является мировым лидером по производству мяса кролика, этот показатель достигает 932 тыс. т, в КНДР – 154 тыс. т, в Испании – 57 тыс. т [2].

Следует отметить, что в условиях критического дефицита сырья мясоперерабатывающей отрасли важным вопросом становится необходимость осуществления мер по снижению спада производства, рациональному и комплексному использованию имеющихся мясных ресурсов.

Перспективным направлением является использование таких ценных видов вторичных сырьевых ресурсов кролиководства как кровь, кость, субпродукты, жир, непищевые отходы.

Так субпродукты кролика (печень, почки, легкие, сердце) являются полноценными по химическому составу пищевыми продуктами. Кроме того в них содержатся необходимые для жизнедеятельности человека витамины. Например, печень кролика содержит 1400 мг % аскорбиновой кислоты и 0,6–1,8 мг рибофлавина. Физиологическое значение жира весьма многообразно. Жировая ткань кролика имеет характерно выраженный белый цвет и твердую консистенцию, а также отличается высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот, ретинола, токоферола и β-каротина [3]. Кишечное сырье кролика представляет интерес для получения натуральных формовочных материалов, которые могут применяться в технологии мясных продуктов.

Все вышеизложенное позволяет сделать выводы о том, что использование продукции кролиководства способствует расширению ассортимента высококачественных биологически полноценных пищевых продуктов.

Литература

1. ГОСТ Р 52349–2005. Продукты пищевые. Продукты пищевые функциональные. Термины и определения. – Введ. 2006–07–01. – М. : Стандартинформ, 2008. – 3 с.
2. Бекетов, С. Состояние и перспективы мирового кролиководства / С. Бекетов, М. Дубинина // Комбикорма. – 2020. – № 5. – С. 4–8.
3. Комплексная переработка кроликов: традиции и инновации: монография [Текст] / Л.В. Антипова, С.А. Сторублевцев, М.Е. Успенская, Я.А. Попова, М.С. Болдырева. – Воронеж: ФГБОУ ВО «ВГУИТ», 2017. – 377 с.

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ ПРОТОПЛАСТОВ РАПСА СОРТА АНТАРЕС

Ц.С. Гарибян, З.С. Константинов, Е.В. Захарова

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Россия

Рапс (*Brassica napus* L.) – ценная масличная и кормовая культура, хорошо приспособленная к умеренному климату. В России рапс является одной из перспективных масличных культур, увеличение объемов производства семян которой позволит полнее обеспечить население растительным маслом, животноводство – кормовым белком, а промышленность – сырьем.

Создание новых сортов рапса, соответствующих требованиям современного производства, во многом зависит от разнообразия исходного материала, который можно создавать с помощью методов биотехнологии. Одним из них является метод получения растений из протопластов. Отсутствие клеточной стенки у протопластов обуславливает им свойства, отличные от целых клеток. Благодаря тому, что протопласты способны поглощать макромолекулы, их используют в качестве реципиентов при трансформации.

Оценка различных факторов, влияющих на эффективность выделения протопластов, показала, что выделение протопластов растений рапса варьирует в зависимости от генотипов и типов тканей, и их необходимо индивидуально оптимизировать. В наших экспериментах для выделения протопластов растений ярового рапса сорта Антарес отбирали экспланты из мезофилла молодых листьев с асептических растений (2–3 недельного возраста), выращиваемых в условиях *in vitro*.

Ферментную обработку эксплантов, с целью получения протопластов, проводили коммерческими энзимными препаратами Cellulase 1 U/mg (SERVA) и Macerozyme R-10 (SERVA), концентрацию которых варьировали от 0,5 % до 1,5 %. Ферментный раствор готовили непосредственно перед опытом и стерилизовали в условиях ламинарного бокса с помощью шприца с насадкой Millipore через мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм. В смесь помимо ферментов добавляли 0,5 М сахарозу и 5 mM CaCl₂ × 2H₂O (pH 5,7).

Инкубировали материал в термостате при температуре 28 °С. Выделенные протопласты очищали фильтрацией через нейлоновое сито с размером пор 100 мкм. Для отмывки от ферментов использовали специально подобранную, гипертоническую среду W-5, содержащую NaCl (9 г/л), CaCl₂ × 2H₂O (18,4г/л), KCl (0,8г/л) и глюкозу (1г/л) pH 5,7. Подсчёт количества выделенных протопластов в камере Горяева проводили в трёхкратной повторности по стандартной методике.

Таким образом, в ходе выполнения работы подобраны и оптимизированы условия ферментной обработки листовых эксплантов ярового рапса сорта Антарес, предназначенных для выделения протопластов. Показано, что концентрация Cellulase 1 U/mg 1 % и Macerozyme R-10 0,5 % в ферментном растворе является наиболее эффективной для получения максимального количества протопластов рапса.

Работа выполнена в рамках государственного задания № 0431–2019–0005 Курчатowskiй геномный центр ВНИИСБ № 075–15–2019–1667

УДК 575.113.1

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА СЕМЕЙСТВА ГЕНОВ MADS-BOX ПЕРЦА
*CAPSICUM ANNUUM L.*****А.В. Нежданова, А.М. Камионская, А.В. Щенникова**

Институт Биоинженерии им. К.Г. Скрябина, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

Перец (род *Capsicum*, семейство Solanaceae) является одной из важнейших сельскохозяйственных культур (Naves et al., 2019). Известно, по меньшей мере, 32 вида перца, включая пять культивируемых *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. baccatum* и *C. pubescens* (Qin et al. 2014). Современная селекция перцев направлена на улучшение характеристик урожая и все чаще применяет знания о молекулярно-генетических сетях, определяющих ценные признаки.

Контроль репродуктивного развития считается консервативным среди высших растений. Одними из ключевых регуляторов данного процесса является семейство MADS-доменных транскрипционных факторов (ТФ), которые, согласно моделям ABCDE и Квартет, в различных комбинациях и в составе мультимерных комплексов определяют идентичность органов цветка. (Parenicova et al., 2003; Theißen and Saedler, 2001). Семейство MADS объединяет белки типов I (ARG80/SRF-подобные M_a , M_b и M_c) и II (MEF2-подобные $MIKC^C$ и $MIKC^*$) (Parenicova et al., 2003).

На сегодняшний день секвенированы геномы трёх культивируемых видов перца *C. annuum*, *C. chinense* и *C. baccatum*, а также одного дикорастущего образца *C. annuum* var. *glabriusculum* (Qin et al., 2014; Kim et al., 2017). Идентификация и сравнительный анализ ключевых генов полезных признаков в геномах видов перца даст возможность селекционерам не только предсказывать характеристики плодов, но и вести направленную селекцию сортов с улучшенными хозяйственно значимыми показателями.

Целью работы стала идентификация и структурно-филогенетический анализ семейства MADS-box генов перца *C. annuum*.

Семейство генов MADS-box перца было идентифицировано с помощью поиска в геноме *C. annuum* (PRJNA186921; ID: 1681888) базе данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). С использованием программы NCBI-BLASTx и консервативного 5'-участка (180 п. н.) MADS-box генов, кодирующего домен MADS, в базе данных NR (Non-redundant protein sequences) были выявлены 234 кодирующие последовательности *C. annuum*. Выравнивание данных последовательностей между собой с помощью программы ClustalX позволило определить и удалить идентичные и неполные сиквенсы. В результате было идентифицировано 194 уникальные последовательности кДНК.

Для изучения экзон-интронной структуры каждого гена *C. annuum* gene ID кодирующей последовательности использовали для поиска в базе данных NCBI (All Databases). Далее, извлекали полногеномную последовательность (раздел Gene), включая данные о ее локализации. Координаты экзонов устанавливали с помощью MEGA 6.06 (<https://www.megasoftware.net/home>).

Было обнаружено, что, как и у модельного вида *Arabidopsis thaliana*, гены типа II ($MIKC^C$ и $MIKC^*$) перца содержат несколько интронов, в то время как гены типа I (M_a , M_b и M_c) – только 1, редко 2 интрона, либо не имеют их вовсе. Исключение составили два гена M_a с числом интронов 7 и 11, соответственно. Известно, что уровень транскрипции генов типа II значительно превышает таковой у генов типа I. Также, гены типа II имеют более выраженные функции в сравнении с генами типа I. Поэтому мы предполагаем, что данный факт может быть связан с количеством интронов, которые могут содержать различные регуляторные элементы. В отличие от генов M_a , M_b и M_c , гены $MIKC^C$ намного длиннее и содержат от трех до десяти экзонов. Гены $MIKC^*$ сходны по структуре с $MIKC^C$ (от 5 до 12 экзонов), однако не содержат последовательности, кодирующей домен K.

Все предполагаемые аминокислотные последовательности содержали MADS-домен.

Для сравнительного филогенетического анализа из базы данных NCBI были извлечены все 108 известных MADS-box генов модельного растения *A. thaliana* (Parenicova et al., 2003). Аминокислотные последовательности, кодируемые идентифицированными генами *A. thaliana*, были использованы для классификации MADS-семейства *C. annuum* методом максимального правдоподобия с применением отдельно подобранной модели замен в программе MEGA6.06.

Структурно-филогенетический анализ выявленных последовательностей в сравнении с *A. thaliana* разделил MADS-ТФ перца на два кластера, соответствующих ТФ типа I (SRF-подобные) и типа II

(MEF2-подобные). Кластер I состоял из трёх клад – M_α , M_β и M_γ (рис. 1). Кластер II – из двух основных клад, $MIKC^C$ и $MIKC^*$ (или M_δ) (рис. 2). В свою очередь, в $MIKC^C$ группе выделялись подклады APETALA1/FRUITFULL (А-активность; время цветения), APETALA3/PISTILLATA (В-активность), AGAMOUS/SEEDSTICK (С- и D-активности), SEPALLATA (SEP; Е-активность), AGL24/SVP (время цветения), SOC1 (время цветения), FLC (время цветения) и AGL15 (развитие семян) (рис. 2). Каждая филогенетическая группа содержала в 3–4 раза больше паралогов, чем в случае *A. thaliana* (рис. 1, 2).

Поиск и сравнение консервативных мотивов в данных белках с помощью программы MEME 5.0.4 (<http://meme-suite.org/tools/meme>) позволил провести дополнительное структурное разделение MADS-гомологов на группы.

Всего было выявлено 84 консервативных мотива. Почти все MADS-гомологи перца содержали мотивы 1 и 2, которые вместе составляют MADS-домен, за исключением клады FLC и ряда белков типа I (отсутствие мотива или его замена другим консервативным мотивом). Мотивы 3–6 (103 а.о.) соответствуют I-области и К-домену и присутствуют практически у всех белков типа II, за некоторым исключением (клады FLC и SOC1). Структура белков типа I более разнообразна, чем у типа II. При этом они не имеют мотивов, соответствующих К-домену, что и отличает их от белков типа II, согласно (Parenicova et al., 2003). Полученные данные четко демонстрируют структурное сходство MADS-белков перца в пределах каждой группы, что полностью соответствует показанному делению белков на клады. Обнаружены уникальные консенсусы, характерные только для отдельных клад: 38 и 39 у AP3-подобных белков, 32 – у SVP/AGL24, 17 или 19 – у FLC, и др. Данные мотивы могут отражать специфичность функции конкретных белков в сравнении с белками других групп.

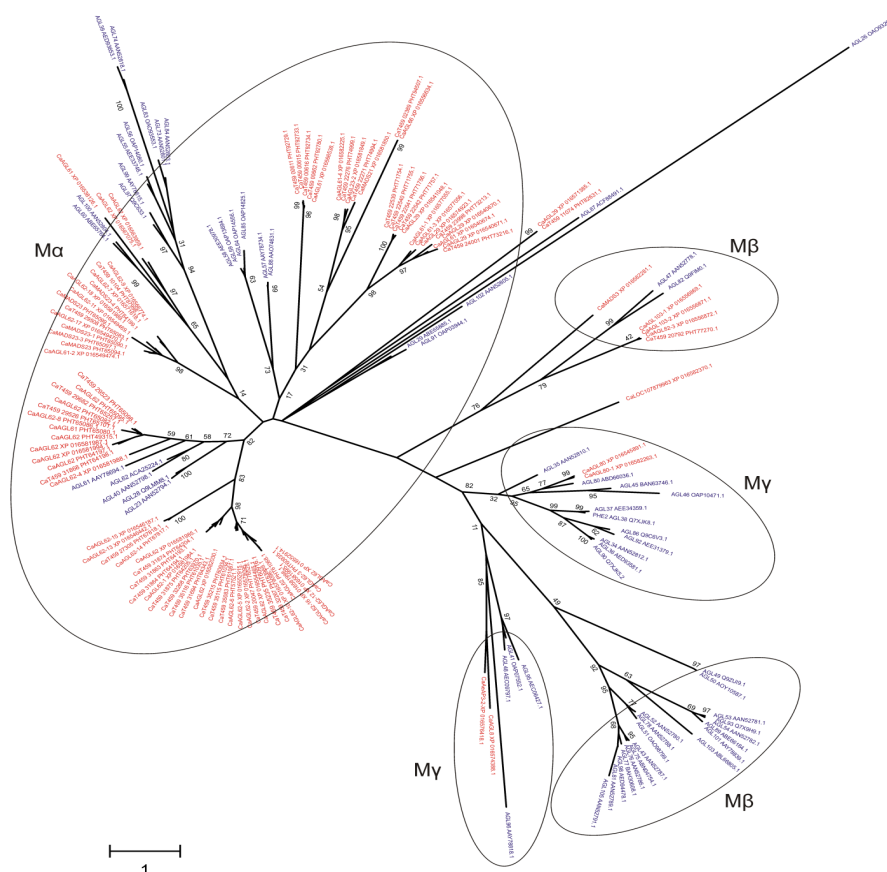


Рисунок 1. Филогения MADS белков типа I *A. thaliana* (выделено синим цветом) и *C. annuum* (выделено красным цветом)

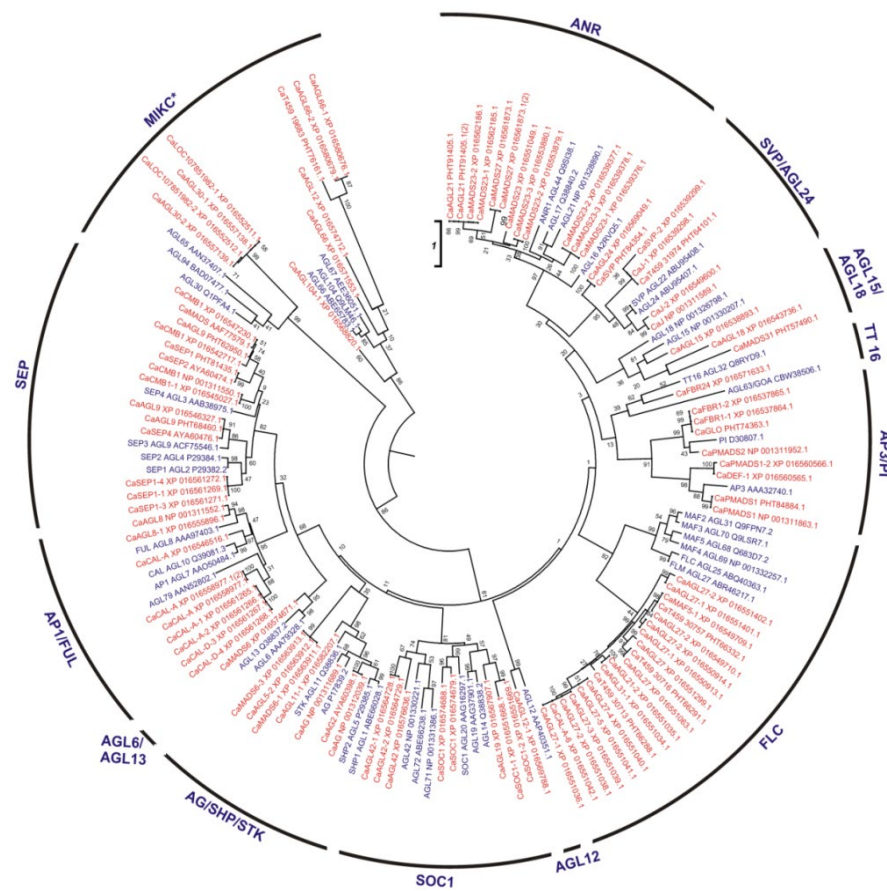


Рисунок 2. Филогения MADS белков типа II *A. thaliana* (выделено синим цветом) и *C. annuum* (выделено красным цветом)

Учитывая консервативность механизма цветения, можно предположить, что выявленные у перца *C. annuum* структурные гомологи охарактеризованных генов MADS-box *A. thaliana* имеют сходные с ними функции. Анализ имеющихся данных о функциях MADS-box генов *A. thaliana*, *C. annuum* и других видов позволил сделать предварительные выводы о возможной роли генов *CanMADS* в онтогенезе *C. annuum* (рис. 3). Так, белки типа I могут играть важные роли в репродуктивном развитии перца, как было показано для их гомологов у *A. thaliana* (Masiero et al., 2011). Функции белков типа II более разнообразны. Члены клады AP1/FUL могут выполнять А-активность при закладке меристемы цветка и околоцветника перца, что подтверждается более ранними исследованиями (Sung et al., 2001). Гомологи AP3/PI вероятно осуществляют В-активность, то есть определяют идентичность лепестков и тычинок. В подтверждение этому, ранее было показано участие PAP3 в развитии тычинок перца (Li et al., 2013; Ma et al., 2016). Белки группы AG/SHP/STK предположительно отвечают за С- и D-активности, участвуя в дифференцировке репродуктивных органов. SEP-белки (Е-активность) могут определять идентичность всех цветковых органов, как ранее показано для *CanMADS1* (Sung et al., 2001) и *CaMADS-RIN* (Dong et al., 2014, Hassan et al., 2014). Время цветения могут регулировать гомологи AGL24/SVP, что уже было продемонстрировано для генов перца MPF2 и *CaJ* (Hu, Saedler, 2007; Cohen et al., 2012), а также гомологи SOC1 и FLC. Гомологи AGL15 могут участвовать в контроле развития семян, гомологи ANR и AGL12 – корневой системы, гомолог TT16 и *CaMADS-RIN* – синтеза антоцианов и каротиноидов, соответственно, а гомологи FUL, AG, SEP – в регуляции роста и созревания плода. Последнее было ранее продемонстрировано на примере генов-гомологов *RIN*, *FUL1*, *FUL2*, *TAGL1* и *CMB1* перца (Dubey et al., 2019). На основе полученных данных была предложена схема участия выявленных MADS-box генов в генетической регуляции репродуктивного развития перца.



Рисунок 3. Возможные функции MADS-ТФ перца в развитии *C. annuum*

Полученные результаты могут быть использованы как для фундаментальных исследований развития растений, так и в селекции новых сортов перца.

Работа выполнена при поддержке РФФИ № 18–29–07007 и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Литература

- Cohen O. et al. CaJOINTLESS is a MADS-box gene involved in suppression of vegetative growth in all shoot meristems in pepper //Journal of experimental botany. – 2012. – Т. 63. – №. 13. – С. 4947–4957.
- Dong T. et al. A non-climacteric fruit gene CaMADS-RIN regulates fruit ripening and ethylene biosynthesis in climacteric fruit //PloS one. – 2014. – Т. 9. – №. 4. – С. e95559.
- Dubey M. et al. Identification of genes involved in fruit development/ripening in Capsicum and development of functional markers //Genomics. – 2019. – Т. 111. – №. 6. – С. 1913–1922.
- Hassan O.S., Badie F., Safwat G. Quantification of the gene expression of bell peppers (*Capsicum annuum*) ripening gene (s) using real-time PCR //African Journal of Biotechnology. – 2014. – Т. 13. – №. 53. – С. 4745–4752.
- Hu J.Y., Saedler H. Evolution of the inflated calyx syndrome in Solanaceae //Molecular biology and evolution. – 2007. – Т. 24. – №. 11. – С. 2443–2453.
- Kim S. et al. New reference genome sequences of hot pepper reveal the massive evolution of plant disease-resistance genes by retroduplication //Genome biology. – 2017. – Т. 18. – №. 1. – С. 1–11.
- Li X. et al. Expression pattern of class B gene PAP3 in flower development of pepper //International journal of molecular sciences. – 2013. – Т. 14. – №. 12. – С. 24643–24655.
- Ma N. et al. PAP3 Regulates Stamen but Not Petal Development in *Capsicum annuum* L //Horticultural Plant Journal. – 2016. – Т. 2. – №. 2. – С. 91–96.
- Masiero S. et al. The emerging importance of type I MADS box transcription factors for plant reproduction //The Plant Cell. – 2011. – Т. 23. – №. 3. – С. 865–872.
- Naves E.R. et al. Capsaicinoids: pungency beyond Capsicum //Trends in plant science. – 2019. – Т. 24. – №. 2. – С. 109–120.
- Parenicová L. et al. Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in Arabidopsis: new openings to the MADS world //The Plant Cell. – 2003. – Т. 15. – №. 7. – С. 1538–1551.
- Qin C. et al. Whole-genome sequencing of cultivated and wild peppers provides insights into Capsicum domestication and specialization //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2014. – Т. 111. – №. 14. – С. 5135–5140.
- Sung S.K. et al. Characterization of MADS box genes from hot pepper //Molecules and cells. – 2001. – Т. 11. – №. 3. – С. 352–359.
- Theissen G., Saedler H. Floral quartets //Nature. – 2001. – Т. 409. – №. 6819. – С. 469–471.

УДК 579.24

ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ ВЫХОДА БИОМАССЫ СИЛИКАТНЫХ БАКТЕРИЙ**Л.А. Улаханова, С.В. Гомбоева, Н.С. Балдаев, В.Ж. Цыренов***Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления, Улан-Удэ, Россия*

Силикатные бактерии используются для рекультивации и обогащения почвы соединениями, необходимыми для питания растений. Этот вид микроорганизмов способен к деструкции сложных кремниевых соединений с высвобождением таких элементов, как К, Si, Р и являются слабыми азотфиксаторами. Помимо этого они способны к синтезу растактивирующих веществ – фитогормонов, экзополисахаридов некрахмальной природы, которые могут сорбировать токсичные вещества из почвы.

Для получения биопрепарата на основе силикатных бактерий необходимо получить наибольший выход клеток бактерий при минимальных затратах, эксперимент был осуществлен с помощью математических методов планирования. Математические модели процесса культивирования позволяют объективно и количественно через соответствующие коэффициенты оценить влияние каждого исследуемого фактора на процесс с учетом возможного взаимодействия их со всеми остальными факторами.

В качестве источника углерода использовалась сахароза, которая является наиболее подходящим углеводом для силикатных бактерий. В качестве источника азота использовали сульфат аммония, по литературным данным в присутствии этого элемента образуется большее количество спор. Бентонит был выбран как кремнийсодержащий минерал, предыдущие исследования показали, что они хорошо его разлагают, и скорей всего для использования в своих биохимических процессах.

Для исследования использовали выделенную ранее культуру на кафедре «Биотехнология» ФГБОУ ВО ВСГУТУ из песка. Оптимизировали жидкую питательную среду Зака. Для построения математической модели был выбран полный факторный эксперимент (ПФЭ 3^3), который позволяет получить квадратичное уравнение процесса. Квадратичные члены уравнения оценивают межфакторное взаимодействие, т. е. как зависит влияние одного из факторов от уровня взаимодействующего с ним фактора.

При построении данной модели выбраны следующие компоненты, влияющие на процесс: сахароза, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, бентонит; содержание остальных компонентов зафиксировано на одном уровне. В качестве показателя интенсивности процесса оценивался выход биомассы.

План ПФЭ 3^3 позволил исследовать 27 вариантов питательных сред с одновременным варьированием всех трех факторов на трех уровнях. Определение количества бактериальных клеток в культуральной жидкости проводилось турбидиметрическим методом.

По результатам планирования получено квадратичное уравнение выхода процесса:

$$y = 22,23 + 1,21x_1 + 2,43x_2 - 2,32x_1^2 * x_3 \quad (1)$$

С помощью уравнения (1) было определено, что источник азота в выбранных пределах концентраций не оказывает влияния на рост силикатных бактерий.

Оптимизация состава питательной среды по источникам углерода и кремния позволила сократить их концентрацию почти в 10 раз с увеличением выхода биомассы на 60 %.

Литература

1. Lian B., Chen Y., Zhao J., Teng H.H., Zhu L.J., Yuan S. Microbial flocculation by *Bacillus mucilaginosus*: applications and mechanisms. *Bioresour Technol.* 2008, no. 99, pp. 4825–4831.
2. Грачев Ю.П., Плаксин Ю.М. Математические методы планирования эксперимента – М.: ДеЛи принт 2005 г.

**СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ НОКАУТОВ
ПО ГЕНАМ RAB-ГЕРАНИЛГЕРАНИЛТРАНСФЕРАЗЫ У РАСТЕНИЙ *MARCHANTIA*
*POLYMORPHA***

М.С. Кулаженко, Л.Р. Валеева

Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

Развитие растительных биотехнологий имеет большие перспективы для получения рекомбинантных белков и биологически активных метаболитов, а также улучшения свойств растений, таких как устойчивость к неблагоприятным факторам среды и фитопатогенам, продуктивность и пищевая ценность. Пренилирование белков является одним из важнейших типов посттрансляционной модификации белков большинства живых организмов, в том числе и растений. Пренилированные белки выполняют такие функции, как сигнальная трансдукция, полярный рост клеток, модификации мембран и клеточной стенки. В свою очередь, эти процессы связаны с устойчивостью растений к различным видам стресса, включая засуху, температурный шок, осмотический стресс и инфицирование патогенными микроорганизмами, а также с развитием растений и созреванием плодов. Тем самым, пренилтрансферазы и пренилированные белки являются перспективными мишенями для генетической инженерии растений и сельскохозяйственной биотехнологии.

В пренилировании белков участвуют три типа пренилтрансфераз, наиболее специфичной из которых является Rab-геранилгеранилтрансфераза (Rab-GGT), функциональная роль которой к настоящему времени остается малоизученной. Удобными и перспективными объектами для проведения молекулярно-генетических исследований в царстве растений, в частности, изучения роли пренилтрансфераз, являются бриофиты, так как эта группа растений является одной из древнейших многоклеточных наземных растений. Использование представителя бриофитов *Marchantia polymorpha* для исследования пренилирования белков растений открывает новые возможности для изучения процессов развития растений, а также филогенетических связей внутри царства растений.

Целью работы было создание генетических конструкций для CRISPR/Cas9 нокаутирования генов субъединиц Rab-геранилгеранилтрансферазы *Marchantia polymorpha*.

В результате проведенного биоинформационного поиска нами было установлено наличие одной копии гена α -субъединицы и одной копии гена β -субъединицы Rab-геранилгеранилтрансферазы в геноме растений *Marchantia polymorpha*. Проведен филогенетический анализ генов Rab-GGT *M. polymorpha*. Нами получены две конструкции на основе бинарного вектора pMpGE_011 и специфичных sgRNA для CRISPR/Cas9 нокаутирования гена α -субъединицы Rab-геранилгеранилтрансферазы *M. polymorpha* и одна конструкция – для β -субъединицы. Получены рекомбинантные штаммы *A. tumefaciens* GV2660 с интегрированными рекомбинантными векторами pMpGE_011:sgRNA для дальнейшей трансформации *M. polymorpha*.

В дальнейшем нами будет проведена трансформация растений *M. polymorpha* для анализа влияния Rab-геранилгеранилтрансферазы на рост и развитие растений. Кроме того, полученные данные будут использованы для выявления белков-мишеней пренилирования и их возможной роли в ответе растений на абиотический и биотический стресс.

Работа выполнена в рамках проекта, поддержанного Стипендией Президента РФ СП-3391.2021.4.

УДК 615.241.3 + 615.275.4 + 615.322 + 612.084

**ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА АДАПТОГЕННЫХ СВОЙСТВ
ФИТОЭКДИСТЕРОИД СОДЕРЖАЩИХ ЭКСТРАКТОВ ИЗ ЗЕРЕН КИНОА****В.А. Шипелин, Н.А. Петров, С.Н. Зорин, В.К. Мазо, Ю.С. Сидорова**

ФИЦ питания и биотехнологии, Москва, Россия

Введение. Профессиональная деятельность человека, связанная с повышенными психо-эмоциональными и физическими нагрузками, вредными условиями труда или неблагоприятными климатическими условиями требует особых персонализированных программ питания, включающих, в том числе, использование специализированных пищевых продуктов (СПП), содержащих в своём составе функциональные пищевые ингредиенты (ФПИ) с доказанным адаптогенным действием. Использование в питании различных минорных растительных биологически активных веществ (БАВ) – адаптогенов способствует повышению устойчивости организма человека к неблагоприятным воздействиям и стрессу [1]. Одним из перспективных источников БАВ адаптогенного действия, содержащих широкий спектр фитоэкдистероидов и полифенольных веществ, являются зерна киноа [2, 3]. Использование современных технологических подходов, включающих целенаправленное выделение и концентрирование комплексов с различным заданным соотношением фитоэкдистероидов и полифенольных соединений, применение технологий ультрафильтрации низкомолекулярных фракций позволяет достигать высоких концентраций БАВ в составе ФПИ. Ввиду практически полного отсутствия в Российской Федерации отечественных ФПИ адаптогенного действия не вызывает сомнения социальная значимость и целесообразность их разработки, оценки безопасности и эффективности путем проведения доклинических исследований *in vivo* и, в перспективе, клинической апробации. Целью настоящего исследования являлась оценка эффективности нутритивной поддержки фитоэкдистероидами и другими минорными БАВ, входящими в состав разработанного ФПИ из зерен киноа, в условиях истощающей физической нагрузки на беговой дорожке на основании комплексной оценки маркеров неспецифической резистентности организма крыс.

Материалы и методы. В качестве источника адаптогенов в эксперименте использовали комплекс фитоэкдистероидов и полифенолов из зерен киноа (*Chenopodium quinoa*) с общим содержанием фитоэкдистероидов (20E) $50,4 \pm 0,6$ мг/г и полифенолов $21,2 \pm 2,0$ вес. %.

Эксперимент проведен с использованием 36 крыс-самцов линии Вистар с исходной массой тела 80 ± 5 г, полученных из питомника лабораторных животных Филиал «Столбовая» Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства». Исследования на животных выполняли в соответствии с требованиями Национального стандарта РФ ГОСТ Р 53434–2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Перед экспериментом крыс разделяли по их массе тела, поведенческому фенотипу и двигательной активности в тестах «Беговая дорожка» и «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) на три группы (К1, Г2 и Г3) равной численности ($n=12$). До начала эксперимента проводили отбор обучаемых животных. Крысы необучаемые бегу не были взяты в исследование. Животные контрольной группы К1 и группы Г2 в течение 36 суток эксперимента получали стандартный полусинтетический рацион, соответствующий [4]. Крысы третьей опытной группы Г3 получали модифицированный полусинтетический рацион с добавлением ФПИ ($0,057 \pm 0,001$ %). На протяжении эксперимента крысы получали воду и рационы в режиме неограниченного доступа. Тестирование в ПКЛ проводили до начала кормления животных экспериментальными рационами и на 32-й день эксперимента для оценки динамики изменений. Исследование особенностей поведения и памяти животных проводили, используя тест «Условный рефлекс пассивного избегания» (УРПИ) на оборудовании и по методам, описанным ранее [5]. Обучение проводили на 14-е сутки эксперимента, проверку обучения (памятного следа) на 15-е сутки, долгосрочную память оценивали на 29-е сутки кормления (спустя 2 недели). Тренировочные тесты на беговой дорожке для животных опытных групп Г2 и Г3 проводили 1 раз в неделю. Продолжительность нагрузки на стадии тренировок составляла 10 мин, скорость ленты с течением времени повышали с 16–19 см/с до 19–22 см/с, наклон полотна составлял 0° . Измеряемые параметры: общая протяженность пройденного расстояния, полное время шока для каждого животного, количество контактов с электрической решеткой. На 36-е сутки эксперимента животные групп Г2 и Г3 подвергались

истощающей физической нагрузке на беговой дорожке. Продолжительность нагрузки составляла 50 мин., скорость ленты плавно повышали с 19 см/с до 43 см/с, наклон полотна составлял 10°. Сразу после бега животных помещали в обменные клетки для сбора суточной мочи. Через 24 часа (37 сут.) крыс, депривированных голодом ночью, выводили из эксперимента, собирали кровь, отделяли сыворотку и исследовали содержание кортикостерона методом количественного конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческого набора реактивов по инструкции производителя (IDS Limited, UK); содержание каталазы определяли с помощью коммерческого набора реагентов (Cayman, USA). Содержание простагландина E2 в моче определяли методом ИФА с использованием коммерческого набора реактивов по инструкции производителя (R&D systems, USA).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ SPSS Statistics 20 (IBM, США), используя непараметрический ранговый критерий Манна–Уитни и критерий Стьюдента. Вычисляли среднее значение (M), стандартное отклонение (SD) и стандартную ошибку среднего (m). Данные представлены как $M \pm m$. Достоверность различий принимали при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. При ежедневном осмотре общее состояние всех животных по внешнему виду, состоянию шерстяного покрова, потреблению корма, воды и поведению было удовлетворительным на протяжении всего эксперимента. Среднее потребление корма животными контрольной группы К1 и животными групп Г2 и Г3 на протяжении всего эксперимента и среднее кумулятивное за весь эксперимент представлено на рисунке 1.

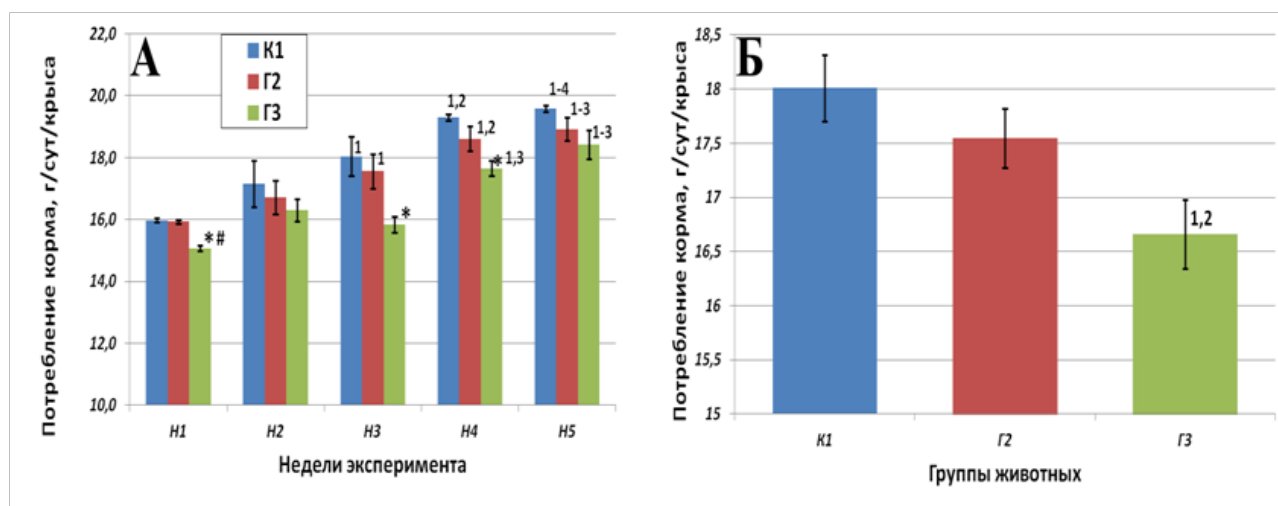


Рис. 1. Среднее потребление корма животными, г/сутки / крыса:

Примечания: Н1, Н2, Н3, Н4, Н5 – неделя 1, неделя 2, неделя 3, неделя 4 и неделя 5 соответственно. a^N – достоверно относительно недели N; * – достоверно относительно группы Г2; # – достоверно относительно группы Г3

Среднее кумулятивное потребление корма (Рис. 1Б) животными группы Г3, получавшими ФПИ, было достоверно ниже по сравнению с контрольными интактными животными группы К1 и опытными животными группы Г2. Из данных понедельного потребления корма животными (Рис. 1А) видно, что потребление корма животными группы Г3, получавшими ФПИ на 1, 3 и 4 неделях эксперимента, было достоверно меньше по сравнению с животными К1, достоверные различия с животными Г2 наблюдались только на 1 неделе. Расчетное потребление 20Е в составе ФПИ животными опытной группы Г3 составило – $1,83 \pm 0,02$ мг/кг/сутки; расчетное потребление полифенолов – $9,4 \pm 0,1$ мг/кг/сутки.

Прирост массы тела животных всех групп достоверно не отличался (данные не показаны), не смотря на меньшее потребление корма животными группы Г3. Можно предположить, что введение в рацион ФПИ в условиях еженедельной физической нагрузки снижало аппетит животных, не оказывая влияния на прирост массы тела.

На рисунке 2 (А, Б, В, Г) представлены результаты тестирования крыс в ПКЛ в начале эксперимента и на 32-е сутки эксперимента. При первом тестировании не выявлено достоверных различий временных интервалов, проведенных животными в открытых и закрытых рукавах лабиринта (показатели характеризующие тревожность животных, рис. 2А, Б); достоверных отличий двигательной и исследовательской активности, характеризуемых показателями перемещения между рукавами лабиринта (рис. 2В) и общей пройденной дистанцией (рис. 2Г). Во втором тестировании, животные опытной группы Г2 достоверно меньше времени проводили в открытых рукавах лабиринта (рис. 2А) по сравнению с первым тестированием. Общая пройденная дистанция у животных группы Г2 также была достоверно ниже по сравнению с первым тестированием. Ежедневная физическая нагрузка повышала тревожность лабораторных животных, тем не менее, введение в рацион ФПИ приводило к некоторой нормализации показателей тревожности и двигательной активности.

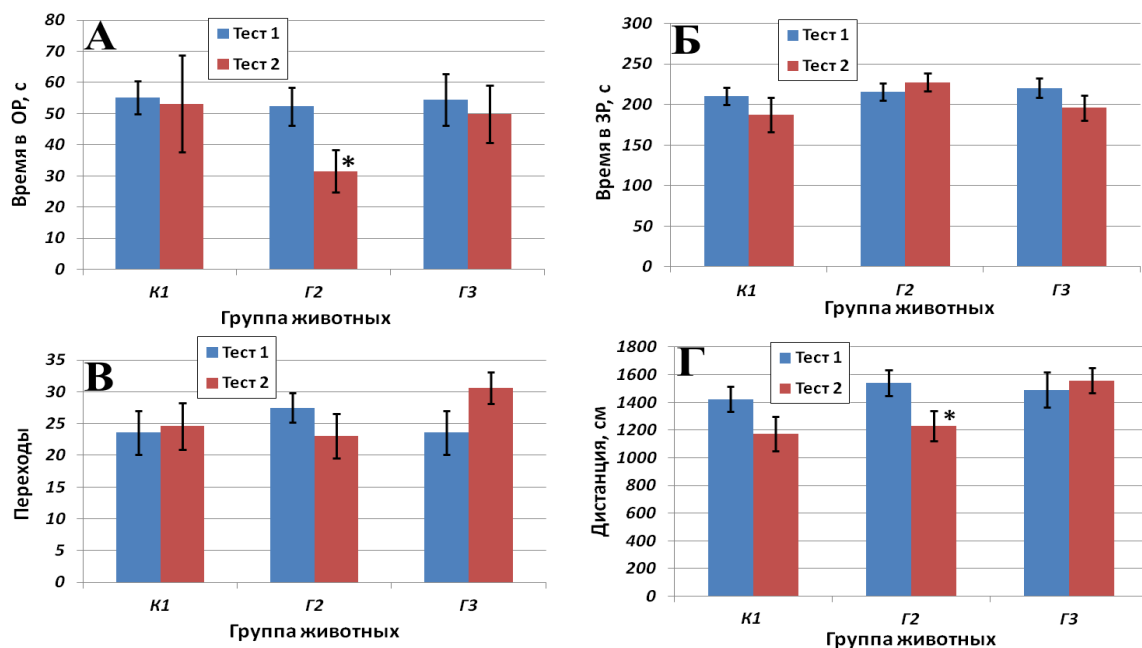


Рис. 2. Результаты тестирования в приподнятом крестообразном лабиринте

Примечания: ОР – открытые рукава; ЗР – закрытые рукава; Тест 1 до начала кормления экспериментальными рационами; Тест 2 на 32 сутки эксперимента; * – различия достоверны по сравнению с 1-м тестом

В течение эксперимента не было выявлено различий в поведении животных в тесте «Беговая дорожка» по всем регистрируемым показателям (данные не показаны). На 36 сутки эксперимента отсутствовали различия между группами в показателях выносливости при истощающей физической нагрузке в тесте «Беговая дорожка» (время бега для группы Г2 составило 42 ± 2 мин. и для группы Г3 – 45 ± 2 мин.).

Во время первого тестирования – выработки УРПИ (таблица 1), во всех группах были выявлены животные, не входившие в темный отсек камеры (от 1 до 2) и исключенные из дальнейшего тестирования. На 2-е сутки тестирования краткосрочной памяти достоверных отличий между группами выявлено не было. На 14-е сутки тестирования долгосрочной памяти латентное время входа в темный отсек камеры у животных опытных групп Г2 и Г3, подвергаемых ежедневной умеренной физической нагрузке, было достоверно ниже по сравнению контрольной группой К1, что, косвенно, может указывать о влиянии регулярных физических нагрузок на долгосрочную память крыс.

Поступление в составе ФПИ фитоэкдистероидов и полифенолов в организм животного, по-видимому, может влиять на баланс изучаемых активаторов стресса. Нами было установлено, что потребление животными ФПИ препятствовало увеличению содержания в крови кортикостерона и снижало экскрецию простагландина Е2 в моче (Рис. 3А, Б).

Кортикостерон относят к основным активаторам стресс-системы, поэтому любая напряженная работа, особенно физическая нагрузка, способствует увеличению пула кортикостерона в крови [6]. Простагландин E2, наоборот, относится к ингибиторам стрессорной реакции. Полученный результат может говорить о «сглаживании» реакции организма в ответ на стресс, т. е. об адаптогенном эффекте разработанного ФПИ.

Таблица 1. Результаты тестирования УРПИ

Группы	Время пребывания, с					
	Первый тест (выработка УРПИ)		Второе тестирование (через 24 часа)		Третье тестирование (2 недели)	
	Не вошедшие животные (исключены из теста)		Краткосрочная память		Долгосрочная память	
	Время входа, с	Число вошедших животных	Время входа, с	Число вошедших животных	Время входа, с	Число вошедших животных
K1	67±20	2(12)	164±16	1(10 %)	152±17	3(30 %)
Г2	40±14	1(12)	110±24	5(45 %)	84±25*	7(64 %)
Г3	37±12	1(12)	137±22	3(27 %)	86±24*	7(64 %)

* – различия достоверны по сравнению с группой K1

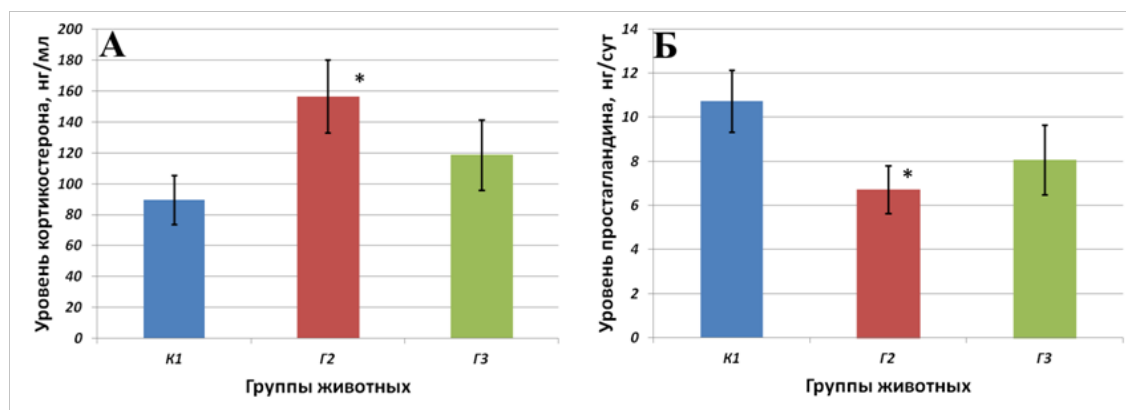


Рис. 3. Уровни кортикостерона в сыворотке крови и простагландина E2 в моче крыс

* – различия достоверны по сравнению с группой K1

Каталаза является широко распространенным антиоксидантным ферментом, присутствует в большинстве аэробных клеток, участвует в детоксикации перекисей водорода и активных форм кислорода. В нашем исследовании было показано, что истощающая нагрузка бегом у животных группы Г2 приводила к достоверному снижению уровня каталазы в крови (118 ± 4 нмоль/мин/мл) по сравнению с группой K1 (130 ± 3 нмоль/мин/мл) и группой Г3 (125 ± 3 нмоль/мин/мл). Полученный результат показывает, что стрессорная беговая нагрузка приводила к повышенному расходу фермента каталазы, тогда как введение в рацион ФПИ снижало уровень окислительного стресса до уровня нормальных животных.

Заключение. Таким образом, 36-дневная нутритивная поддержка фитоэкдистероидами и другими минорными БАВ в составе разработанного ФПИ из зерен киноа на фоне еженедельной, истощающей физической нагрузки способствует нормализации показателей тревожности и двигательной активности, положительно влияет на маркеры неспецифической резистентности организма крыс. Можно сделать вывод о наличии адаптогенных свойств у разработанного ФПИ из зерен киноа, что делает его перспективным компонентом специализированных пищевых продуктов для определенных категорий лиц, подверженных повышенным физическим нагрузкам и психоэмоциональному стрессу.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 19-16-00107 «Новые функциональные пищевые ингредиенты адаптогенного действия, предназначенные для увеличения работоспособности организма человека и повышения его когнитивного потенциала».

Литература

- Panossian A.G., Efferth T., Shikov A.N., et al. Evolution of the adaptogenic concept from traditional use to medical systems: Pharmacology of stress – and aging-related diseases // *Med Res Rev.* 2021. Vol. 41, № 1. P. 630–703.
- Sidorova Y.S., Petrov N.A., Shipelin V.A., Mazo V.K. Spinach and quinoa – prospective food sources of biologically active substances // *Vopr Pitan.* 2020. Vol. 89, № 2. P. 100–106.
- Graf B.L., Poulev A., Kuhn P., Grace M.H., Lila M.A., Raskin I. Quinoa seeds leach phytoecdysteroids and other compounds with anti-diabetic properties // *Food Chem.* 2014. Vol. 163. P.178–185.
- Reeves P.G., Nielsen F.H., Fahey G.C. Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet // *J Nutr.* 1993. Vol. 123, № 11. P. 1939–51.
- Mzhelskaya K.V., Shipelin V.A., Shumakova A.A., et al. Effects of quercetin on the neuromotor function and behavioral responses of Wistar and Zucker rats fed a high-fat and high-carbohydrate diet // *Behav Brain Res.* 2020. Vol. 378. P. 112270.
- Gong S., Miao Y.L., Jiao G.Z., Sun M.J., Li H., Lin J., Luo M.J., Tan J.H. Dynamics and correlation of serum cortisol and corticosterone under different physiological or stressful conditions in mice // *PLoS One.* 2015. Vol. 10, № 2. P.e0117503.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СУХОГО ПЕРМЕАТА В БИОСИНТЕЗЕ КОРМОВОГО БЕЛКА

И.С. Полянская, Г.О. Катаранов, Е.Н. Закрепина

Вологодская молочнохозяйственная академия, Вологда, Россия

Являясь ценнейшим пищевым сырьём, молочная сыворотка находит всё большее применение в мембранных технологиях для производства специализированных и функциональных пищевых продуктов. Образующийся при этом как побочный продукт пермеат молочной сыворотки также может быть использован на пищевые цели, однако высокое содержание минеральных веществ в нём, ограничивает возможности пищевого использования, но, в силу богатого биоэлементного состава, позволяет надеяться, со временем, на полное использование пермеата молочной сыворотки для производства функциональных кормовых продуктов сельскохозяйственным животным [1].

В исследовании, представленном в настоящей публикации в качестве основы питательной среды для накопления биомассы кормовых дрожжей был использован восстановленный продукт сывороточный сухой (пермеат) по ТУ 10.51.55–030–00426012–2019, с пищевой ценностью в 100 г. продукта (средние значения): белок – 2,5 г; углеводы – 90 г. Изготовитель продукта: ПАО Молочный комбинат «Воронежский», филиал «Калачеевский сырзавод». Восстановление дистиллированной водой проводилось в 100 раз, с добавлением 1 % карбамида, а также: 10 % раствора 5 % глюкозы (контрольные образцы); 10 % раствора, содержащего редуцирующие сахара, полученные кавитацией из осинового опилок (опытные образцы). Повторность опыта трёхкратная.

Метод получения УЗ-гидролизата опилок является разработкой кафедрой биологии и химии Вологодского технического университета и его сущность описана в предыдущем исследовании [2].

В отличие от предыдущих этапов нашей работы по накоплению биомассы кормовых дрожжей технология была упрощена, т. к. пермеат, в отличие от сыворотки, практически не содержит белков, а только растворимые аминокислоты и соли, то безмембранное концентрирование сывороточных белков не проводилось. Так же не проводилось обогащение среды неорганическими биоэлементами, кроме азота в виде карбамида. Эффективность утилизации сахаров, полученных кавитационным гидролизатом опилок проводилась по сравнению с глюкозой.

Коэффициент накопления биомассы дрожжей в контрольных образцах в условиях опыта (трёхкратная повторность) составил $(2,52 \pm 0,16)$, тогда как в опытных был выше – $(4,53 \pm 0,02)$.

Результаты испытаний показывают, что питательная среда на основе восстановленного сухого пермеата при использовании в качестве дополнительного углеводного компонента кавитационного гидролизата древесных опилок является эффективной для накопления кормовых дрожжей.

Одновременное использование в составе питательной среды для накопления биомассы кормовых пробиотиков сывороточного сухого пермеата и дополнительного углеводного компонента в виде гидролизата опилок, полученного кавитацией, как показал обзор литературы по теме, является новым в биотехнологии кормовых дрожжей и после доработки до промышленных масштабов может быть использована в составе наилучших из доступных технологий на новом витке развития.

Литература

1. Полянская И.С. Функциональный пробиотический продукт для сельскохозяйственных животных / И.С. Полянская; Г.О. Катаранов, Е.Н. Закрепина, В.Ф. Семенихина // Молочная промышленность. – 2020. – № 3. – С. 62–63.
2. Использование углеводного сырья из опилок для накопления Биомассы кормовых пробиотиков / И.С. Полянская, Г.О. Катаранов, Л.М. Воропай URL file:///C:/Users/a/Downloads/2177 % 20(2).pdf (дата обращения 17.07. 2021 г.).

УДК 556: 551

ОЦЕНКА БИОГЕННОСТИ И ТОКСИЧНОСТИ ЭЛЕМЕНТОВ В ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ГИДРОХИМИИ

И.С. Полянская

Вологодская молочнохозяйственная академия, Вологда, Россия

Специалист по водным биоресурсам и аквакультуре осуществляет измерения гидрохимических показателей как в производственно-технологической, так и в научно-исследовательской деятельности. По классификации О.А. Алекина по преобладающему аниону воды делят на гидрокарбонатные, сульфатные и хлоридные. В соответствии с законом Дитмара, в любом образце Мирового океана, преобладающими являются ионы: кальция, натрия, магния, калия и, несмотря, что их содержание в ультрапресной воде и рассоле превышает два порядка, основные катионы и элементы анионов, а также растворённых в воде газов и органоенов органических веществ считаются макроэлементами воды и их исследование наиболее стандартизировано для различных вод.

Из неорганических веществ в настоящее время, помимо названных макроэлементов, контролируют обычно восемь-двенадцать показателей. Однако развитием практической экологической гидрохимии, как составляющей нутрициологии для гидробионтов, количество контролируемых элементов может быть существенно выше.

При оценке биогенности / токсичности воды, в зависимости от конкретной составляющей в виде милли-, микро – наноэлементов малоопасных веществ, на современном этапе предлагаем использовать классификацию биоэлементов с учётом значений латинских приставок (милли-, микро-, нано) [1, 2]. При этом состав воды может расширенно контролироваться в научно-исследовательской, а затем и в производственно-технологической деятельности по восьми-девяи десяткам параметров важных для жизнедеятельности конкретных промысловых видов.

Для примера в табл. 1 приведены примеры классификации биоэлементов, с учетом среднего содержание их в гидросфере. На основе классификации с учётом значений латинских приставок для большинства видов, разводимых в естественных или искусственных водоёмах, безопасное и достаточное для жизнеобеспечения содержание биоэлемента находится в пределах одного, редко двух порядков; для токсичных элементов (в зависимости от класса токсичности) устанавливаются коэффициенты безопасных границ содержания по известным формулам, приведённым в СанПиН, с учетом синергетичного эффекта опасного действия.

Таблица 1. Биоэлементы воды с учетом значений латинских приставок

Символ элемента	Элемент	Среднее содержание в гидросфере, г/л	Классификация
B	Бор	$4,4 \cdot 10^{-3}$	Миллиэлемент первого порядка
Mo	Молибден	$1,2 \cdot 10^{-3}$	Миллиэлемент первого порядка
Pr	Празеодим	$9,2 \cdot 10^{-3}$	Миллиэлемент первого порядка
Si	Кремний	$2,2 \cdot 10^{-3}$	Миллиэлемент первого порядка
Sr	Стронций	$7,9 \cdot 10^{-3}$	Миллиэлемент первого порядка
Ar	Аргон	$4,5 \cdot 10^{-4}$	Миллиэлемент второго порядка
Li	Литий	$1,8 \cdot 10^{-4}$	Миллиэлемент второго порядка
N	Азот	$5,0 \cdot 10^{-4}$	Миллиэлемент второго порядка
Rb	Рубидий	$1,2 \cdot 10^{-4}$	Миллиэлемент второго порядка
Ba	Барий	$1,3 \cdot 10^{-5}$	Миллиэлемент третьего порядка
I	Йод	$6,0 \cdot 10^{-5}$	Миллиэлемент третьего порядка
In	Индий	$2,0 \cdot 10^{-5}$	Миллиэлемент третьего порядка
Mo	Молибден	$1,0 \cdot 10^{-5}$	Миллиэлемент третьего порядка
P	Фосфор	$6,0 \cdot 10^{-5}$	Миллиэлемент третьего порядка
Sb	Сурьма	$7,9 \cdot 10^{-5}$	Миллиэлемент третьего порядка
Al	Алюминий	$2,0 \cdot 10^{-6}$	Микроэлемент первого порядка
As	Мышьяк	$3,7 \cdot 10^{-6}$	Микроэлемент первого порядка
Fe	Железо	$2,0 \cdot 10^{-6}$	Микроэлемент первого порядка
Ti	Титан	$1,0 \cdot 10^{-6}$	Микроэлемент первого порядка
U	Уран	$3,2 \cdot 10^{-6}$	Микроэлемент первого порядка

Символ элемента	Элемент	Среднее содержание в гидросфере, г/л	Классификация
V	Ванадий	$2,2 \cdot 10^{-6}$	Микроэлемент первого порядка
Zn	Цинк	$7,0 \cdot 10^{-6}$	Микроэлемент первого порядка
Cs	Цезий	$3,0 \cdot 10^{-7}$	Микроэлемент второго порядка
Cu	Медь	$2,5 \cdot 10^{-7}$	Микроэлемент второго порядка
Kr	Криптон	$3,0 \cdot 10^{-7}$	Микроэлемент второго порядка
Mn	Марганец	$2,5 \cdot 10^{-7}$	Микроэлемент второго порядка
Ne	Неон	$1,2 \cdot 10^{-7}$	Микроэлемент второго порядка
Ni	Никель	$8,4 \cdot 10^{-7}$	Микроэлемент второго порядка
Se	Селен	$2,0 \cdot 10^{-7}$	Микроэлемент второго порядка
W	Вольфрам	$1,0 \cdot 10^{-7}$	Микроэлемент второго порядка
Ag	Серебро	$4,0 \cdot 10^{-8}$	Микроэлемент третьего порядка
Bi	Висмут	$2,0 \cdot 10^{-8}$	Микроэлемент третьего порядка
Co	Кобальт	$2,0 \cdot 10^{-8}$	Микроэлемент третьего порядка
Ga	Галий	$3,0 \cdot 10^{-8}$	Микроэлемент третьего порядка
Ge	Германий	$5,0 \cdot 10^{-8}$	Микроэлемент третьего порядка
Hg	Ртуть	$3,0 \cdot 10^{-8}$	Микроэлемент третьего порядка
Nb	Ниобий	$1,0 \cdot 10^{-8}$	Микроэлемент третьего порядка
Pb	Свинец	$3,0 \cdot 10^{-8}$	Микроэлемент третьего порядка
Tl	Тантал	$1,9 \cdot 10^{-8}$	Микроэлемент третьего порядка
Y	Иттрий	$1,3 \cdot 10^{-8}$	Микроэлемент третьего порядка
Zr	Цирконий	$3,0 \cdot 10^{-8}$	Микроэлемент третьего порядка
Au	Золото	$4,0 \cdot 10^{-9}$	Нанозлемент первого порядка
Hf	Гафний	$7,0 \cdot 10^{-9}$	Нанозлемент первого порядка
Ta	Тантал	$2,0 \cdot 10^{-9}$	Нанозлемент первого порядка
Ru	Рубидий	$7,0 \cdot 10^{-10}$	Нанозлемент второго порядка
Sc	Скандий	$6,0 \cdot 10^{-10}$	Нанозлемент второго порядка
Tb	Тербий	$1,4 \cdot 10^{-10}$	Нанозлемент второго порядка

Таким образом, предложенная в нутрициологии новая классификация биоэлементов [3] может иметь долгосрочные перспективы применения в целях развития экологической гидрохимии при разведении аквакультур.

Литература

1. Bio-elements in functional foods / I.S. Polyanskaya, V.L. Popova, L.G. Stoyanova, A.S. Teraevich // Journal of Hygienic Engineering and Design. 2017. Т. 21. С. 70–76.
2. Polyanskaya I.S. Quasicapsulation of probiotics / I.S. Polyanskaya, V.L. Popova, L.G., Stoyanova, V.F. Semenikhina // Journal of Hygienic Engineering and Design. 2018. Т. 24. С. 31–38.
3. Полянская И.С. Нутрициологическая химия s-элементов / И.С. Полянская; М-во сельского хоз-ва РФ, ФГБОУ ВПО "Вологодская гос. молочнохозяйственная акад. им. Н.В. Верещагина". Вологда, 2011. – 139 с.

УДК 631.811.98

**СУБСТРАТНОЕ СТИМУЛИРОВАНИЕ PAL, КАК ПОДХОД К ПОЛУЧЕНИЮ
ВЫСОКОЛИГНИФИЦИРОВАННОГО СЫРЬЯ ИЗ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM
AESTIVUM* L.)****П.В. Федуреав, А.В. Рябова, А.В. Пунгин, Э.В. Токупова, Л.Н. Скрыпник***Балтийский федеральный университет им. И. Кантар, Калининград, Россия*

Введение. Одной из принципиальных сельскохозяйственных культур, как в нашей стране, так и во всем мире, является пшеница (*Triticum aestivum* L.). Данное растение характеризуется наличием прямостоячих полых стеблей, механическая поддержка которых обеспечивается, в том числе, фенольным полимером, лигнином.

Наряду с возможностью обеспечения механической поддержки осевых структур растения, лигнин, совместно с другими элементами клеточной стенки, выступает в качестве неспецифического фактора иммунитета. Таким образом, лигнин способен определять устойчивость растений не только со стороны инвазивных биотических факторов, но и со стороны меняющихся факторов среды. Было показано, что лигнин или лигнин-подобные фенольные полимеры откладываются в ответ на биотические и абиотические стрессы [1].

В дополнении к физиологическим функциям лигнина необходимо отметить, что лигнин также является ключевым ингредиентом сырья и биомассы растений. Лигнин обеспечивает биомассу с высокой плотностью энергии для пиролиза и прямого сжигания, а также является основным источником возобновляемых ароматических прекурсоров для химической промышленности. Лигнин может стать отличным альтернативным источником ароматических соединений и их производных.

Каноническим путем образования лигнина, является фенилаланин опосредованный метаболический путь. Лигнин синтезируется из ароматической аминокислоты l-фенилаланина (Phe), которая превращается, под действием фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), в циннамат. PAL является первым и ключевым регуляторным ферментом метаболизма фенилпропаноидов [2]. Однако, на сегодняшний день, показан дополнительный альтернативный путь синтеза лигнина через тирзин-аммиаклиазный путь, который является более энергетически эффективным. Вовлечение l-тирозина (Tyr) в лигнин-опосредованный метаболический путь, также осуществляется за счет PAL [3]. При этом стоит отметить, что такая активность показана только для злаковых растений [4,5].

Таким образом, перспективным способом увеличения уровня лигнина у злаковых растений является субстратное стимулирование ключевых ферментов синтеза данного фенольного полимера. Учитывая вышесказанное, целью данного исследования является оценка роли ароматических аминокислот фенилаланина и тирозина в накоплении лигнина у растений пшеницы (*Triticum aestivum* L.).

Материалы и методы. *Выращивание Triticum aestivum L. и дизайн эксперимента.* Пшеница (*Triticum aestivum* L.) сорта «Ванек» получена с семенной станции Министерства сельского хозяйства Калининградской области. Семена стерилизовали инкубацией в течение 2 ч в 10 % NaClO, затем не менее 10 раз промывали дистиллированной водой.

С целью исследования отдельного влияния тирозина и фенилаланина на метаболические процессы, растений *Triticum aestivum* на протяжении всего эксперимента выращивались на питательных средах, содержащих 500 мкМ соответствующей аминокислоты. Проростки в возрасте 3–4 дней пересаживали на жидкую, интенсивно аэрируемую питательную среду: 50 % раствор Хогланда. Контролем служили образцы, выращиваемые исключительно на питательной среде, без добавления ароматических аминокислот. Растения выращивали под люминесцентными лампами при плотности потоков квантов ФАР 200 мкмоль/ (м² с), 16-часовом фотопериоде и температуре +25 °С.

Пул анализов проводился по достижению растений возраста 30 дней (что соответствует 4, 5 стадии по шкале Фики). Для экспериментов использовались вегетативные фотосинтезирующие части растения, стебель и листья.

Анализ активность PAL и TAL. Экстракцию белков и кинетические анализы проводили аналогично тому, как описано Cheng и Breen [6]. Растительную ткань весом 0,2 г, быстро замораживали в жидком азоте. Далее пробу измельчали и промывали 1 мл ледяного ацетона, инкубировали полученную смесь при –20° С в течение 15 минут и центрифугировали при 16 000 g в течение 15 минут при 4 °С. Осадок экстрагировали осторожным вращением при 4 °С в присутствии 100 мМ боратного буфера. Через 1 час образцы центрифугировали, супернатант использовали в качестве экстракта растений в кинетических анализах.

Активность PAL количественно оценивали по продукции транс-коричной кислоты (ТСА), снимая спектры поглощения при 290 нм каждую минуту в течение 20 минут при 37° С, используя UV-3600, Shimadzu, Japan. Смесь для анализа содержала 61 мМ l-фенилаланин, 30 мМ натрий-боратный буфер (рН 8,8) и 75 мкл растительного экстракта в реакционном объеме 1 мл. Субстрат добавляли после 10-минутного периода предварительной инкубации при 37° С. Экстракт растений, предварительно инкубированный в буфере без субстрата, использовали в качестве холостого опыта перед каждым анализом [7].

Активность TAL определяли аналогичным образом, путем оценки продукции p-кумаровой кислоты (РСА) при длине волны 310 нм. 1 мл смеси для анализа содержал 1,9 мМ l-тирозина, 30 мМ натрий-боратного буфер (рН 8,8) и 75 мкл растительного экстракта. Температура и подготовка холостой пробы были идентичны анализу PAL [7].

Активность фермента выражали в единицах на мг белка. Одну единицу активности PAL определяли, как количество фермента, которое продуцировало 1 мкг коричной кислоты в час. Одну единицу активности TAL определяли, как количество фермента, которое продуцировало 1 мкг кумаровой кислоты в час.

Субстраты l-фенилаланин и l-тирозин, а также продукты их ферментативного превращения транс-коричной кислоты и p-кумаровой кислоты соответственно, использовались в качестве стандартов. Общее содержание белка оценивали методом Брэдфорда [8].

Анализ содержания лигнина. Определение содержания лигнина выполняли после соответствующей подготовки тканей растительных образцов. Необходимо удалить все УФ-поглощающие соединения (в первую очередь белки), чтобы избежать интерференции с максимумом поглощения для лигнина при 280 нм. Сухие образцы (0,3 г) гомогенизировали в присутствии 50 мМ калий-фосфатного буфера, после чего центрифугировали. Затем осадок несколько раз промывали и последовательно центрифугировали после каждой процедуры промывки: два раза в присутствии фосфатного буфера (рН 7,0), три раза в присутствии 1 % детергента Triton X-100, два раза с 1 М NaCl буфером с рН 7,0, два раза с дистиллированной водой и два раза с ацетоном. Осадок высушивали в сушильном шкафу (60 °С, 24 ч) и охлаждали в вакуумном эксикаторе. Полученное сухое вещество определяли, как фракцию клеточной стенки, не содержащую белков [9].

Образец клеточной стенки (20 мг) помещали в центрифужную пробирку и добавляли 0,5 мл 25 % ацетилбромид (об. / об. В ледяной уксусной кислоте), и инкубировали при 70° С в течение 30 мин. После полного разложения образец быстро охлаждали на ледяной бане, а затем смешивали с 0,9 мл 2 М NaOH, 0,1 мл 5 М гидроксилламин-HCl и ледяной уксусной кислоты, достаточным для полной солюбилизации экстракта лигнина. После центрифугирования (1400 × g, 5 мин) оптическую плотность супернатанта измеряли при 280 нм [10]. Результаты выражали в мг лигнина на г⁻¹ клеточной стенки.

Статистика. Все представленные значения являются средними по крайней мере для трех повторений. Уровень значимости был установлен равным $p \leq 0,05$. Статистический анализ данных проводили с использованием SigmaPlot 12.3 (Systat Software GmbH, Эркрат, Германия). Для проверки нормальности использовался тест Шапиро-Уилкса; Дополнительно экспериментальные данные проверялись на однородность дисперсии.

Все химические вещества, использованные в экспериментах, были аналитической чистоты, полученные из коммерческих источников. На протяжении всего эксперимента использовали дистиллированную воду. Рабочие стандартные растворы готовили (питательную среду, в частности) путем разбавления стоковых растворов.

Результаты. Наблюдалось достоверное ($p \leq 0.05$) увеличение активности PAL и TAL по сравнению с контролем, но только при нормировании результатов на соответствующие продукты ферментативного превращения (PAL на ТСА и TAL на РСА). Экспериментальные растения пшеницы сорта «Vanek» перенесенные на питательную среду, содержащую 500 мкМ фенилаланина и тирозина, и экспонированные в таких условиях в течении всего периода роста показали достоверно более чем двукратное увеличение активности PAL и TAL. Скорость вовлечения в метаболизм тирозина через тирозин-аммиаклазную активность PAL была несколько ниже (0,64 мкг РСА мг белка⁻¹ час⁻¹ у растений, экспонированных на тирозине, по сравнению с контрольными растения: 0,26 мкг РСА мг белка⁻¹ час⁻¹) чем скорость вовлечения в метаболизм фенилаланина посредством PAL (0,36 мкг ТСА мг белка⁻¹ час⁻¹ у растений, экспонированных на фенилаланине, по сравнению с контрольными растения: 0,33 мкг ТСА мг белка⁻¹ час⁻¹).

Выбранные методы позволили определить активность PAL/TAL. Выращивание растений в условиях постоянного экспонирования на средах, обогащенных ароматическими протеиногенными аминокислотами, приводило к достоверному ($p \leq 0.05$) повышению активности данных аммиаклиазных ферментов (рис 1).

Существует два основных этапа получения лигнина: биосинтез монолигнола, который запускается PAL, и полимеризация монолигнола посредством свободнорадикального сочетания (coupling), который обслуживается редоксактивными ферментами, и, в частности, POD [16].

Повышение активности ключевых ферментов: отвечающего за синтез лигниновых структур (PAL), приводило к достоверному увеличению уровня лигнина в клеточных стенках экспериментальных растений (рис. 2).

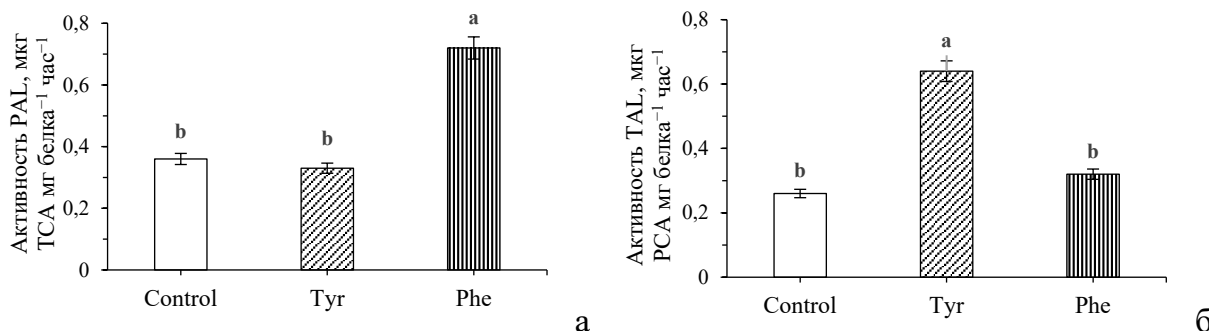


Рисунок 1. Активность PAL(a) и TAL(б) в образцах пшеницы, инкубированных на питательной среде с добавлением 500 мкМ фенилаланина и тирозина, соответственно. Столбцы, отмеченные разными буквами, показывают значительные различия при ($p \leq 0,05$) в соответствии с тестом Тьюки.

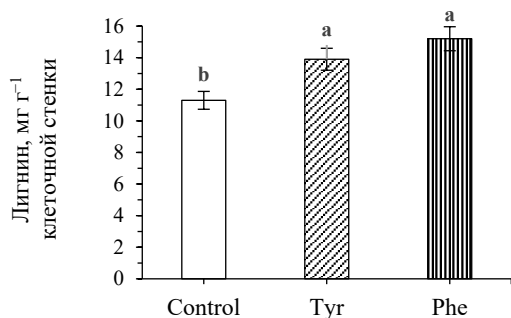


Рисунок 2. Содержание лигнина в образцах пшеницы, инкубированных на питательной среде с добавлением 500 мкМ фенилаланина и тирозина, соответственно. Столбцы, отмеченные разными буквами, показывают достоверные различия при ($p \leq 0,05$) в соответствии с тестом Тьюки.

Экспериментальные группы растений, экспонированные на питательных средах с добавлением аминокислот, эффикторов по отношению к PAL, демонстрируют достоверно ($p \leq 0,05$) более эффективное накопление лигнина на данной стадии онтогенеза (в среднем на 20 % по сравнению с контролем). Стоит отметить, что 4–5 фаза развития растений по шкале Фики характеризуется активной закладкой вторичной клеточной стенки (определяемой наличием лигнина в своей структуре) и интенсифицирование данного процесса может стать отличным заделом для успешного развития растения на более поздних стадиях.

Дискуссия. Лигниновые структуры являются продуктом фенилпропаноидного пути, и интенсификация данного метаболического пути через PAL может дополнительно приводить к биосинтезу целого ряда фенольных соединений. Эта

группа физиологически активных соединений может быть задействована, как в защите растений, так и в обеспечении адекватного редокс-баланса растительной клетки. К таким соединениям относятся: фитоалексины, стильбены, кумарины и флавоноиды [11, 12].

Поиск путей интенсификации процесса лигнификации у злаковых растений остается весьма актуальным запросом со стороны наукоемкого сельского хозяйства и биотехнологии. С одной стороны, лигнификацию стоит рассматривать, как механизм повышения устойчивости злаковых культур, которые, чаще всего, выращивают как монокультуры, а с другой стороны, как источник перспективного сырья для химической промышленности.

Заключение. В данном исследовании было проанализировано влияние ароматических протеиногенных аминокислот (фенилаланина и тирозина) на уровень лигнина клеточной стенки растений *Triticum aestivum* L. При этом наблюдалось достоверное ($p \leq 0.05$) увеличение активности ферментов PAL, TAL и POD в образцах пшеницы, экспонированных на фенилаланин- и тирозин-обогащенных средах. Показано 20 % увеличение уровня лигнина у экспериментальных растений по сравнению с контролем.

Литература

1. Sattler S., Funnell-Harris D. Modifying lignin to improve bioenergy feedstocks: strengthening the barrier against pathogens? //Frontiers in Plant Science. – 2013. – Vol. 4. – P. 70.
2. Kong J.Q. Phenylalanine ammonia-lyase, a key component used for phenylpropanoids production by metabolic engineering //RSC advances. – 2015. – Vol. 5. – №. 77. – P. 62587–62603.
3. Feduraev P. Skrypnik L., Riabova A., Pungin A., Tokupova E., Maslennikov P., Chupakhina G. Phenylalanine and tyrosine as exogenous precursors of wheat (*triticum aestivum* L.) secondary metabolism through PAL-associated pathways //Plants. – 2020. – Vol. 9. – №. 4. – P. 476.
4. Maeda H.A. Lignin biosynthesis: Tyrosine shortcut in grasses //Nature plants. – 2016. – Vol. 2. – №. 6. – P. 1–2.
5. Barros J., Serrani-Yarce J.C., Chen F., Baxter D., Venables B.J., Dixon R.A. Role of bifunctional ammonia-lyase in grass cell wall biosynthesis //Nature Plants. – 2016. – Vol. 2. – №. 6. – P. 1–9.
6. Cheng G.W., Breen P.J. Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit //Journal of the American Society for Horticultural Science. – 1991. – Vol. 116. – №. 5. – P. 865–869.
7. Rosler J., Krekel F., Amrhein N., Schmid, J. Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity //Plant physiology. – 1997. – Vol. 113. – №. 1. – P. 175–179.
8. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding //Analytical biochemistry. – 1976. – Vol. 72. – №. 1–2. – P. 248–254.
9. Moreira-Vilar F.C., Siqueira-Soares R.D.C., Finger-Teixeira A., Oliveira D.M.D., Ferro A.P., da Rocha, G.J., Ferrarese-Filho O. The acetyl bromide method is faster, simpler and presents best recovery of lignin in different herbaceous tissues than Klason and thioglycolic acid methods //PloS one. – 2014. – Vol. 9. – №. 10.
10. Barnes W.J., Anderson C.T. Acetyl bromide soluble lignin (ABSL) assay for total lignin quantification from plant biomass //Bio Protoc. – 2017. – Vol. 7. – №. 2149.
11. Lozovaya V.V., Lygin A.V., Zernova O.V., Ulanov A.V., Li S., Hartman G.L., Widholm J.M. Modification of phenolic metabolism in soybean hairy roots through down regulation of chalcone synthase or isoflavone synthase //Planta. – 2007. – T. 225. – №. 3. – C. 665–679.
12. Fraser C.M., Chapple C. The phenylpropanoid pathway in Arabidopsis //The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists. – 2011. – Vol. 9.

УДК 57.084.5

ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**Н.А. Фокина, Н.Ю. Селиванов*, Г.Т. Урядова, Л.В. Карпунина**

Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова, г. Саратов, Россия

*Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов, Россия

В последние годы экзополисахариды (ЭПС) бактериального происхождения находят все большее применение в различных отраслях народного хозяйства (медицине, фармакологии, сельском хозяйстве и др.). В связи с этим особое внимание уделяется поиску продуцентов ЭПС среди бактерий и изучению влияния этих биополимеров на организм животных.

Изучали влияние ЭПС молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* В-1662 и *Streptococcus thermophilus*, выделенные нами ранее [1,2] на организм животных (крыс) и сельскохозяйственной птицы (цыплята кросса Хаббард ИЗА Ф-15 яичного направления). Экзополисахариды *L. lactis* В – 1662 и *S. thermophilus* состояли только из нейтральной фракции с молекулярными массами 10 кДа и 20 кДа соответственно. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии было показано, что ЭПС *L. lactis* В – 1662 имеет в составе глюкозу и ксилозу в соотношении 1:1, а также следовые количества рамнозы (5,8 %), а *S. thermophilus* – рамнозу, галактозу и маннозу в соотношении 1:2:1 с присутствием следов глюкозы (4,4 %). Относительная вязкость 10 % раствора ЭПС *L. lactis* В – 1662 и *S. thermophilus* составила 1,3 мм²/с и 1,23 мм²/с соответственно.

Было показано, что оба ЭПС обладали ранозаживляющими свойствами с преимуществом ЭПС *S. thermophilus* [3]. Так, у крыс, леченых ЭПС *S. thermophilus* сокращение площади ожога происходило уже на 1 сутки, а у *L. lactis* В-1662 – на 3 сутки. К 23 суткам в этих группах животных наступало окончательное заживление ожога степени IIIa с полным восстановлением кожно-шерстного покрова. В контрольной группе крыс процесс восстановления ожоговой раны завершался на 28 сутки.

Положительное влияние оказывал ЭПС *S. thermophilus* на организм сельскохозяйственной птицы, увеличивая массу тела и количество молочнокислых бактерий [4]. Введение в рацион кормления опытным цыплятам ЭПС способствовало увеличению их массы тела к двухмесячному возрасту на 8,2 % и повышению молочнокислых бактерий через 4 месяца в 4,2 раза по сравнению с контрольной группой.

Полученные результаты по изучению свойств экзополисахаридов *L. lactis* В – 1662 и *S. thermophilus* открывают перспективы их применения в медико-биологической практике, сельском хозяйстве.

Литература

Фокина, Н.А. Выделение экзополисахарида из *Lactococcus lactis* при различных условиях культивирования / Н.А. Фокина, Г.Т. Урядова, Л.В. Карпунина // Аграрный научный журнал. – 2016. – № 12. – С. 40–42.

Фокина, Н.А. Влияние условий культивирования на продукцию экзополисахарида *Streptococcus thermophilus* / Н.А. Фокина, Г.Т. Урядова, Л.В. Карпунина // Изв. Саратов. ун-та. Нов.сер. Сер. Химия. Биология. Экология. – 2018. – Т. 18, вып. 2. – С. 179–181.

Фокина, Н.А. Действие экзополисахаридов молочнокислых бактерий на процесс заживления ожогов у крыс / Н.А. Фокина, Г.Т. Урядова, А.Ю. Тяпкин [и др.] // Ульяновский медико-биологический журнал. – 2018. – № 4. – С. 117–124.

Фокина, Н.А. Влияние бактериального экзополисахарида на морфологические и микробиологические показатели у птицы / Н.А. Фокина, Г.Т. Урядова, Л.В. Карпунина // Таврический вестник аграрной науки. – 2019. – № 4(20). – С. 117–123.

КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ И ИОННЫЙ ОБМЕН В СИСТЕМЕ ГЛУТАМИНОВАЯ КИСЛОТА – ИОН МЕТАЛЛА – ИМИНОКАРБОКСИЛЬНЫЙ ИОНИТ

А.В. Астапов, *Ю.С. Перегудов, *Л.П. Бондарева, П.А. Поздняков

Военно-воздушная академия им. профессора Н.Е. Жуковского и Ю.А. Гагарина, Воронеж, Россия

*Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Сложность системы «комплексообразующий ионообменник – аминокислота – катионы металлов» заключается в наборе гетерогенных сорбционных и ряда сопутствующих равновесий, сопровождающих целевой процесс. В присутствии низкомолекулярного лиганда катион металла может распределяться между ионообменником и раствором, образуя комплексные соединения в обеих фазах. При определенных условиях возможно образование смешаннолигандных соединений в сорбенте.

При разработке технологических ионообменных процессов, связанных с подобными системами необходимо иметь представление о составе и устойчивости соединений, образующихся в фазе ионита. Для количественного описания сорбционных процессов в подобных системах необходимо определение термодинамических параметров ионного обмена при различных температурах и комплексообразования.

Целью данной работы являлось изучение взаимодействий полиамфолита АНКБ-35 и комплексов меди и никеля с глутаминовой кислотой для установления возможности разделения этих комплексов, а также очистки аминокислот от примесей ионов переходных металлов методом ионообменной хроматографии.

Для определения состава обменивающего комплексного иона получены изотермы сорбции меди (II) и никеля (II) из растворов их комплексов с глутаминовой кислотой, а также из нитратных растворов при 298, 318 и 338 К. Полученные зависимости имеют вид изотерм Ленгмюра. Отсутствие перегибов свидетельствует о том, что поглощение ионов меди и никеля протекает за счет взаимодействия с функциональными группами ионита, то есть ионного обмена. Анализ данных изотерм в координатах, предложенных Ю.А. Кокотовым, позволил установить, что в фазу ионообменника входит однозарядный комплексный ион металла соединенный с аминокислотным анионом $[MeGlu]^\pm$.

После установления структуры сорбируемых ионов были вычислены равновесные характеристики ионного обмена, представленные в таблице 1.

Таблица 1. Равновесные характеристики ионного обмена $MeL^\pm$ на полиамфолите АНКБ-35

Сорбируемый ион	Температура, К	Константа обмена	ΔG° , кДж/моль	ΔH° , кДж/моль	$T\Delta S^\circ$, кДж/моль
$[CuGlu]^\pm$	298	$31,3 \pm 0,7$	-8,53	19,29	27,82
	318	$62,2 \pm 2,2$	-10,92		30,21
	338	$78,0 \pm 3,1$	-12,24		31,53
$[NiGlu]^\pm$	298	$14,7 \pm 0,5$	-6,66	20,88	27,54
	318	$25,8 \pm 1,1$	-8,59		29,47
	338	$39,8 \pm 2,3$	-10,35		31,23

Значения равновесных характеристик обмена комплексных ионов на хелатообразующем ионите, показывают, что данные процессы являются самопроизвольными и сопровождаются увеличением энтропии. Повышение температуры улучшает сорбцию комплексных ионов, не изменяя при этом соотношения селективности.

УДК 664.22/27

ТЕХНОЛОГИЯ КОМПЛЕКСНОЙ УТИЛИЗАЦИИ ОТХОДОВ ПЕРЕРАБОТКИ БОБОВЫХ КУЛЬТУР С ПОЛУЧЕНИЕМ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ И БИОТОПЛИВА**Е.В. Ожимкова, М.Г. Сульман***Тверской государственный технический университет, Тверь, Россия*

Для теоретического обоснования выбора способов получения энергоресурсов из отработанной биомассы бобовых необходимо учитывать основные мировые тенденции развития биоэнергетики. Все производители биотопливных продуктов ориентированы на продукты с добавленной стоимостью и специализированные рынки сбыта, для которых часто многофункциональные характеристики продукции играют решающую роль для обоснования стоимости конечного продукта. Комплексный переход от нефтехимических топлив к устойчивому использованию биотоплив имеет следующие обоснования [1–2]:

- (1) снижение запасов нефти, газа, угля и других полезных ископаемых;
- (2) развитие и диверсификация биовозобновляемых источников энергии;
- (3) необходимость решения глобальных климатических проблем;
- (4) необходимость сокращения выбросов парниковых газов;
- (5) защита природных экосистем в зонах добычи нефти, угля и т. д.

(6) стимулирование развития современных экологических сельскохозяйственных производств и переход сельскохозяйственных предприятий на самообеспечение (хотя бы частичное) возобновляемыми источниками энергии, а в перспективе – к формированию энергонезависимого сельхозпроизводства.

Биоконверсия лингноцеллюлозной биомассы в биоэтанол является одной из приоритетной областью научных исследований. Лигноцеллюлозный этанол производится из недорогого и широкодоступного сырья, которое может снизить зависимость от ископаемого топлива. В настоящее время производство биоэтанола является наиболее динамично развивающимся сектором биотопливной отрасли. Согласно оценкам экспертов [3], к 2030 году выпуск биотоплива в мире составит 150 млн т при ежегодном приросте производства 7–9 %. При этом преимущество будет иметь биоэтанол, т. к. себестоимость его производства снижается быстрее, чем себестоимость производства биодизеля.

Разработка технологий комплексной переработки семян бобовых культур может обеспечить получение новых пищевых добавок для повышения качества и биологической полноценности продуктов питания. Использование ультразвуковой экстракции обеспечит более высокий выход (по сравнению с существующими технологиями) востребованных белковых комплексов и крахмалов из семян бобовых. Кроме того, после обработки ультразвуком в остатках растительной биомассы появляются четко выраженные изменения в структуре биоматериала, что позволит использовать отработанную биомассу для получения биоэтанола.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19–08–00336.

Литература

- A critical review of the effects of pretreatment methods on the exergetic aspects of lignocellulosic biofuels / S. Soltaniana [etc] // Energy Conversion and Management. – 2020. – Vol. 212, Is.15. – P. 112792.
- Lignocellulose: A sustainable material to produce value-added products with a zero waste approach. A review / A. Arevalo-Gallegosa [etc] // International Journal of Biological Macromolecules – 2017. – Vol. 99. – P. 308–318.
- Lignocellulosic biomass for bioethanol: Recent advances, technology trends, and barriers to industrial development. Review article / T. Su [etc] // Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry – 2020 – Vol. 24 – P. 56–60.

БИОТЕХНОЛОГИЯ КЕФИРНОГО ПРОДУКТА

О.И. Долматова

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Одним из наиболее популярных кисломолочных продуктов в настоящее время является кефир: на его долю приходится 2/3 российского производства. Маркетинговые исследования потребителей показывают, что половина опрошенных приобретают кефир более одного раза в неделю, около 15 % из них выбирают продукт с наполнителями [1–3]. Таким образом, разработка технологии кефирного продукта является актуальной.

Кисломолочные продукты относят к продуктам функционального назначения. Повышенная пищевая и биологическая ценность в них достигается внесением разных вкусовых компонентов.

В состав кефирного продукта входит молоко цельное, молоко обезжиренное, культура бактериальная концентрированная заквасочная и шрот семян тыквы. Анализ литературных данных показал, что производство кефирного продукта с указанным выше рецептурно-компонентным составом планируется впервые.

Кефирный продукт вырабатывали по традиционной схеме. Отобранное по качеству молоко нормализовали по массовой доле жира и сухих веществ, вносили компонент-обоганитель. Пастеризацию проводили при температуре 85–87 °С с выдержкой 10–15 мин или при (92±2) °С с выдержкой 2–8 мин. При таких температурных режимах обработки изменяются физико-химические свойства молока: денатурирует более 95 % сывороточных белков. При сквашивании молока они коагулируют вместе с казеином, образуя прочный сгусток, задерживающий отделение сыворотки. Далее молочно-растительную смесь гомогенизировали. Затем охлаждали до температуры заквашивания 33±1 °С и вносили бактериальную культуру концентрированную заквасочную, Profiline® KF 40.11 D Golden Line. После заквашивания смесь перемешивали в течение 15 мин. Продолжительность сквашивания составила 7±0,5 ч. Окончание сквашивания определяли по образованию достаточно прочного сгустка, а также по кислотности 75–85 °Т. Далее продукт охлаждали ледяной водой в течение 30–60 мин, а затем перемешивали. По достижении сгустком однородной консистенции прекращали перемешивание. Молочнокислый процесс с понижением температуры ослабевает, протекает медленно, и постепенно достигается оптимальная кислотность для данного вида продукта, а при 8 – 10° С кислотообразование практически прекращается. Происходит также набухание белков, что ведет к связыванию и уменьшению свободной влаги и уплотнению сгустка. Кефирный продукт направляли на фасование.

В условиях лаборатории кафедры Технологии продуктов животного происхождения ФГБОУ ВО «ВГУИТ» были выработаны опытные образцы кефирного продукта с дозировкой шрота семян тыквы от 3 до 6 %. В образцах с добавлением растительного компонента в количестве 4 и 5 % установлена самая прочная связь со сгустком.

Продукт обладает способностью улучшать и корректировать здоровье человека при регулярном его потреблении, за счет входящих в него компонентов.

Литература

1. Голубева Л.В., Долматова О.И., Иванцова М.И. Кисломолочный продукт функционального назначения // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. – 2016. – № 2 (68). – С. 148–152.
2. Новый кисломолочный продукт с вкусовыми компонентами растительного происхождения / Голубева Л.В., Долматова О.И., Пожидаева Е.А., Гребенкина А.Г., Зыгалова Е.И., Медко Ю.Г. // Пищевая промышленность. – 2016. – № 12. – С. 18–20.
3. Долматова О.И., Пожидаева Е.А., Гребенкина А.Г. Использование экстракта дикорастущих трав при производстве кисломолочного напитка // Пищевая промышленность. – 2017. – № 12. – С. 26–28.

УДК 579.852+579.64

**ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РОСТСТИМУЛИРУЮЩИХ РИЗОБАКТЕРИЙ
PAENIBACILLUS POLYMYXA В СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ****И.В. Егоренкова***Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, Россия*

Paenibacillus polymyxa – ростстимулирующие ризобактерии (PGPR), обнаруженные в ризосфере различных видов растений, в том числе агрономически значимых [1, 2]. Продемонстрировано положительное влияние обработки *P. polymyxa* на рост, развитие и защитные реакции растений в условиях *in vitro* и *in situ*, которое связывают с такими характеристиками *P. polymyxa* как азотфиксация, синтез антибиотиков, литических ферментов и фитогормонов, фосфатсолюбилизация, увеличение пористости почвы и биоконтроль [2–4]. Обработка *P. polymyxa* семян, листьев или корней растений значительно уменьшала симптомы заболевания пшеницы, клубники, томатов и картофеля, вызванные комплексом фитопатогенов [2–4]. На основе *P. polymyxa* и их метаболитов запатентованы и нашли применение коммерческие препараты для сельского хозяйства [3]. Внедрение микробных препаратов получает все большую популярность, поскольку сокращает применение минеральных удобрений и пестицидов и способствует сохранению плодородия почвы.

С использованием микробиологических и биохимических методов в условиях выращивания на агаризованных и жидких питательных средах нами проведена сравнительная оценка штаммов *P. polymyxa*: ССМ 1459^T, ССМ 1460, ССМ 1465, 88А и 92 – продуцентов экзополисахаридов, по способности к солюбилизации труднорастворимых фосфатов, продукции фитогормонов и сидерофоров. Зафиксирована высокая фосфатмобилизующая активность исследуемых штаммов *P. polymyxa*, возрастающая в ряду: 92, ССМ 1459^T=88А, ССМ 1460=ССМ 1465. Содержание подвижных форм фосфора превышало таковое в контроле в 1.6–6.0 раз в зависимости от штамма и составляло через 3 суток до 80 мкг/мл. Солюбилизация Са₃(РО₄)₂ сопровождалась активным ростом бактерий и снижением pH в среде, и происходила, вероятно, за счет выделения бактериями органических кислот. Методом обращенно-фазовой ВЭЖХ выявлена способность штаммов *P. polymyxa* к продукции ИУК. При культивировании в течение 3 суток на жидкой питательной среде с добавлением L-триптофана *P. polymyxa* продуцировали ИУК в диапазоне 1.6–2.2 мкг/мл, что сравнимо с продукцией фитогормона в аналогичных условиях эксперимента другими PGPR-бактериями. Результаты, полученные с помощью универсального CAS-метода, химических анализов и сканирования образцов в диапазоне длин волн 380–600 нм, позволяют предположить, что исследуемые нами штаммы *P. polymyxa* в условиях голодания по железу продуцируют сидерофоры гидроксаматового типа.

Полученные результаты и обнаруженная нами ранее ростстимулирующая активность *P. polymyxa* в отношении пшеницы [5] позволяют прогнозировать перспективность использования данных штаммов *P. polymyxa* в качестве биопрепаратов для стимулирования растительного роста.

Литература

- Hao T.Y., Chen S.F. Colonization of wheat, maize and cucumber by *Paenibacillus polymyxa* WLY78 // PLoS ONE. – 2017. – Vol. 12. № 1. – e0169980. doi.org/10.1371/journal.pone.0169980.
- Grady E.N., MacDonald J., Liu L., Richman A., Yuan Z. – C. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review // Microb. Cell Fact. – 2016. – Vol. 15. doi. 10.1186/s12934-016-0603-7.
- Rybakova D., Cernava T., Köberl M., Liebminger S., Etemadi M., Berg G. Endophytes-assisted biocontrol: novel insights in ecology and the mode of action of *Paenibacillus* // Plant Soil. – 2016. – Vol. 405. – P. 125–140.
- Luo Y., Cheng Y., Yi J., Zhang Z., Luo Q., Zhang D., Li Y. Complete genome sequence of industrial biocontrol strain *Paenibacillus polymyxa* HY96-2 and further analysis of its biocontrol mechanism // Front Microbiol. – 2018. – Vol. 9. – P. 1520. doi:10.3389/fmicb.2018.01520.
- Егоренкова И.В., Трегубова К.В., Коннова С.А., Бугреева Л.В., Игнатов В.В. Влияние экзополисахаридов бактерий *Paenibacillus polymyxa* 1465 на рост и защитные реакции пшеницы // Известия Саратовского университета. Сер. Химия. Биология. Экология. – 2016. – Т. 16. – С. 414–420.

ТЕНЗИОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД АНАЛИЗА БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ ЖИВОТНЫХ: НАУКА И ПРАКТИКА

С.Ю. Зайцев¹, О.А. Воронина¹, С.Л. Белопухов²

¹ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, Дубровицы, Россия

² РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, Россия

Важным и актуальным является развитие инновационных технологий в области биохимии и биотехнологии, мониторинга здоровья животных, качества продуктов животного происхождения и т. п. Одним из направлений реализации данного подхода является комплексный анализ биологических жидкостей животных и модельных систем методом межфазной тензиометрии.

1. Главным направлением развития биохимических и физико-химических методов анализа биологических жидкостей животных является совершенствование технологии определения параметров динамического поверхностного натяжения (ДПН) этих жидкостей, основанной на методах и подходах межфазной тензиометрии [1–3]. Среди биологических жидкостей одной из важнейших является кровь, т. к. на содержании компонентов в ней отражаются все метаболические процессы организма. Именно определение параметров ДПН и их корреляций с биохимическими показателями крови (белками, липидами, углеводами и другими) определяет физиолого-биохимический статус животных [1–3], в частности свиней породы дюрок и гибридов на ее основе, является главным результатом выполнения проекта РНФ № 20–16–00032 в 2020–2021 гг.

2. Другим направлением является измерение ДПН дисперсий липидов с наночастицами (НЧ). Такой анализ является важным фактором развития как научных, так и инженерно-технических систем знаний в области биохимии мембран, биотехнологии и супрамолекулярной химии. Как известно, в небольших концентрациях (50 мкг/л) серебро безопасно для живого организма, но проявляет разрушительное действие по отношению к большинству бактерий и вирусов. Важной задачей является как разработка нетоксичных антимикробных препаратов на основе наночастиц серебра (НЧAg), сохраняющих свои бактерицидные свойства и стабильность, так и выяснение механизмов взаимодействия НЧAg с клетками и тканями живого организма. Целью работы было изучение влияния заданных концентраций НЧAg на размер частиц и ДПН модельных систем, полученных на основе неочищенного яичного фосфатидилхолина и холестерина. В работе детально изучены смеси из следующих липидов: PCe1 – фосфатидилхолин, Хол – холестерол. Показано, что под действием средних концентраций НЧAg (до 0,3–0,5 отн. ед.) в пробах с PCe1 происходят существенные изменения размера частиц в смеси. Причем, в смесях Хол с PCe1 добавка НЧAg даже в низкой концентрации (0,01 отн. ед.) уже вызывает уменьшение среднего диаметра частиц в 1,5 раза. Показано, что присутствие достаточно крупных частиц НЧAg (при временах «существования поверхности» от 0,5 до 5 с) даёт более высокие показатели ДПН, а изменение размера частиц приводит к изменениям ДПН: увеличение размера – повышение ДПН, уменьшение размера – снижение ДПН. На равновесные значения ДПН, по-видимому, влияет присутствие в пробе частиц НЧAg разного размера и их соотношение. Важно, что изучение взаимодействия НЧAg с природными веществами, такими как фосфолипиды, полисахариды, белки и пептиды, имеет большое фундаментальное и практическое значение.

Работа по части 1 выполнялась при финансовой поддержке Российского научного фонда (РНФ грант № 20–16–00032), по части 2 – при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19–03–00717).

Литература

1. Зайцев С.Ю. Тензиометрический и биохимический анализ крови животных: фундаментальные и прикладные аспекты. Монография. М.: «Сельскохозяйственные технологии», 2016. 192 с.
2. Zaitsev S. Yu. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2016, 235, 201–213.
3. Zaitsev S. Yu., Bogolyubova N.V., Zhang X., Brenig B. *PeerJ*. 2020, 8, e8997.
4. Zaitsev S. Yu., Savina A.A., Zaitsev I.S. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2019, 272, 1–14.
5. Zaitsev S. Yu., Savina A.A., Garnashevich L.S., Tsarkova M.S., Zaitsev I.S. *BioNanoSci*. 2019, 9, 773–777.

УДК 543.066

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ МОЛОКА КАК БИОМАРКЕРОВ ПРИ КОНТРОЛЕ СОСТАВА МОЛОЧНЫХ И МЯСНЫХ ПРОДУКТОВ**Е.А. Зверева, Н.И. Смирнова, О.Д. Гендриксон, А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев***Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр Фундаментальные основы биотехнологии РАН, Москва, Россия*

Достоверная информация о составе продуктов питания является важным компонентом обеспечения пищевой безопасности. Многоступенчатость технологических процессов производства и мультикомпонентный состав конечных продуктов создают возможности для фальсификаций, которые могут быть связаны, например, с заменой основного сырья белок-содержащими добавками (соя, коллаген, белки молока и др.) или введением компонентов, не предусмотренных технологией. Для контроля состава на всех стадиях производства необходимы эффективные методы анализа, позволяющие идентифицировать отдельные ингредиенты. Решить эту задачу позволяет микропланшетный иммуноферментный анализ (ИФА), который обеспечен серийно производимым недорогим оборудованием и предоставляет количественные данные о содержании биомаркеров.

Разработаны тест-системы для детекции ряда основных белков молока: бета-лактоглобулина, альфа-лактальбумина, бычьего сывороточного альбумина. Интактные молочные белки и их гидролизаты широко используются в пищевой промышленности. Применение молочного сырья в качестве наполнителя при производстве мясной продукции (вареных колбас, сосисок, сарделек и др.) позволяет снизить себестоимость и улучшить органолептические свойства готового продукта. Поскольку молочные белки могут быть причиной сильных аллергических реакций, необходимость достоверной информации об их наличии в готовом мясном продукте не вызывает сомнения.

Для проведения анализа был реализован конкурентный ИФА, позволяющий детектировать белковые антигены, которые подверглись денатурации или частичной фрагментации в ходе технологической обработки. Анализ основан на конкурентном взаимодействии специфических антител с антигеном, потенциально содержащемся в тестируемой пробе, и антигеном, иммобилизованным в лунках микропланшета. Для достижения максимальной чувствительности анализа были оптимизированы концентрации антигенных белков при иммобилизации, концентрации специфических поликлональных антител, продолжительности стадий анализа. Пределы обнаружения бета-лактоглобулина, альфа-лактальбумина и бычьего сывороточного альбумина в оптимизированных условиях ИФА составила 6,8, 34 и 44 нг/мл, соответственно, а диапазоны определяемых концентраций – 23–1520, 80–2570 и 110–1670 нг/мл, соответственно. Показана возможность уменьшения времени проведения анализа со 150 до 90 мин посредством сокращения продолжительности конкурентной стадии и стадии взаимодействия с антивидовыми антителами, меченными пероксидазой. Потерь в чувствительности и амплитуде сигнала при этом не наблюдалось.

Разработанные тест-системы были апробированы для определения целевых маркеров в молочных и мясных продуктах. Так, например, ИФА бета-лактоглобулина использовали для характеристики остаточной антигенности молока и молочных продуктов. Молочные образцы перед тестированием подкисляли 2 М HCl, инкубировали при комнатной температуре и центрифугировали при 13000 g. Относительная погрешность анализа составила 2,2 %. Пробоподготовка мясных продуктов включала измельчение, экстракцию 50 мМ К-фосфатным буфером, pH 7,4, содержащем 0,1 М NaCl, 0,05 % Тритон X-100, и центрифугирование при 7200 g. Показано, что разработанные методики позволяют выявлять бета-лактоглобулин, альфа-лактальбумин и бычий сывороточный альбумин в молочных и мясных продуктах, прошедших все стадии технологических обработок.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (ИФА молочных продуктов) и Российского научного фонда, грант № 19-16-00108 (ИФА мясных продуктов).

ПРИМЕНЕНИЕ SWOT-АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНКУРЕНТОСПОСОБНОСТИ ПРОДУКЦИИ НА ПРЕДПРИЯТИИ ХЛЕБОПЕКАРНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

И.С. Косенко

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Хлебобулочные изделия являются продуктами первой необходимости. Хлеб является стратегически важным товаром, потому что играет большую роль в обеспечении продовольственной независимости и безопасности страны. Значит, маркетинговая деятельность предприятий должна проводиться с учётом государственных интересов.

Стратегический маркетинг возник в результате развития теорий маркетинга и менеджмента. Сейчас его рассматривают как концепцию управления предприятием в условиях рынка. Само понятие стало использоваться довольно недавно – в конце 80х – начале 90 хгг.

Существует несколько точек зрения трактования сути стратегического маркетинга. Первая, более широкая, которая имеет в основе подходы из работ по философии, социологии, менеджменту и т. д. С функциональной точки зрения общие проблемы потребителей уходят на второй план, на первый же ставят заостренное внимание к маркетинг-миксу. Третья говорит о том, что процесс построения стратегии маркетинга это и есть стратегический маркетинг.

Стратегия маркетинга должна состоять из следующих элементов: формулировки масштаба деятельности, целей и задач, схемы распределения ресурсов, источники и способы достижения конкурентного преимущества, возможности использования синергетических эффектов.

Пять основных этапов разработки стратегии маркетинга можно представить в виде схемы (рис. 1).

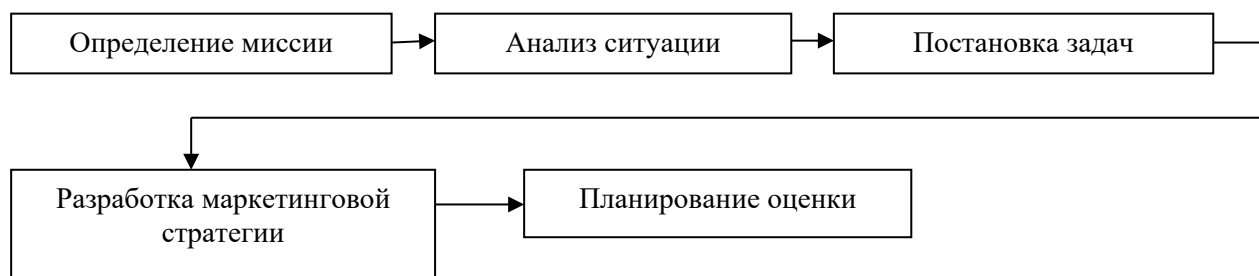


Рис. 1 Этапы стратегического маркетинга

Суть первого этапа состоит в формулировании причины работы предприятия и возможности получения пользы потребителями. Так, например, миссия хлебозавода может звучать: хлеб, отвечающий самым высоким культурным и вкусовым запросам клиента.

На второй стадии выявляют слабые и сильные стороны в работе, возможности и угрозы со стороны конкурентов. Все это поможет понять какие необходимы ресурсы и какие опасности можно ожидать. Сильные и слабые стороны составляют внутренние факты, возможности и угрозы возникают с наружной сферы предприятия.

Дальше необходимо отчетливо определить цели и задачи. Обычно их выражают в виде терминов: продажи, доход, прибыль и т. д. Каждая задача должна иметь временные рамки. Правильная постановка задач помогает правильно принять решения и оценить прогресс.

Шаг четыре – создание стратегии. При разработке стратегии учитывают результаты предыдущих этапов, т. е. тенденции развития спроса и внешней маркетинговой среды, положение и характерные черты конкурентной борьбы на рынке, управленческие ресурсы и возможности фирмы, а также цели и задачи. Проводится выбор группы потребителей, которые могут быть заинтересованы в этой продукции. Специальный отдел изучает возможные тактики внедрения стратегии.

На последнем этапе решают как, кем и когда будет контролироваться данная стратегия.

Исследование возможности применения некоторых методов разработки стратегии маркетинга для современных предприятий, работающих на российском продовольственном рынке было осуществлено на рынке хлебобулочных товаров Воронежской области, а конкретно на примере АО «Хлебозавод № 7».

В 2017 году на АО «Хлебозавод № 7» от отдела продаж отсоединили отдельное подразделение – маркетинговый отдел. Основная цель, поставленная перед отделом маркетинга – увеличение объемов продаж хлебобулочной продукции не менее, чем на 20 %, увеличение прибыли не менее, чем на 15 % к 2021 году.

Оценка эффективности деятельности службы маркетинга осуществляется на основании главных критериев – фактическое поступление денежных средств на счёт предприятия в конкретный период. Несмотря на то, что такая оценка не в полной мере отражает цели и задачи, стоящие перед службой маркетинга, на АО «Хлебозавод № 7» это стало основными показателями. Анализ деятельности 2018 г. и первой половины 2019 г. показал, что заметных изменений ни в объемах производств, ни в прибыли отмечены не были.

После оценки производства, финансов, человеческих ресурсов и маркетинга был определен уровень маркетингоориентированности предприятия, который показал, что роль деятельности отдела маркетинга ограничена. Это значит, что полномочия, делегированные данному подразделению, намного ниже, чем его реальные возможности влияния на работу организации в целом и производственные процессы в частности.

Следует отметить, что наиболее прогрессивными, является ситуация, при которой потребитель выполняет функцию контроля через интегрирующую функцию маркетинга, однако в случае АО «Хлебозавод № 7» данное положение не наблюдается. В сложившейся ситуации нет возможности говорить о реализации принципов стратегического маркетинга. Работа маркетингового отдела в такой ситуации сводится обычно к проведению рекламных акций, разработке буклетов, исследованию цен конкурентов и поиску новых точек сбыта. При этом цель, поставленная перед отделом маркетинга, обычно не бывает достигнута в связи с отсутствием рычагов влияния на остальные структурные подразделения.

Анализ деятельности АО «Хлебозавод № 7» показал, что, несмотря на созданный 2 года назад отдел маркетинга, конкурентоспособность продукции, выпускаемой на предприятия, а сама торговая марка не узнаваема. В связи с этим, необходимо разработать комплекс маркетинговых мероприятий, направленных на повышение показателя. Рассмотрим для этого конкретно каждый этап разработки стратегии маркетинга.

В первую очередь необходимо определить миссию, для этого нужно учесть такие факторы: забота о покупателе, уникальность, однозначность, запоминаемость, реалистичность, преимущества. После того как были оценены эти факторы определилась внешняя и внутренняя направленность миссии. Для АО «Хлебозавод № 7» это:

- Назначение организации для внешнего мира: выпуск хлебобулочной продукции, отвечающей запросам и требованиям потребителей;
- Назначение организации для сотрудников: реализация своих идей и амбиций;
- Девиз организации: работаем по максимуму.

Из всего вышесказанного можно четко определить миссию, которая звучит так: Мы существуем ради обеспечения и удовлетворения населения в нужных хлебобулочных изделиях высокого качества.

На второй стадии необходимо определить внутреннюю и внешнюю среду предприятия. Стратегия организации должна строиться на том, что она делает хорошо, то есть на сильных сторонах и конкурентных превосходствах, а не на ее недостатках, организационных и конкурентных слабостях. Сильные и слабые стороны АО «Хлебозавод № 7» приведены в таблице 1.

Угрозы и возможности, которые представляют собой внешнюю среду, представлены в таблице 2.

Определив угрозы, возможности, а также сильные и слабые стороны переходим к постановке целей и задач. Цель – это окончательное положение, требуемый итог, которого старается достичь любая организация. Цели предприятия должны обладать рядом характеристик, которые иногда называют аспектами качества установленных целей. К числу основных характеристик целей относятся: конкретность и измеримость, горизонт планирования, достижимость, непротиворечивость. Конкретные цели устанавливаются на основе выявления сильных и слабых сторон деятельности предприятия, его конкурентных преимуществ. На основе результатов второго этапа были выявлены цели и сформулированы задачи (таблица 3).

Таблица 1 – Сильные и слабые стороны предприятия

Сильные стороны	Слабые стороны
Совершенствование оборудования в линиях технологического производства Существование финансовой возможности начала проекта по расширению ассортимента Отсутствие у потребителей негативной оценки продукции АО «Хлебозавода № 7» Производственные возможности Молодой и перспективный торговый персонал	Отсутствие стратегии Недостаточный опыт в области маркетинга Слабая работа маркетингового отдела Практически полное отсутствие рекламы Прогнозирование ассортимента на основе распоряжений начальства Отсутствие опыта у торгового персонала Недостаточная прибыльность Достаточно узкий ассортимент

Таблица 2 – Угрозы и возможности

Угрозы	Возможности
Наличие на рынке сильных конкурентов, в том числе из соседних регионов Основные конкуренты имеют более обширный ассортимент Потребители становятся приверженцами здорового образа жизни и отказываются от хлебобулочных изделий Изменение предпочтений потребителей от сдобной к кондитерской продукции Развитие ненатуральных по составу пищевых добавок, улучшающих и упрощающих технологический процесс производства	Способность изменить ассортимент в соответствии с предпочтениями потребителей Способность расширить целевую аудиторию за счет введения новых позиций ассортимента Возможности подготовки ингредиентов, позволяющих сохранить полезные качества Вхождение ОАО «Хлебозавод № 7» в группу компаний Сотрудничество с ФГБОУ ВО «ВГУИТ» Воронеж – студенческий город, любят «перекусы» булочками, пирожками

Таблица 3 – Цели и задачи

Цель	Задачи
Увеличение прибыли на 20 % за 2 года за счет введения сдобной продукции и	Проведение 1 раз в 3 месяца социологических исследований о изменения товарного ассортимента улучшенных сортов хлеба предпочтениях потребителей
	Проведение 1 раз в месяц социологических исследований о качестве продукции и узнаваемости марки
	Заключение договора с ФГБОУ ВО «ВГУИТ» о возможном внедрении разработок в производственный процесс
	Настройка технологической линии для производства новой продукции / разработка новой технологической линии
	Закупка оборудования
	Заключение договоров с поставщиками сырья
	Заключение договоров с торговыми сетями и магазинами
Повышение степени узнаваемости торговой марки и продукции путем внедрения рекламной кампании	Разработка рекламной кампании для продвижения продукции
Упрочнение связей с поставщиками и покупателями	Участие в выставках для налаживания связей с возможными поставщиками и покупателями
	Проведение мерчендайзинга в торговых сетях и магазинах
	Заключение долгосрочных договоров с поставщиками сырья
	Заключение долгосрочных договоров с торговыми сетями и магазинами
Уменьшение «текучки кадров» за счет усиления мотивации персонала фирмы, повышение их уровня образования, стимулирование активной работы	Проведение 1 раз в 6 месяцев семинаров для различных отделов, по итогам которых отбор наиболее перспективных представителей отделов для обучения на долгосрочных курсах
	Разработка системы мотивации персонала

Для реализации поставленных целей и решения сформированных задач необходимо составить маркетинговый план. На первом этапе необходимо сегментировать потребителей, так как от этого зависит позиционирование. В связи с тем, что продукция предприятия слабо узнаваема, принято решение разработки новой упаковки, которая более заметна среди других. Второй этап подразумевает выбор каналов продвижения и видов рекламы. Для продвижения продукции могут быть выбраны следующие виды рекламы: аудиореклама, реклама на пересечении улиц, реклама в журналах, личное общение торговых представителей, участие в ярмарках и выставках.

Последним этапом станет этап оценки всей проведенной деятельности. Экономическая эффективность маркетинговых мероприятий определяют как некий эффект, полученный от проведения маркетинговых операций, соотношенный с общей суммой затрат на проведение данной деятельности. В процессе оценки эффективности маркетинговой деятельности необходимо остановиться на методах и сформулировать задачи, которые должны быть решены.

Таким образом, можно сделать вывод, что внедрение стратегического маркетинга является важным при выходе предприятия на рынок в условиях жесткой конкуренции.

Литература

1. Воронина В.М., Кокарев Д.В. SWOT-анализ как современный инструмент исследования в целях антикризисного управления предприятием // Практический маркетинг 2005. – № 3 (97). – с. 6–14.
2. Всестороннее изучение товара методом SWOT-анализа на примере хлеба на основе цельного зерна пшеницы Мардар М.Р. Зерновые продукты и комбикорма. 2014. Т. 55. № 3. С. 33–38.
3. Оценка качества хлебобулочных изделий с применением статистических методов анализа Дворянинова О.П., Алехина А.В., Косенко И.С., Евстратова А.С. Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. 2019. Т. 81. № 1 (79). С. 464–469.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОДУЛИРОВАННЫХ УЛЬТРАЗВУКОВЫХ ВОЛН В ПРОЦЕССЕ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕЙКОЦИТАРНОГО ИНТЕРФЕРОНА

А.А. Олешкевич

*Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина,
Москва, Россия*

Возможность применения непрерывного ультразвука (УЗ) в процессе суспензионного биосинтеза была доказана ранее и защищена Авторским свидетельством [1]. Целью настоящей работы являлось нахождение оптимальных режимов акустического воздействия при использовании модулированных ультразвуковых волн в процессе получения лейкоцитарного интерферона (ИФН).

Для стимуляции интерфероногенеза, а именно – выхода лейкоинферона с помощью обработки УЗ суспензии лейкоцитов, использовали разработанную нами ранее методику [2], дополненную использованием амплитудно-модулированного УЗ (синусоидальная модуляция с глубиной модуляции 100 %, модулирующие генераторы ГЗ-112 и ГЗ-110, несущая частота 0.88 МГц и 2,64 МГц, непрерывный и импульсный режим). При выборе оптимальных режимов акустического воздействия в течение 1–5 мин инсонировали «отработанные» лейкоциты с целью их повторного использования для продукции ИФН. Объем обрабатываемой суспензии 8–10 мл содержал 6×10^6 кл/см³. Время воздействия варьировали от 3 с до 300 с. Значение усреднённой по пространству интенсивности излучения УЗ составляло 0.01–2.0 Вт/см². Опытные и контрольные образцы помещали в колбы со средой для биосинтеза. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных программ «Statistica 6.0». Достоверность различий средних значений определяли, используя парный t-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Было выявлено, что режимы иницирующего интерфероногенез облучения во многом зависят от исходного состояния лейкоцитов и их активности. Для клеток, однократно использованных при суспензионном биосинтезе («отработанных»), и лейкоцитов с низкой исходной активностью [1] стимулирующими были интенсивности 0.05–0.7 Вт/см² при времени экспозиции от 30 с до 3 мин (табл. 1). На клетках крови разных видов животных нами были определены режимы направленного акустического воздействия на отдельные виды клеток крови и на клеточные структуры: цитоплазматическую мембрану, гранулы и цитоплазматические включения, ядра. В связи с этим, с целью стимуляции выхода ИФН, был апробирован диапазон режима ультразвука, способный одновременно действовать направленно как на отдельные клетки в суспензии в целом, так и на цитоплазматическую мембрану, в частности: интенсивность 0,05–0,7 Вт/см², частота модуляции 800–1000 Гц и время экспозиции 15 с – 3 мин. В результате были установлены режимы стимуляции выхода ИФН при суспензионном биосинтезе, позволяющий значительно (в 20 раз) повысить выход ИФН (табл. 2).

Таблица 1. Влияние непрерывного УЗ на биосинтез ИФН при времени обработки до 3 мин.

Интенсивность УЗ, Вт/см ²	Контроль	0.05	0.1	0.2	0.4	0.7	1
Активность ИФН, МЕ, ± 50	150	2800	2800	2800	2900	2100	150

Таблица 2. Влияние времени воздействия амплитудно-модулированного УЗ интенсивностью 0.05 Вт/см² с частотой модуляции 800–1000 Гц на выход ИФН.

Время УЗ-обработки, с	Контроль	15	30	45	60	75	90
Активность ИФН, МЕ, ± 50	150	≥ 500	≥ 2100	≥ 2900	≤ 2600	≤ 700	150

Итак, в лабораторных условиях после стимулирующего действия амплитудно-модулированных УЗ волн при найденных оптимальных режимах воздействия: диапазоне интенсивности, частот модуляции, время экспозиции, был получен лейкоцитарный интерферон. Качество и степень очистки синтезированного методом суспензионного биосинтеза ИФН были оценены биохимически.

Методы иммуноферментного анализа на твердом носителе (ELISA – тест) и SDS-электрофореза в ПААГ позволили идентифицировать и установить молекулярную массу полученного и очищенного ИФН; она равна 20500 Дальтон. Экспресс-тест с люминесцирующими бактериями подтвердил отсутствие токсичности синтезированного препарата.

Литература

1. Олешкевич А.А., Кузнецов В.П., Каминская Е.В. – Биомедицинская радиоэлектроника. 2014. № 11. С. 45–50.
2. Олешкевич А.А., Пашовкин Т.Н. – Ветеринария, зоотехния и биотехнология. –2014. – № 5. – С. 27–33.

УДК 633.8

БИОТЕХНОЛОГИЯ ОТДЕЛЬНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *THYMUS* L.

Л.А. Хасанова¹, З.Н. Сулейманова², В.В. Назаров³, Р.З. Нуриманов⁴, Б.Ж. Баймурзина⁵,
Л.А. Сулейманова⁴, З.М. Хасанова¹

¹ Академия наук Республики Башкортостан, Уфа, Россия

² Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

³ Крымский федеральный государственный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Россия

⁴ Башкирский государственный педагогический университет имени М. Акмуллы, Уфа, Россия

⁵ Павлодарский педагогический университет, Павлодар, Казахстан

Введение в культуру растений, богатых биологически активными веществами, к каковым относятся и представители рода *Thymus* L., весьма актуальная задача [1].

В связи с этим исследовались технологии культивирования отдельных видов рода *Thymus* L. в условиях открытого и закрытого грунта.

В четырехлетних экспериментах использовались следующие виды тимьяна: Тимьян кавказский (*Thymus caucasicus*), Тимьян ложно-монетный (*Thymus pseudonummularius*), Тимьян Маршалла (*Thymus marschallianus*), Тимьян ползучий (*Thymus serpyllum*), Тимьян Талиева (*Thymus talievii*).

Thymus caucasicus, *Thymus pseudonummularius*, *Thymus serpyllum* и *Thymus talievii* были взяты из коллекции Южно-уральского ботанического сада-института УФИЦ РАН, *Thymus marschallianus* Willd. – из естественных мест обитания (д. Балышлы Благоварского района Республики Башкортостан).

В процессе постановки экспериментов все виды тимьяна успешно прижились в условиях как открытого, так и закрытого грунта.

По морфофизиологическим наблюдениям в условиях открытого грунта исследованные виды тимьяна демонстрировали весеннее отрастание побегов, последующие бутонизацию и цветение, соответствовавшие естественным условиям произрастания данного растения (рис. 1, 2).

Thymus serpyllum (1), *Thymus marschallianus* (2), *Thymus talievii* (3), *Thymus caucasicus* (4).

У *Thymus caucasicus*, *Thymus marschallianus*, *Thymus serpyllum*, *Thymus talievii* весеннее отрастание побегов в условиях открытого грунта наблюдалось в конце апреля – начале мая, бутонизация – в первых числах мая, цветение – в первой декаде июня, обильное цветение – в начале июля.



Рис. 1. Отдельные виды тимьяна в условиях открытого грунта



Рис. 2. *Thymus pseudonummularius* в условиях открытого грунта

У *Thymus pseudonummularius* отрастание побегов после зимнего периода в условиях открытого грунта происходило медленнее и начиналось только в конце мая, причем в защищенных местах отрастание побегов шло быстрее. Бутонизация наблюдалась в начале июня, а цветение происходило во второй декаде июля. Таким образом, *Thymus pseudonummularius* оказался менее устойчивым к зимним условиям, что предполагает использование укрывных технологий при его возделывании.

Все исследованные виды тимьяна успешно произрастали и в условиях закрытого грунта, что даёт возможность их круглогодичного выращивания. Необходимо отметить, что для культивирования тимьяна наиболее подходящими считаются слабощелочные, близкие к нейтральным, почвы с легкой структурой, при этом почва должна быть хорошо дренированной, рыхлой и воздухопроницаемой. Тимьян – светолюбивое растение и подобно многим пряно-ароматическим растениям не боится прямых солнечных лучей, поэтому его рекомендуется выращивать на хорошо освещённых местах. Будучи засухоустойчивым растением, тимьян не любит застоя влаги у корней, не нуждается в обильных поливах и требует его только в засушливые периоды. Однако наши исследования показали, что *Thymus pseudonumtularius* предпочитает защищенные от солнца места и более увлажненную почву. Оптимальный метод размножения тимьяна – деление корневищными кустами и черенкованием в весенний период. Посадки тимьяна рекомендуется возобновлять через каждые три-четыре года [1–3].

Литература

1. Анищенко, И.Е. Пряно-ароматические растения в культуре в Республике Башкортостан / И.Е. Анищенко, О.Ю. Жигунов // Аграрная Россия, 2015. – № 7. – С. 13–16
2. Банаева, Ю.А. Биологические особенности *Thymus serpyllum* (Lamiaceae) при интродукции в Новосибирскую область / Ю.А. Банаева, Н.И. Гордеева, И.Н. Гуськова // Растительные ресурсы, 2006. – Т. 42. – № 4. – С. 22–28.
3. Хасанова Л.А. К вопросу об использовании чабреца в напитках функционального назначения / Л.А. Хасанова, Л.А. Сулейманова, В.В. Назаров, З.Н. Сулейманова, Г.Ш. Казыханова, Б.Ш. Ишмуратова, В.С. Власова, О.В. Топорков, Р.З. Тагиров, А.В. Миронова, З.Ю. Ибрагимова, Э.Ю. Страхова, Р.С. Кираев, З.М. Хасанова // Актуальная биотехнология, 2020. – № 3(34). – С. 269–271.

УДК 663.86/633.8

РАЗРАБОТКА НАПИТКОВ НА ОСНОВЕ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Л.А. Хасанова¹, З.М. Хасанова¹, З.Н. Сулейманова², В.В. Назаров³, Б.Ж. Баймурзина⁴, Р.З. Нуриманов⁵, А.В. Миронова⁵, Л.А. Сулейманова⁵, Э.Ю. Страхова⁵, Р.З. Тагиров⁵, О.В. Топорков⁵, З.Ю. Ибрагимова⁵, Э.В. Ялазюк⁵

¹ Академия наук Республики Башкортостан, Уфа, Россия

² Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

³ Крымский федеральный государственный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Россия

⁴ НАО «Павлодарский педагогический университет», Павлодар, Казахстан

⁵ Башкирский государственный педагогический университет имени М. Акмуллы, Уфа, Россия

При разработке напитков функционального назначения, а также низкокалорийных безалкогольных напитков с высокой физиологической ценностью особую значимость приобретают растения-сахарозаменители и пряно-ароматические растения, содержащие в своем составе, так называемые, минорные компоненты пищи такие, например, как витамины и витаминоподобные вещества, гликозиды, органические кислоты, сапонины, терпены, фенольные соединения, флавоноиды, обладающие высокими антиоксидантами, бактерицидными, дезинфицирующими, противовоспалительными, тонизирующими, иммуномодулирующими и иммуностимулирующими свойствами. Использование данного растительного сырья позволяет создавать широкую палитру напитков (диетических, диабетических, тонизирующих, антистрессовых, улучшающих работу сердечнососудистой системы и желудочно-кишечного тракта) [1–3].

В связи с этим была проведена исследовательская работа по разработке рецептур и технологий безалкогольных напитков на основе экстрактов из растений сахарозаменителей *Стевия медовая* (*Stevia rebaudiana Berrtoni*) и *Джимнема лесная* (*Gymnema Sylvestre*), широко применяемых в традиционной медицине, а в настоящее время и в промышленном производстве, в качестве натуральных подсластителей, с добавлением аскорбиновой кислоты, как источника витамина С, и пряно-ароматических растений, таких как *Бадьян анисовый* (*Illicium anisatum*), *Гвоздичное дерево* (*Syzygium aromaticum*), *Имбирь обыкновенный* (*Zingiber officinale*), *Кардамон настоящий* (*Elettaria cardamomum*), *Тимьян обыкновенный* (*Thymus vulgaris* L.).

В результате проведенных исследований осуществлена разработка рецептур и технологий приготовления безалкогольных напитков и напитков функционального назначения на основе стевиозида высокой степени очистки из растения *Stevia rebaudiana Berrtoni* с использованием аскорбиновой кислоты, а также бадьяна, гвоздики, имбиря, кардамона и тимьяна. Проведены органолептические, физико-химические и микробиологические исследования данных напитков, показавшие их соответствие нормативным требованиям, предъявляемым к безалкогольным напиткам и напиткам функционального назначения.

Литература

1. Поляков В.А. Пряно-ароматические и лекарственные растения в производстве алкогольных напитков / В.А. Поляков, Р.В. Кунакова, Р.А. Зайнуллин, И.М. Абрамова, Л.М. Абрамова И.Е. Анищенко, А.Г. Гайдеров, И.Р. Фахретдинов. – Москва: ВНИИПБТ, 2008. – 284 с.
2. Хасанова Л.А. К вопросу об использовании чабреца в напитках функционального назначения / Л.А. Хасанова, Л.А. Сулейманова, В.В. Назаров, З.Н. Сулейманова, Г.Ш. Казыханова, Б.Ш. Ишмуратова, В.С. Власова, О.В. Топорков, Р.З. Тагиров, А.В. Миронова, З.Ю. Ибрагимова, Э.Ю. Страхова, Р.С. Кираев, З.М. Хасанова // Актуальная биотехнология, 2020. – № 3(34). – С. 269–271.
3. Хасанова Л.А. Напитки функционального назначения на основе пищевого и лекарственного растительного сырья // Л.А. Хасанова, З.М. Хасанова, И.З. Галикеева, Г.М. Гареева, О.Н. Лаптева, А.М. Мумчян, Г.Р. Рахимова, З.Н. Сулейманова, Л.А. Сулейманова, И.В. Такиуллина, И.М. Фахретдинов, Р.И. Якупова // Актуальная биотехнология, 2018. – № 3(26). – С. 532–533.

МЕТИЛОТРОФНЫЕ ДРОЖЖИ КАК ФИТОСИМБИОНТЫ

Е.Н. Капарулина, Н.В. Агафонова, Н.В. Доронина

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, ФИЦ Пушчинский научный центр
биологических исследований РАН, Пушкино, Россия

Метилотрофные прокариоты и эукариоты используют в качестве источников углерода и энергии различные C₁-соединения, широко распространены в природе и играют важную роль в глобальных циклах метана и метанола. Одноуглеродные соединения (метанол, метиламин, формальдегид, формиат и др.) образуются в различных биотопах, являются естественными продуктами метаболизма растений, поэтому неудивительно, что метилотрофные бактерии и дрожжи широко распространены и постоянно обнаруживаются в ризосфере и филлосфере (Доронина с соавт., 2015; Троценко, Торгонская, 2011). Доказано, что многие аэробные метилотрофные бактерии являются фитосимбионтами и стимулируют рост растений с помощью самых разнообразных механизмов. Однако метилотрофные дрожжи, представители родов *Ogataea*, *Komagataella*, *Kuraishia*, использующие метанол в качестве источника углерода и энергии, не меньше привлекают внимание исследователей. Большинство видов рода *Ogataea* связаны с гниющей древесиной, поверхностями листьев или насекомыми, а также обнаруживаются в составе различных сообществ (Kurtzman 2011; Koowadjanakul et al., 2011; Limtong et al., 2013; C`adez` et al., 2013). Ввиду уникальной биологии и биотехнологических перспектив весьма актуальным является выделение и характеристика новых метилотрофных дрожжей. Объектом исследования служил новый штамм *Lantana*, выделенный нами из филлосферы лантаны (*Lantana* sp. L.) на среде с метанолом в качестве единственного источника углерода и энергии.

Цель работы – характеристика нового метилотрофного штамма дрожжей и исследование его влияния на рост ростков *Lactuca sativa* L. и *Pisum sativum* L., культивируемых в условиях *in vitro*.

Для идентификации нового изолята использовали методы полифазной таксономии. На основании секвенирования домена D1/D2 26S рДНК и 18S рДНК штамм *Lantana* отнесен к кладе *Ogataea* и имеет 99–100 % сходства со штаммами *Ogataea/Candida sonorensis* CBS6793 из кактусов (Ganter, 2004; Vu et al., 2016). Штамм *Lantana* является факультативным метилотрофом, поскольку растет на широком спектре полиуглеродных соединений, а также на минеральной среде с 0.5–1.0 % при температуре 10–37 °C и pH 4.0–7.5.

На среде с нитратом калия и L-триптофаном, в качестве предшественника синтеза индолов, обнаружена способность нового штамма дрожжей синтезировать фитогормоны ауксины в концентрации до 17 мкг/мл. В опытах по инокуляции клетками штамма *Lantana* стерильных семян салата (*Lactuca sativa* L.) выявлено, что к 10 суткам высота ростков и длина корней колонизированных (опытных) растений превышала показатели контрольных (стерильных) в два раза. Кроме того, инокуляция клетками нового штамма стерильных семян гороха (*Pisum sativum* L.) установила, что к 17 суткам высота стебля колонизированных (опытных) растений превышала показатели контрольных (стерильных) на 23 %, количество листьев было вдвое больше по сравнению с контролем. Однако масса зеленой части растений и масса корневой системы практически не отличались от контрольных, что, вероятно, свидетельствует о росте клеток растяжением, а не увеличением их количества, и, соответственно, биомассы.

Таким образом, выделенный новый метилотрофный штамм дрожжей из филлосферы лантаны является фитосимбионтом, использует образуемый растениями метанол, синтезирует фитогормоны ауксины и стимулирует рост растений. Следовательно, новый изолят перспективен для дальнейших исследований по определению его влияния на урожайность сельскохозяйственных культур.

УДК 582.26–119.2:664.951.014:577.16

ВОДНЫЕ БИОРЕСУРСЫ, КАК ПЕРСПЕКТИВНОЕ СЫРЬЕ ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ГЕРОДИЕТИЧЕСКИХ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ**Л.Х. Котельникова, Е.А. Сухова***Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии, Москва, Россия*

Население пенсионного возраста, как правило, составляет 1/4 населения страны. По данным Росстата, на 01 января 2020 года численность пенсионеров по старости в Российской Федерации равна 36,3 млн человек (<https://rosstat.gov.ru/folder/12781>, дата обращения: 22.07.2021). Известно, что процесс старения – это медленное накопление возрастных изменений. К ним относят уменьшение суточных энергозатрат, снижение окислительно-восстановительных процессов, превалирование процессов диссимилиации над процессами ассимиляции, наличие дегенеративных атрофических процессов, а также ослабление функций пищеварительного аппарата, что выражается в снижении кислотности желудочного сока, в нарушениях со стороны поджелудочной железы и печени, в большой потребности в определенных веществах [Кочеткова, 2009].

Согласно возрастной классификации, население старше трудоспособного возраста подразделяют на две возрастные группы: пожилые люди – 60–74 года и люди преклонного возраста – 75 лет и старше. Средняя продолжительность жизни в Российской Федерации составляет 73 года, поэтому целесообразно в дальнейшем учитывать пожилое население до 74 лет (<https://rosinfostat.ru/prodolzhitelnost-zhizni/>, дата обращения: 22.07.2021).

Маркетинговые исследования показывают минимальное заполнение рынка функциональными продуктами, представленными хлебобулочными и кондитерскими изделиями, напитками, а также продуктами мясной, молочной, масложировой отраслей [Дзахмишева, Дзахмишева, 2014]. При этом, ассортимент продукции геродиетического назначения, наличие которой могло бы обеспечить пожилых людей доступными, сбалансированными, содержащими эссенциальные вещества продуктами, практически не представлен на рынке.

Традиционный рацион питания не в полной мере обеспечивает изменяющиеся потребности пожилого населения. Поэтому важно разработать и внедрить технологии пищевых продуктов геродиетического назначения с моделированным составом. Это позволит обеспечить стабильность физиологического и метаболического статуса людей пожилого возраста без больших трудозатрат и финансовых вложений. В частности, для пожилого населения важно увеличить потребление белков растительного происхождения, но, при этом, необходимо получать определённое количество незаменимых аминокислот, а также снизить уровень углеводов в питании. С возрастом обязательным условием является увеличение в рационе продуктов с высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), особенно кислот семейства ω -3, так как они играют существенную роль в профилактике и лечении атеросклероза, онкологических патологий, повышении иммунного статуса организма [Харенко и др., 2019].

У людей пожилого возраста сохраняется высокая потребность в витаминах и минеральных веществах. Так, геропротекторами (средствами профилактики преждевременного старения) являются витамины А, С, Е и Р, а также группы В. Они же относятся к мощным антиоксидантам, предупреждающим негативное влияние свободных радикалов. Кроме того, в России у пожилых людей повсеместно наблюдается дефицит таких микроэлементов, как йод и железо [Юдина, 2008].

В 2019 году население Российской Федерации столкнулось с новым вирусным заболеванием SARS-CoV-2, вызывающим атипичную пневмонию COVID-19. Особенно тяжелые последствия были у пожилых людей (65+). Поэтому при разработке новых технологий целесообразно включить в них продукты или вещества, имеющие противовирусное действие. Специалисты в области здравоохранения считают, что противовирусную защиту способны обеспечить цинк, селен и витамин D. В частности, учёные Первого Медицинского университета им. И.М. Сеченова показали, что чем ниже концентрация этих микроэлементов и витамина в организме, тем тяжелее течение болезни и ее последствия. [Подкорытова и др., 2021].

Водные биологические ресурсы, в том числе, морские водоросли, являются источником различных веществ, способных обеспечить население пожилого возраста полноценным белком, микро- и макроэлементами, полиненасыщенными жирными кислотами, пищевыми волокнами, энтеросорбентами и другими биологически активными веществами (БАВ).

Мышечные ткани кальмара и трески – важнейшие источники полноценного белка, жира, богатого непредельными жирными кислотами, и макро- и микроэлементов. В таблице 1 представлены аминокислотный состав этих продуктов, который показывает, что при употреблении 100 г. кальмара или трески в день пожилой организм способен 15,4–37,5 % суточной нормы аминокислот.

Таблица 1 – Аминокислотный состав мышечной ткани кальмара командорского и трески балтийской [Михлай, 2011; Науменко, 2014]

Наименование аминокислоты	Содержание аминокислоты, г/100 г. белка			Доля от суточной нормы потребления в 100 г. продукта, %	
	кальмар командорский	треска балтийская	суточная норма потребления для пожилых людей	кальмар командорский	треска балтийская
Изолейцин	4.0	3.8	4.0	20.0	19.0
Лейцин	7.3	8.4	7.0	20.9	24.0
Лизин	7.7	10.3	5.5	28.0	37.5
Метионин+цистин	3.3	2.7	3.5	18.9	15.4
Фенилаланин+тирозин	6.5	7.8	6.0	21.7	26.0
Треонин	3.7	3.9	4.0	18.5	19.5
Валин	3.9	4.6	5.0	15.6	18.4
Триптофан	1.4	0.8	1.0	28.0	16.0

Кроме того, мышечная ткань трески и кальмара содержат важные для пожилого человека макроэлементы – калий, фосфор, серу, а также микроэлементы – цинк, селен и йод. Важно отметить, что в мышечной ткани трески содержится витамин D (0,5 мкг), который не только участвует в работе иммунной системы, но и отвечает за минеральный обмен в костной ткани, улучшает усвоение фосфора и кальция, способствует свертываемости крови.

Источником полиненасыщенных жирных кислот может быть рыбный жир, вносимый в процессе производства.

Бурые водоросли (Phaeophyceae) являются источником БАВ и минералов (таблица 2). Они содержат альгиновую кислоту и ее соли, которые обладают свойствами сорбента и способствуют выведению многих токсических веществ из организма человека и являются пищевыми волокнами, что поддерживает оптимальную работу желудочно-кишечного тракта и немаловажно для поддержания здоровья увядающего организма пожилых людей. Также бурые водоросли содержат фукоидан – биоактивный сульфатированный полисахарид, который имеет антикоагулянтное, гипополипидемическое, противоопухолевое и противовоспалительное действие. Он обладает противовирусным и антиоксидантным эффектом. Кроме того, есть данные об иммуномодулирующем и гепатопротекторном действии фукоидана, и об его положительном влиянии на углеводный обмен и инсулинорезистентность. Практически все бурые водоросли содержат маннит (5–20 % сухого вещества) который является природным диуретиком, способным выводить жидкость из организма. [Подкорытова, 2005; Кузнецова и др., 2009].

Таблица 2 – Химический состав бурых водорослей [Вафина, 2010]

Наименование бурой водоросли	Содержание, г/100г сухого вещества					
	альгиновой кислоты	маннита	фукоидана	азотистых веществ	минеральных веществ	йода
<i>A. nodosum</i>	26,6±1,2	3,5±0,1	10,2±2,0	4,66	19,3±0,3	0,05±0,01
<i>L. japonica</i>	31,0±3,0	9,2±1,2	3,2±2,0	7,76	32,9±4,7	0,40 ±0,20

Люди старше 60 лет зачастую испытывают трудности при употреблении плотной или жесткой пищи. Для облегчения употребления геродиетического питания можно при разработке новой продукции ориентироваться на измельченные или гомогенизированные изделия, например паштеты.

Таким образом, разработка паштетов с водными биоресурсами моделированного состава позволяет создать продукт, содержащий полноценные белки, полиненасыщенные жирные кислоты, минералы и витамины, что актуально в настоящее время.

Нами смоделированы предварительные рецептуры паштетов для пожилого населения с морскими водорослями и кальмаром; морскими водорослями и треской. В настоящее время идет подготовка к выпуску пробных партий. Внедрение такой технологии, позволит обеспечить пожилое население легкоусвояемым продуктом и, как следствие, улучшить качество жизни, повысить активность, снизить риск развития различных патологий.

Литература

- Вафина Л.Х. Обоснование комплексной технологии переработки бурых водорослей (Phaeophyta) при получении функциональных пищевых продуктов // Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата технических наук – Москва, 2010. С 24
- Дзахмишева З.А., Дзахмишева И.Ш. Функциональные пищевые продукты геродиетического назначения // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 9 (часть 9). – С. 2048–2051.
- Кочеткова А.А. Функциональные продукты // Пищевая промышленность. – 2009. – № 3. – С. 4–5.
- Кузнецова Т.А., Сомова Л.М., Плеханова Н.Г., Звягинцева Т.Н., Применение фукоидана из бурых водорослей *Fucus evanescens* для коррекции иммунных нарушений при эндотоксемии // Тихоокеанский медицинский журнал. 2009. № 3. С. 78–81.
- Михай С.А. Обоснование и разработка технологии полуфабрикатов из рыбы и кальмара, предназначенных для питания детей дошкольного и школьного возраста // Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата технических наук – Москва, 2011. С. 25
- Науменко Е.А. Пищевая ценность рыбных полуфабрикатов с функциональными свойствами из трески балтийской // Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство. – 2014. – №. 1. – С. 97–103.
- Подкорытова А.В. Морские водоросли – макрофиты и травы – Москва, Издательство ВНИРО – 2005, С. 174
- Подкорытова А.В., Котельникова Л.Х., Шашкина И.А. Биогели Витальгар из водорослей семейства Laminariaceae, их роль в борьбе против COVID-19 /Сборник тезисов «Здравница-2021» – Москва 2021 Том 98, выпуск 2, С. 153–154
- Харенко Е.Н., Яричевская Н.Н., Юдина С.Б. Технология функциональных продуктов для геродиетического питания: учебное пособие – Санкт-Петербург, Москва, Краснодар: «Лань» – 2014 С. 204
- Юдина С.Б. Технология продуктов функционального питания – Москва, «Дели принт» – 2008, С. 280

ИССЛЕДОВАНИЕ СЛОЖНЫХ КИНЕТИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ В ЗЕРНЕ ТРИТИКАЛЕ СОРТА ГОРКА МЕТОДОМ ТЕРМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Т.Н. Тертычная¹, И.В. Кузнецова², А.В. Дранников², А.А. Шевцов², Н.В. Засыпкин²

¹ Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I, Воронеж, Россия

² Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Целью данной работы является определение закономерностей теплового воздействия на зерно тритикале сорта Горка методом синхронного термического анализа.

В работе проведены экспериментальные исследования зерна тритикале сорта Горка методами дифференциально-сканирующей калориметрии (ДСК) и термогравиметрией (ТГ). Для исследования закономерностей теплового воздействия на образцы зерна был использован прибор синхронного термического анализа (ТГ-ДТА/ДСК) модели STA 449 F3 Jupiter. Полученные зависимости позволили выделить периоды дегидратации воды и преобразования сухих веществ при термическом воздействии на зерно тритикале, а также выявить температурные зоны, которые соответствуют высвобождению влаги с различной формой и энергией связи [1–2].

Зерно тритикале исследовали на приборе синхронного термического анализа модели STA 449 F3 Jupiter (NETZSCH, Германия) с держателем образца типа S в алюминиевом тигле с проколотой крышкой. Измерения проводились в среде азота класса 5,0 (расход активного газа 50 мл/мин, защитного – 20 мл/мин), в алюминиевых контейнерах с общей массой навески – 12 мг при следующих режимах: давление – атмосферное, максимальная температура 225 °С, скорость изменения температуры 5 °С/мин [3–4]. Были отмечены три периода изменения состояния влаги в зависимости от температуры.

На I этапе в интервале температур 25–39° С происходит увеличение начальной температуры, прогрев и удаление физико-механически связанной влаги, капиллярной, имеющей невысокую энергию связи с зерном. При температурах 39–140° С, соответствующих II этапу, осуществляется десорбция осмотической влаги из зерна. На интервале температур 140–225° С, соответствующих III этапу начинается удаление химически связанной (полиадсорбционной и моноадсорбционной) влаги, происходит деструкция материала с выделением газообразных составляющих.

Полученные данные термического анализа позволили определить температурные зоны удаления влаги из зерна тритикале сорта Горка с различной формой и энергией связи, а также зоны превращения сухих веществ при повышении температуры. Это позволит в дальнейшем спрогнозировать режимные параметры процесса удаления влаги из зерна и выбирать наиболее эффективные способы удаления влаги из материала на этапе сушки зерна [5].

Литература

Шахов С.В. Дериватографический способ анализа видов связи влаги с материалом / С.В. Шахов, А.Г. Вострикова, Д.О. Ефременко // Евразийский Союз Ученых (ЕСУ). – 2014. – № 6–3 (6). – С. 114–116.

Влияние формы связи влаги фаршевых систем на основе различного рыбного сырья методом ДТА / Н.С. Родионова, И.В. Кузнецова, Н.П. Зацепилина и [др.] // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2010. – № 12. – С. 39–40.

3. Исследование форм связи влаги зефира различного состава методом термического анализа / Г.О. Магомедов, И.В. Плотникова, И.В. Кузнецова и [др.] // Вестник ВГУИТ. – 2017. – Т.79. – № 3. – С. 42–50. doi:10.20914/2310-1202-2017-3-42-50.

4. Перегончая О.В. Исследование дегидратации тритикалевой муки методами термического анализа / О.В. Перегончая, Т.Н. Тертычная // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2011. – Том II. – Вып. 4. – С. 511–517.

5. Тертычная Т.Н. Исследование форм связи влаги в зерне тритикале сорта Горка методом термического анализа / Т.Н. Тертычная, И.В. Кузнецова, А.А. Шевцов, С.С. Куликов // Хлебопродукты. – 2021. – № 4. – С. 44–47.

УДК: 633.491+579.64:631.532/535

**ПОВЫШЕНИЕ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КАЛЛУСОВ ПШЕНИЦЫ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ РИЗОБАКТЕРИЙ****О.В. Ткаченко¹, Н.В. Евсеева², Г.Л. Бурьгин², Ю.П. Федоненко², Ю.В. Лобачев¹**¹ Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, Саратов, Россия² Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

Культура клеток, тканей и органов растений *in vitro*, несмотря на широкое распространение в биотехнологии, имеет существенные ограничения в практическом применении в селекционно-семеноводческих программах для многих сельскохозяйственных культур. В частности, для злаков (в том числе мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L.), использование биотехнологических приемов сдерживается низкой морфогенетической активностью каллусов в культуре *in vitro* у различных сортов и селекционных линий. Для успешного культивирования растительных клеток и тканей *in vitro* требуется создание оптимальных условий, обеспечивающих реализацию клетками растений их морфогенетического потенциала. С этой целью исследуется влияние физических и химических факторов, способных повысить эффективность культивирования растений *in vitro*. Одним из приемов, активизирующих морфогенетические процессы в культуре *in vitro*, является инокуляция растительных объектов бактериями или их отдельными компонентами. В предварительных исследованиях установлено, что липополисахарид (ЛПС) бактерий *Azospirillum baldaniorum* Sp245 стимулирует формирование каллусов с очагами меристематической активности в культуре *in vitro* пшеницы, а также положительно влияет на регенерационную способность культивируемых тканей, в отличие от нейтрального действия ЛПС авирулентного штамма энтеробактерий *E. coli* K12 (Evseeva *et al.*, 2018).

Цель исследования – изучение влияния ЛПС бактерий рода *Azospirillum* из разных серологических групп на морфогенетическую способность соматических каллусов и регенерацию растений пшеницы в культуре *in vitro* для оценки ростстимулирующего и регулирующего действия О-специфических полисахаридов.

В данной работе мы сравнили влияние препаратов ЛПС трёх штаммов бактерий рода *Azospirillum* (*A. brasilense* SR55, SR75 и *A. lipoferum* SR65) из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН в отношении каллусов пшеницы (*Triticum aestivum* L. сорт Саратовская 29) двух линий (LRht-B1c и LRht-B1a), различающихся по морфогенной активности. Бактериальные ЛПС различались по химической структуре О-полисахарида, физико-химическим и серологическим свойствам. Установлено, что ЛПС штамма *A. lipoferum* SR65 в отношении обеих линий пшеницы достоверно стимулировал как морфогенез каллусов, так и развитие растений-регенерантов. При этом выход регенерантов в пересчете на общее число эксплантов достоверно повышался в 2,15 раза у более высокоморфогенной линии (LRht-B1c) и в 3,75 раза у низкоморфогенной линии (LRht-B1a). В то же время препараты ЛПС штаммов *A. brasilense* SR55 и SR75 у обеих линий пшеницы повышали либо только выход морфогенных каллусов, либо только выход растений-регенерантов, соответственно. В целом, действие ЛПС *Azospirillum* spp. сильнее проявлялось по отношению к низкоморфогенной линии LRht-B1a, что приводило к нивелированию различий между морфогенной активностью каллусов линий LRht-B1c и LRht-B1a. В то же время липополисахариды не оказывали существенного влияния на морфологические параметры растений-регенерантов. Таким образом, ЛПС бактерий рода *Azospirillum* являются перспективными стимуляторами морфогенеза растений и могут в будущем быть использованы для усовершенствования соответствующих методов клеточной селекции и генной инженерии растений.

Литература

Evseeva N.V., Tkachenko O.V., Burygin G.L., Matora L.Y., Lobachev Y.V., Shchyogolev S.Y. Effect of bacterial lipopolysaccharides on morphogenetic activity in wheat somatic calluses // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2018. – Vol. 34, No 1. – 3. doi: 10.1007/s11274-017-2386-3

Секция 2. Медицинская биотехнология и биофармацевтика

УДК 640

EFFECTS OF RUMEX TIANSHANICUS LOSINSK EXTRACT ON GI TRACT AND HEMATOLOGICAL INDICATORS IN EXPERIMENTAL GASTRITIS**D.M. Yergozova, I.B. Ginayatova, A.K. Shokan, N.O. Kudrina, T.Y. Kulmanov***Republican State Enterprise on the Right of Economic Management «INSTITUTE OF GENETICS AND PHYSIOLOGY» Science Committee of the Ministry of Education and Science of the RK, Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan*

The gastritis and gastrointestinal diseases problem has not lost relevance at present because of the disease's significant prevalence. The five most frequent diseases worldwide include gastrointestinal tract disorders. And of the whole number of gastrointestinal conditions, gastritis is the most frequent and about 30 percent of the people worldwide are caused by peptic ulcer [1]. Around half of people globally are supposed to suffer from gastritis. With age the incidence rate is higher [2]. There were approximately 90,000 new cases reported in 2013 [3]. Statistics for 2020 indicate that 50,8 percent of developing countries' population worldwide is affected with gastritis [4,5]. This means that every year the numbers increase.

Our research suggests using Tien Shan sorrel extract as an alternate therapy for gastritis. It was used in folk medicine to treat gastrointestinal and liver diseases, as well as a variety of skin disorders. It contains anthracene derivatives, tannins, flavonoids, naphthols, macro – and microelements, catechins, saponins, alkaloids, and polysaccharides, all of which have various therapeutic properties [6].

Rumex tianschanicus is a rumex species native to Kazakhstan. According to T. Sitpaeva (2019), *Rumex tianschanicus* is one of the wild agricultural crop varieties found in Kazakhstan's Tien Shan Mountains, and it is recommended for harvesting as an industrial crop alongside other species. [7]

Currently, one of the possible approaches to increasing the effectiveness of the treatment of many diseases is the use of drugs obtained from medicinal plant materials. During our study, 45 rats weighing 250±50 grams were split into two groups: The control group got placebo, whereas the experimental group received acetylsalicylic acid 160 mg/kg orally once a day for 5 days to induce acute experimental gastritis. Then experimental rats were split into three groups and given *Rumex tianschanicus* extract after being diagnosed with gastritis. For ten days, the first group was administered 100 mg/kg orally once a day, the second group was given 50 mg/kg orally once a day. The extract was not given to the third group. At the conclusion of the research, all of the animals were sacrificed to assess cytological, histological, macro changes in the GI tract and hematological indices.

The macro photographs of the mucous membrane of the stomach were taken and the condition of the gastrointestinal tract was assessed. Aspirin-induced stomach mucous membrane inflammation is characterized by small erosions (1–5 mm) and hyperemia. As a result, rats eat less frequently and weigh less than previously. On the fifth day of treatment with extract, the color of the stomach mucous membrane returned to normal. The rats' condition has stabilized as a result of the treatment.

Rumex tianschanicus extract was shown to decrease aspirin-induced gastritis and normalize rat hematological indicators in a research. Overall, the data confirmed *Rumex tianschanicus* extract's positive and non-toxic effects in reducing stomach ulcer formation in experimental acute gastritis rats, indicating that it may be used as a gastritis alternative therapy.

The *Rumex tianschanicus* extract has no pathological effect on peripheral blood and hemopoiesis during the period of its use, according to the results of a study conducted to assess the pharmacological properties of the *Rumex tianschanicus* extract and its potential effect on the hematological parameters of rats during the treatment of experimental gastritis. In this regard, *Rumex tianschanicus* extract is advised for additional in-depth research in experimental conditions, followed by a transfer to clinical trials.

References

1. Snowden F.M. Emerging and reemerging diseases: a historical perspective / F.M. Snowden // Immunol. – 2008. – Rev., 225 (1). – P. 9–26.
2. Ferri F.F. Ferri's Clinical Advisor 2013, 5 Books in 1, Expert Consult – Online and Print / F.F. Ferri // Elsevier Health Sciences. – 2012. – P. 165–178.
3. Vos T. Allen C. Arora M., et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 / T. Vos, C. Allen, M. Arora, et al. // The Lancet. – 2015. – Vol. 386, Iss. 10053. – P. 1545–1602.
4. Evelyn P.T., Fernanda F.M., Mayra P.D., Luiz O.M., Marcela A.P., Viviane S.B., et al. Epidemiological and clinical-pathological aspects of helicobacter pylori infection in brazilian children and adults / P.T. Evelyn, F.M. Fernanda, P.D. Mayra, O.M. Luiz, A.P. Marcela, S.B. Viviane, et al. // Gastroenterology Research & Practice. – 2018. – Vol.2018. – P.8–16.
5. Marcis L., Olga S., Jelizaveta P., Yaron N. Epidemiology of Helicobacter Pylori Infection / L. Marcis, S. Olga, P. Jelizaveta, N. Yaron // Wiley Helicobacter. – 2018. – Vol. 23(1). – e12514.
6. Litvinenko .A., Begimbetova D.A., Shalahmetova T.M., Muzychikina R.A. Gipatoprotektnaya aktivnost fitopreparatov nekotorykh kazhastankih vidov avelei / .A. Litvinenko, D.A. Begimbetova, T.M. Şalahmetova, R.A. Muzychikina // İzvestia Nacionalnoi akademii nauk Respubliki Kazakhstan. Seria himicheskaya. – 2007. – № 2. – S. 26–28.
7. G.T. Sitpayeva, G.M. Kudabayeva, L.A. Dimeyeva, N.G. Gemejiyeva, P.V. Vesselova. Crop wild relatives of Kazakhstan Tien Shan: Flora, vegetation, resources / Sitpayeva G.T., Kudabayeva G.M., Dimeyeva L.A., Gemejiyeva N.G., Vesselova P.V. // Plant Diversity. – 2020. – Vol.42, Iss.1. – P. 19–32.

УДК 616–006–092.9

ИНГИБИРОВАНИЕ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ SET7/9 ПОВЫШАЕТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ РАКОВЫХ КЛЕТОК К ГЕНОТОКСИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

А.А. Дакс, О.Ю. Шувалов, О.А. Федорова, А.В. Петухов, Н.А. Барлев

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Белок человека Set7/9 представляет собой гистоновою и негистоновою метилтрансферазу, которая способна метилировать гистоны H3, H3.3 и ряд белков, играющих ключевые роли в регуляции пролиферации клеток, ответе на повреждение ДНК, а также опухолевой трансформации, таких как p53, PARP1, E2F1 и другие. В рамках данного исследования мы продемонстрировали, что Set7/9 осуществляет регуляцию метаболизма раковых клеток и влияет на их опухолевые характеристики.

Мы протестировали клеточные линии немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) человека H1299, A549 и H1975 с нокдауном Set7/9 на скорость пролиферации и показали, что подавление Set7/9 приводит к увеличению пролиферативной активности исследуемых клеток. Также в результате анализа клеточного цикла мы продемонстрировали, что нокдаун Set7/9 приводит к увеличению S-фазы, что согласуется с данными тестов пролиферации.

Предположив, что Set7/9 может влиять на метаболический статус клеток НМРЛ, мы проанализировали митохондриальный мембранный потенциал (ММП) клеток H1299, A549 и H1975 с различным статусом данного фермента. Мы показали, что клетки со сниженным уровнем Set7/9 характеризуются повышенным уровнем ММП. В результате исследования влияния Set7/9 на уровень гликолитических ферментов как на уровне мРНК, так и на уровне белка, было показано, что подавление Set7/9 приводит к повышению ключевых гликолитических ферментов – лактатдегидрогеназы LDHA, альдолазы AldoA, гексокиназы (HK2), а также переносчика глюкозы (Glut1), что объясняет влияние Set7/9 на скорость пролиферации клеток.

Таким образом, мы показали, что метилтрансфераза Set7/9 регулирует пролиферацию раковых клеток, а подавление Set7/9 вызывает повышение уровня гликолиза и способствует формированию агрессивного ракового фенотипа.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19–75–10059.

УДК 66.02

ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ
СВЕРХКРИТИЧЕСКОЙ ЭКСТРАКЦИЕЙН.В. Меньшутина¹, И.В. Казеев², А.И. Артемьев¹, П.А. Флегонтов³, Р.Р. Дашкин³¹ РХТУ им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия² Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина, Москва, Россия³ Инжиниринговый центр «Продукты и технологии тонкого органического синтеза, РХТУ им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

Введение. Экстракция – неотъемлемый процесс извлечения ценных биологически активных веществ (БАВ) из растительного сырья в пищевой и фармацевтической промышленности, сельском хозяйстве [1]. Получаемые экстракты обладают антиоксидантными, антибактериальными, противовирусными, противовоспалительными и противоаллергическими свойствами [2]. Благодаря уникальным свойствам экстракты применяются в качестве лекарственных препаратов, биологических добавок к пищевым продуктам [3]. В процессе экстрагирования требуется сохранение целостности и биологической активности извлекаемых БАВ. Таким образом, изучаются различные методы экстрагирования растительного сырья с применением ультразвукового и микроволнового воздействия [4]. Одним из перспективных направлений является применение сверхкритических технологий при процессе экстрагирования [5].

Сверхкритическая экстракция (СКЭ) основывается на применении альтернативных растворителей, как сверхкритический диоксид углерода. Сверхкритический диоксид углерода бесцветен, безопасен, нетоксичен, не горюч и дешевле по сравнению с другими растворителями [6]. Диоксид углерода переходит в сверхкритическое состояние при температуре большей 31,1 °С и давлению больше 7,38 Мпа [7]. Путем регулирования технологических параметров проведения процесса СКЭ, таких как температура, давление и скорость потока растворителя, появляется возможность влияния на степень извлечения БАВ [8]. Полученный экстракт легко отделяется от диоксида углерода, который при нормальных условиях переходит в газообразное состояние. В сверхкритическом состоянии диоксид углерода ведет себя как липофильный растворитель, поэтому он совместим для солюбилизации липофильных соединений [9]. Однако диоксид углерода неполярное соединение, что затрудняет процесс извлечения полярных соединений. Для решения данной проблемы применяются полярные сорастворители, такие как вода, этанол, и др. [10]. Благодаря добавлению небольшого количества сорастворителя в поток экстрагента извлечение полярных БАВ проходит более эффективно.

Одни из БАВ, применяемых для лечения опухолей, рака, сердечно-сосудистых заболеваний и обладающих успокаивающими и антиоксидантными свойствами, являются гинзенозиды [11]. Гинзенозиды считаются основными биологически активными компонентами входящими в состав женьшеня. Всего из женьшеня выделено и охарактеризовано 38 гинзеноцидов. Основные из них это Rg1, Rb1 и Rf представлены на рисунке 1 [12].

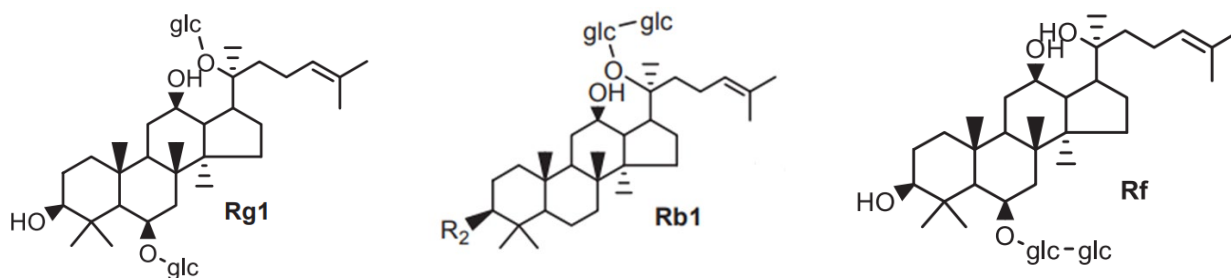


Рисунок 1. Структурные формулы гинзенозидов Rg1, Rb1 и Rf [12]

Получаемые экстракты женьшеня отличаются уникальными лечебными свойствами и входят в государственный реестр лекарственных средств [13]. Благодаря свойствам СКЭ с применением в качестве экстрагента сверхкритического диоксида углерода, этанола и воды появляется возможность извлечения гинзенозидов из женьшеня сохраняя его биологическую активность и фармакологические свойства.

В данной работе изучали эффективность СКЭ гинзенозидов из женьшеня. Для сравнения эффективности применения сверхкритических технологий при экстрагировании гинзенозидов проводилась жидкостная экстракция женьшеня. Для сохранения статистической достоверности результатов проводилась серия из трех экспериментов с одинаковыми заданными параметрами.

Материалы и методы. Для приготовления экстрактов использовали сертифицированное сырье. В качестве исследуемого объекта использовались высушенные корни женьшеня. Экстракцию проводили этанолом (объемная доля 95 %), дистиллированной водой и диоксидом углерода (99,8 %).

СКЭ гинзенозидов из женьшеня проводится на установке высокого давления. Принципиальная схема установки для извлечения гинзенозидов изображена на рисунке 2.

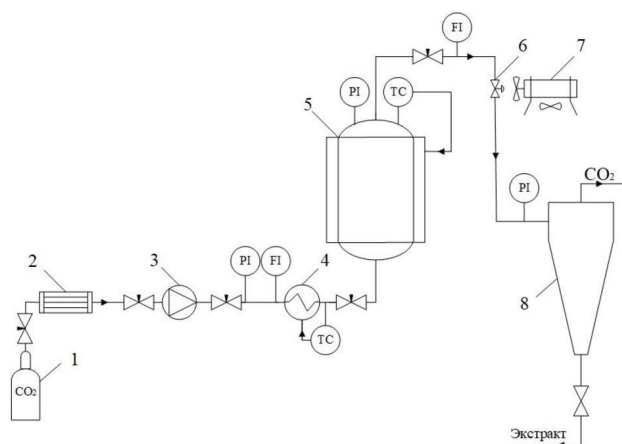


Рисунок 2. Принципиальная схема установки для извлечения гинзенозидов СКЭ: 1 – баллон CO₂; 2 – конденсатор; 3 – насос для подачи CO₂; 4 – теплообменник; 5 – экстрактор; 6 – нагревательный элемент; 7 – регулятор давления; 8 – сепаратор; ТС – регулятор температуры; FI – расходомер; PI – датчик давления

Процесс экстракции проводится в несколько этапов: подготовка сырья; термостатирование, СКЭ в статическом режиме, СКЭ при постоянном расходе сверхкритического диоксида углерода. Сырье предварительно измельчали. Полученную навеску помещали в 33 % этиловый спирт. Смесь из этилового спирта и растительного сырья помещали в термостат при постоянной температуре на строго заданный период времени. После термостатированную смесь помещают в экстрактор. После герметизации экстрактора устанавливали рабочие параметры для проведения процесса СКЭ в статическом режиме. Спустя строго заданный период времени начинается процесс СКЭ при постоянном расходе сверхкритического диоксида углерода. Процесс проводится при постоянных рабочих параметрах: расходе сверхкритического диоксида углерода, температуре и давлении. После определенного периода времени изотермически понижали давление до атмосферного с постоянным расходом экстрагента. Полученный экстракт собирали в виале.

Жидкостная экстракция проводилась в несколько этапов: подготовка сырья; термостатирование, вакуумное фильтрование. Благодаря повторению этапов подготовки сырья перед проведением экстракции, полученные результаты можно сравнить. Сырье предварительно измельчали. Полученную навеску добавляли в 33 % этиловый спирт. Смесь из этилового спирта и растительного сырья помещали в термостат при постоянной температуре на строго заданный период времени. После термостатирования экстракт получали путем вакуумного фильтрования. Для этого смесь помещали в воронку Бюхнера. Получаемый экстракт собирали в колбе Бунзена.

Анализ образцов полученных экстрактов проводили с использованием масс-спектрометра модели LCMS-8040, соединенного с ВЭЖХ-хроматографом Shimadzu Nexera XR спектрофотометрическим детектором на диодной матрице SPD-M20A. Выход определяли через процентное содержание БАВ в исследуемых экстрактах. Качественный анализ проводился по данным ВЭЖХ-МС на основании литературных данных [14].

Результаты. На основе результатов ВЭЖХ-МС определены массовый выход гинзенозидов Rg10, Rg9 20(z) – Rg9, Rg1, Rb1 и 20-gluco-Rf. Состав экстрактов женьшеня, полученных методом СКЭ и жидкостной экстракцией, соответствует литературным данным [14]. Массовый выход гинзенозидов в экстрактах СКЭ более чем в 1,2 превысил массовый выход методом жидкостной экстракции.

Дискуссия. Анализы образцов указывают на то, что:

- сверхкритическая экстракция позволяет увеличить массовый выход БАВ;
- качественный анализ фракционного состава экстракта женьшеня методом СКЭ при заданных температуре и давлении указывает на целостность термолабильных БАВ и отсутствие конформационных изменений белка, что способствует сохранению биологической ценности экстракта и его возможности применения в качестве фармацевтического препарата и добавок к пищевым продуктам.

Заключение. По результатам экспериментальных и аналитических данных можно предположить, что: применение сверхкритических технологий эффективно для получения гинзенозидов из женьшеня; процесс СКЭ сохраняет целостность БАВ веществ наряду с их высоким массовым выходом; в дальнейших работах будут подробно исследованы биологическая активность полученных экстрактов.

Литература

- В.В. Кафаров Исследование и оптимизация процесса твердофазной экстракции биологически активных веществ из растительного сырья / МХТИ им. Д.И. Менделеева. – 1979. – №.106. – С. 48–53.
- Saini A., Panesar P.S. Beneficiation of food processing by-products through extraction of bioactive compounds using neoteric solvents // LWT. – 2020. – V. 134. – P. 1–44.
- M. Herrero, J.A. Mendiola, A. Cifuentes, E. Ibáñez. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications // Journal of Chromatography a. – 2010. – T. 1217. – №. 16. – С. 2495–2511.
- C. Tsaltaki, M. Katsouli, T. Kekes, S. Chanioti, C. Tzia. Comparison study for the recovery of bioactive compounds from Tribulus terrestris, Panax ginseng, Ginkgo biloba, Lepidium meyenii, Turnera diffusa and Withania somnifera by using microwave-assisted, ultrasound-assisted and conventional extraction methods //Industrial Crops and Products. – 2019. – V. 142. – P. 1–9.
- G. Brunner. Supercritical fluids: technology and application to food processing //Journal of food engineering. – 2005. – V. 67. – №. 1–2. – С. 21–33.
- Capuzzo A., Maffei M.E., Occhipinti A. Supercritical fluid extraction of plant flavors and fragrances // Molecules. – 2013. – V. 18. – № 6. – P. 7194–7238.
- Sahena F. et al. Application of supercritical CO₂ in lipid extraction—A review //Journal of Food Engineering. – 2009. – T. 95. – №. 2. – С. 240–253.
- T. Anukiruthika, S. Dutta, J.A. Moses, C. Anandharamkrishnan. Modern Applications of Supercritical Fluids Extraction in Food Toxicology. – 2021. – P. 640–659.
- Awasthi A., Trivedi R.K. A review on supercritical carbon dioxide extraction of natural products // Chemical engineering world. – 1997. – T. 32. – №. 10. – С. 65–71.
- Da Silva R.P., Rocha-Santos T.A., Duarte A.C. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds // TrAC Trends in Analyt. Chem. – 2016. – V. 76. – P. 40–51.
- Saba E., Lee Y.Y., Kim M., Kim S.H., Hong S.B., Rhee M.H. A comparative study on immune-stimulatory and antioxidant activities of various types of ginseng extracts in murine and rodent models // Journal of ginseng research. – 2018. – V. 42. – №. 4. – P. 577–584.
- Kim I.W., Sun W.S., Yun B.S., Kim N.R., Min D., Kim S.K. Characterizing a full spectrum of physico-chemical properties of (20S) – and (20R) – ginsenoside Rg3 to be proposed as standard reference materials // Journal of ginseng research. – 2013. – V. 37. – №. 1. – P. 124.
- Государственный реестр лекарственных средств. Интернет ресурс: (Дата обращения: 26.07.2021) – <https://grls.rosminzdrav.ru/>
- Lee S.M. et al. Characterization of Korean Red Ginseng (Panax ginseng Meyer): History, preparation method, and chemical composition //Journal of ginseng research. – 2015. – T. 39. – №. 4. – С. 384–391.

УСКОРЕННЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУБСТРАТНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ dNTP С ДНК-ПОЛИМЕРАЗАМИ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В SELEX

С.А. Лапа, О.С. Волкова, С.В. Вишнякова, В.Е. Шершов, А.В. Чудинов

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

Аптамеры – нуклеиновые аналоги антител. Процесс отбора аптамеров к их мишеням называется SELEX. Для создания аптамеров с расширенными свойствами используют модифицированные dNTPs, которые встраиваются ДНК-полимеразами. При недостаточной совместимости модифицированных dNTPs с полимеразой может происходить конкурентная амплификация последовательностей исходной ДНК-библиотеки. Часто низкая эффективность встраивания модификаций остается незамеченной, но в результате библиотека будет обеднена модифицированными аптамерами.

Ранее нами было показано, что в процессе обогащения ДНК-библиотеки кривая при её амплификации в режиме реального времени с каждым следующим раундом приближается по форме к канонической кривой, характерной для фиксированной последовательности ДНК [1]. Это является показателем обогащения библиотеки специфичными к мишени олигонуклеотидами. Однако, библиотека может обогащаться не специфичными, а наиболее легко амплифицируемыми последовательностями.

Нами предложен метод быстрой оценки субстратной совместимости модифицированных трифосфатов дезоксинуклеозидов и ДНК-полимераз. Для этого проводят три последовательных раунда амплификации исходной ДНК-библиотеки (без трудоемких и сложных стадий селекции аптамеров). В случае совместимости с полимеразой форма кривой остается прежней, при несовместимости – приближается к канонической кривой (Рис. 1).

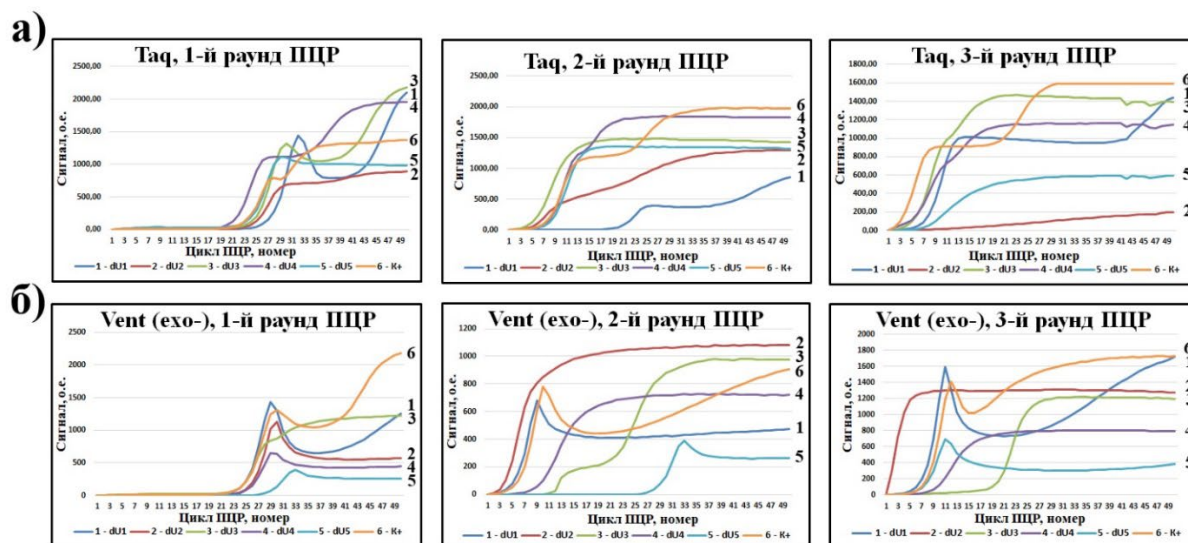


Рисунок 1. Кривые амплификации с модифицированными dUTPs и ДНК-полимеразами: а) Taq и б) Vent (exo-).

Для использования в SELEX пригодны лишь те модифицированные dNTPs, которые на протяжении как минимум трёх раундов амплификации не меняют характер кривой накопления сигнала.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 19-04-01217.

Литература

1. С.П. Радько, С.А. Лапа, А.В. Чудинов, С.А. Хмельова, М.М. Маннанова., Л.К. Курбатов, Я.Ю. Киселёва, А.С. Заседателей, А.В. Лисица. Оценка разнообразия комбинаторных ДНК-библиотек на основе анализа формы амплификационных кривых для мониторинга эффективности селекции аптамеров. // Биомед. Хим. – 2019. – Т. 65. – Стр. 477–484.

УДК 378.046.4

**РАЗРАБОТКА ТРЕНАЖЕРА ВИРТУАЛЬНОЙ РЕАЛЬНОСТИ ДЛЯ СОВРЕМЕННОГО
БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА*****С.Г. Литвинец, Е.А. Мартинсон****Вятский государственный университет, Киров, Россия*

Опережающее обучение в условиях развития биофармацевтики крайне актуально и призвано обеспечить высококвалифицированными кадрами потребности инновационных предприятий, разрабатывающих и использующих современные биотехнологии.

Появление новых предприятий, внедрение и трансфер новых технологий требуют формирования необходимых компетенций у инженерно-технического персонала, участвующего в производстве биофармацевтических препаратов, с использованием современных образовательных технологий.

Перспективным является использование современных методов обучения, основанных на технологиях виртуальной реальности (VR). VR-технологии позволяют моделировать реальные производственные условия, способствуют чёткой выработке последовательностей производственных действий, позволяют сформировать необходимые рабочему персоналу навыки; могут служить средством периодического контроля правильности выполнения операций, позволяют моделировать нештатные ситуации.

Способность выполнения технологических операций в асептических условиях требует практических навыков работы на высокотехнологичном оборудовании, использования контрольно-измерительных приборов, соблюдения техники выполнения работ в асептических условиях. При этом формирование навыков выполнения технологических операций непосредственно в асептической зоне крайне затруднительно в силу опасности подвергнуть все производство контаминации в случае ошибочных действий обучаемого персонала.

ФГБОУ ВО «ВятГУ» в партнерстве с ООО «НАНОЛЕК», при поддержке Фонда инфраструктурных и образовательных программ Группы РОСНАНО, разработан тренажер виртуальной реальности, позволяющий вне асептической зоны отработать навыки работы в изоляторе, навыки поведения персонала в чистой зоне, навыки выполнения производственных операций, подготовки и обслуживания оборудования, необходимые на производстве стерильных биофармацевтических препаратов в соответствии с требованиями GMP.

В тренажере реализованы несколько производственных сценариев (кейсов), соответствующих трудовым функциям различных категорий рабочего персонала (переодевание и вход в чистую зону, очистка оборудования и проверка помещения, приготовление растворов и питательных сред, стерилизация растворов, фильтрование растворов, выполнение соединений и сборок с помощью асептических коннекторов, розлив в изоляторе и др.); в тренажере отражены и зафиксированы критически значимые моменты в процессе асептического производства – запланированные вмешательства.

Тренажер виртуальной реальности выполняет несколько функций: обучение, самоконтроль и контроль навыков. В обучающем режиме тренажера активны элементы управления с наличием всплывающих подсказок.

Для создания виртуальной производственной среды использованы планировки помещений асептической зоны, оборудование производственной линии розлива препаратов во флаконы действующего фармацевтического предприятия. Все созданные объекты обладают свойствами, аналогичными реальным (цвета, текстуры материалов и т. д.).

В тренажере реализована анимация: обучаемый передвигается в виртуальном пространстве, смотрит на объекты с различных сторон, взаимодействует с ними или их частями, имитируя реальные технологические операции; интерфейс и навигация в тренажере интуитивны и наглядны, максимально соответствуют действиям пользователя в реальной производственной деятельности.

УПРАВЛЕНИЕ ПРОФИЛЕМ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ДОКСОРУБИЦИНА ИЗ НАНОРАЗМЕРНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ НА ОСНОВЕ СОПОЛИМЕРА МОЛОЧНОЙ И ГЛИКОЛЕВОЙ КИСЛОТ (PLGA)

Ю.В. Ермоленко, Н.А. Назарова, Н.С. Осипова, Т.С. Ковшова, С.Э. Гельперина

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

Введение. Лекарственные формы (ЛФ) на основе сополимеров молочной и гликолевой кислот (PLGA) находят применение в фармацевтике, медицине и биомедицинских исследованиях. Наноразмерные формы на основе PLGA чаще всего используют для разработки на их основе систем направленной доставки лекарственных веществ [1,2] для противопухолевой терапии [3,4], терапия внутриклеточных инфекций [5] или при создании тераностиков [6]. Важнейшей характеристикой ЛФ на основе наночастиц (НЧ) является профиль и скорость высвобождения из нее лекарственного вещества (ЛВ), который изучают в эксперименте *in vitro*. В случае полимер-содержащих ЛФ управлять скоростью высвобождения ЛВ можно путем подбора полимерного состава матрицы НЧ или функционализации их поверхности [7–9]. Целью представляемого исследования является изучение влияния на профиль высвобождения доксорубина (Докс) из PLGA НЧ введением в их состав низкомолекулярной олигомерной фракции молочной кислоты (OLA).

Материалы и методы. В работе использовали следующие полимеры: сополимер молочной и гликолевой кислот Resomer® RG 502H (лактид: гликолид 50:50, с концевыми кислотными группами, ММ ~ 10 кДа) (Evonik Nutrition & Care GmbH, Германия) (PLGA); доксорубин гидрохлорид (99,0 %, Yick-Vic Chemicals & Pharmaceuticals, Китай; 99,0 %, Sigma-Aldrich, Германия) (Докс); поливинилловый спирт (ПВС) 9–10 кДа, степень гидролиза 80 % (Sigma-Aldrich, США); маннитол-D (Диа-М, Россия); полоксамер 188 (Kolliphor® P 188, BASF, Германия); олигомер молочной кислоты (OLA), средняя молекулярная масса 1068 Да (РХТУ им. Д.И. Менделеева). Все органические растворители и соли, используемые в работе, соответствовали чистоте «для ВЭЖХ» или «хч».

Получение PLGA НЧ: PLGA, PLGA/OLA, PLGA/Докс, PLGA/OLA/Докс. НЧ получали методом эмульсионной гомогенизации высокого давления с последующим испарением органического растворителя и лиофилизацией с добавлением маннита в качестве криопротектора. Применяли метод двойных эмульсий. Навески полимера (PLGA) или его смеси с OLA (10:1 или 5:1 в/в) растворяли в дихлорметане и вносили получившийся раствор в 0,001 н. водный раствор соляной кислоты (в случае получения НЧ, нагруженных Докс, в этом растворе растворяли необходимую навеску Докс). Полученную эмульсию гомогенизировали сначала на диспергаторе (Ultra-Turrax T18 Basic), а затем объединяли ее с 1 % водным раствором ПВС и еще раз гомогенизировали сначала на диспергаторе, а затем на гомогенизаторе высокого давления (M-110P, Microfluidics). После удаления дихлорметана на роторном вакуумном испарителе (Laborota 4000, Heidolph) полученные суспензии фильтровали и добавляли к ним маннит. Далее суспензии разливали во флаконы и лиофилизировали (Alpha 2–4 LSCplus).

Характеристика полученных наночастиц. Гидродинамический диаметр (далее, размер) и дзета-потенциал (далее, заряд) поверхности полученных НЧ определяли с использованием анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Великобритания), для чего применяли методы динамического лазерного светорассеивания и микроэлектрофореза, соответственно. Количество кислотных групп на поверхности PLGA и PLGA/OLA НЧ определяли методом обратного потенциометрического микротитрования с использованием рН-метра (PCE-228) и стеклянного электрода. Содержание Докс в НЧ определяли спектрофотометрически (UV-1800 Shimadzu, Япония, кювета кварцевая 1 см) по собственному поглощению Докс ($\lambda = 481$ нм), используя построенную градуировочную прямую. Степень включения определяли по разнице между содержанием Докс в лиофилизате и содержанием его в супернатанте после отделения НЧ. Содержание PLGA во флаконах с НЧ определяли методом капиллярного электрофореза (описано ниже).

Изучение профиля гидролитической деградации PLGA НЧ. Содержимое флаконов с НЧ ресуспендировали в 50 мМ фосфатных буферных смесях с pH 7,4 и 4,5. Концентрация НЧ (в пересчете на PLGA) в инкубационной среде составляла 400 мкг/мл. Суспензии НЧ инкубировали при 37 °С и непрерывном перемешивании (200 об/мин). С заданным временным интервалом отбирали по 500 мкл суспензий НЧ, центрифугировали их в пробирках с фильтрами Amicon® Ultra 100 MWCO при 25 °С, 13,2 об/мин, 20 мин. Концентрацию PLGA, перешедшего в инкубационную среду, определяли методом капиллярного электрофореза (КЭ) (Капель 105М, Люмэкс, Россия) после гидролиза до молочной и гликолевой кислот (1 н NaOH, 37°С, 24 ч). Использовали косвенное спектрофотометрическое детектирование. Условия КЭ: кварцевый капилляр (внутренний диаметр 75 мкм, эффективная длина 50 см, общая длина 60 см); ввод пробы гидродинамический: 30 мбар, 10 сек.; U= -20 кВ. Температура 20 °С, $\lambda = 258$ нм. Состав ведущего электролита: бензойная кислота (10 мМ), цетилтриметиламмония гидроксид (0,5 мМ), диэтаноламин (до pH 5,3). Концентрацию PLGA определяли по площади пика гликолята на электрофореграммах гидролизата.

Изучение профиля высвобождения Докс из PLGA НЧ. Скорость высвобождения Докс из НЧ изучали in vitro в модельной среде (1 % раствор полоксамера 188). Лиофилизат НЧ ресуспендировали в инкубационной среде, объем доводили до концентрации Докс 68 мкг/мл. Полученные суспензии инкубировали при +37 °С (200 об/мин), через заданные интервалы времени (1, 2, 3, 4, 6 и 24, 48 ч) отбирали по 1,5 мл суспензии наночастиц. Образцы суспензии центрифугировали (Avanti JXN-30, 20000 об/мин / 48 254 × g, +5 °С, 30 мин). Далее отбирали по 200 мкл супернатанта и определяли концентрацию высвободившегося Докс спектрофотометрически.

Результаты. Для установления влияния добавки OLA на профиль высвобождения Докс из НЧ PLGA получали НЧ, нагруженные Докс, из двух типов полимерных композиций: без добавления (PLGA/Докс) и с добавлением OLA (PLGA/OLA/Докс). Загрузочное массовое соотношение полимеров PLGA:OLA в последнем случае соответствовало 10:1. Для установления влияния добавки OLA на скорость гидролитической деградации НЧ получали НЧ placebo, без OLA (PLGA) и с добавкой OLA (PLGA/OLA), загрузочное массовое соотношение PLGA:OLA составляло 5:1. Характеристики полученных в работе НЧ приведены в таблице 1.

Таблица 1. Характеристики PLGA НЧ, n = 3, P = 0,95

Тип НЧ	Размер, Z-Ave d, нм	PDI	ζ-потенциал, мВ	Содержание PLGA во флаконе, мг	Содержание кислотных групп, n(1/1COOH), мкмоль/мг НЧ	Содержание Докс (мкг Докс/мг PLGA)/ Степень включения Докс, %
PLGA	127,1 ± 0,7	0,085	-36,4 ± 1,1	10,7 ± 1,5	0,231	–
PLGA/OLA	138,4 ± 1,6	0,069	-33,0 ± 2,8	8,45 ± 1,1	0,313	–
PLGA/Докс	110,9 ± 1,8	0,146	-10,0 ± 0,8	10,5 ± 1,9	–	96,0 ± 5,0 / 89,7
PLGA/OLA/Докс	105,8 ± 0,9	0,105	-12,0 ± 0,9	11,8 ± 1,8	–	95,2 ± 4,0 / 98,6

В ходе гидролитической деградации НЧ PLGA и PLGA/OLA определяли долю перешедшего в раствор PLGA по концентрации гликолята в инкубационной среде, изменяющейся во времени. Полученные профили приведены на рисунке 1. Профили высвобождения Докс из НЧ двух типов (с добавкой OLA и без нее) представлены на рисунке 2.

Дискуссия. Сравнение размеров полученных в эксперименте НЧ (табл. 1) показывает, что по данному параметру НЧ не сильно отличаются (наибольшая разница между НЧ PLGA/OLA и НЧ PLGA/OLA/Докс составляет 32,6 нм). Следует отметить, что введение Докс в НЧ несколько уменьшает их размер, причем наиболее существенно влияние Докс отмечено для НЧ с OLA. Все полученные НЧ имеют отрицательный заряд поверхности, но, вопреки ожиданию, введение OLA в НЧ не приводит к значимым изменениям величины ζ-потенциала их поверхности. Видимо, таким образом сказывается участие в образовании двойного электрического слоя на поверхности НЧ молекул ПВС, который можно отнести к неионогенным ПАВ. Введение Докс в состав НЧ ожидаемо уменьшает величину отрицательного заряда поверхности в обоих случаях, что, вероятно, происходит из-за связывания аминокрупп, входящих в состав его молекулы с карбоксильными группами полимеров.

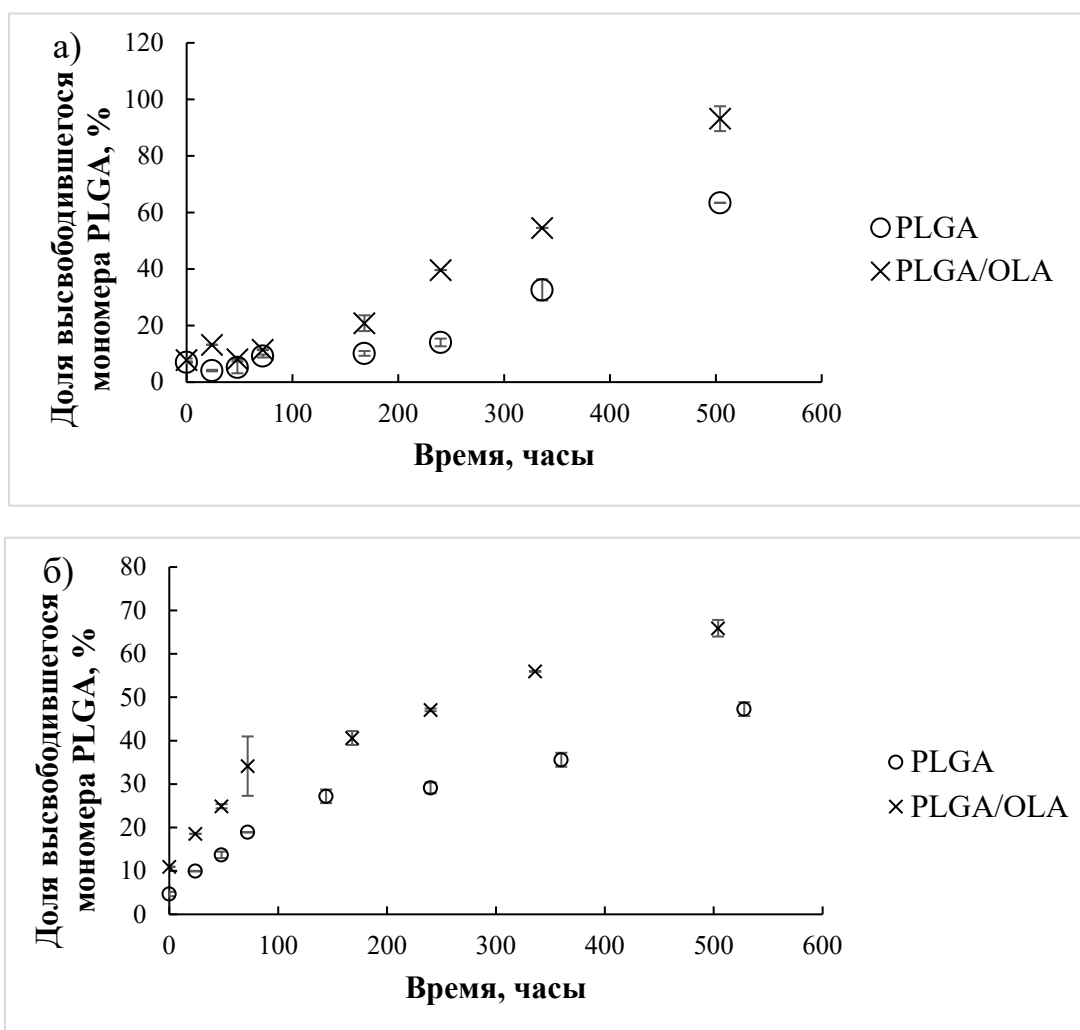


Рис. 1 Профили гидролитической деградации PLGA и PLGA/OLA а) pH 4,5; б) pH 7,4

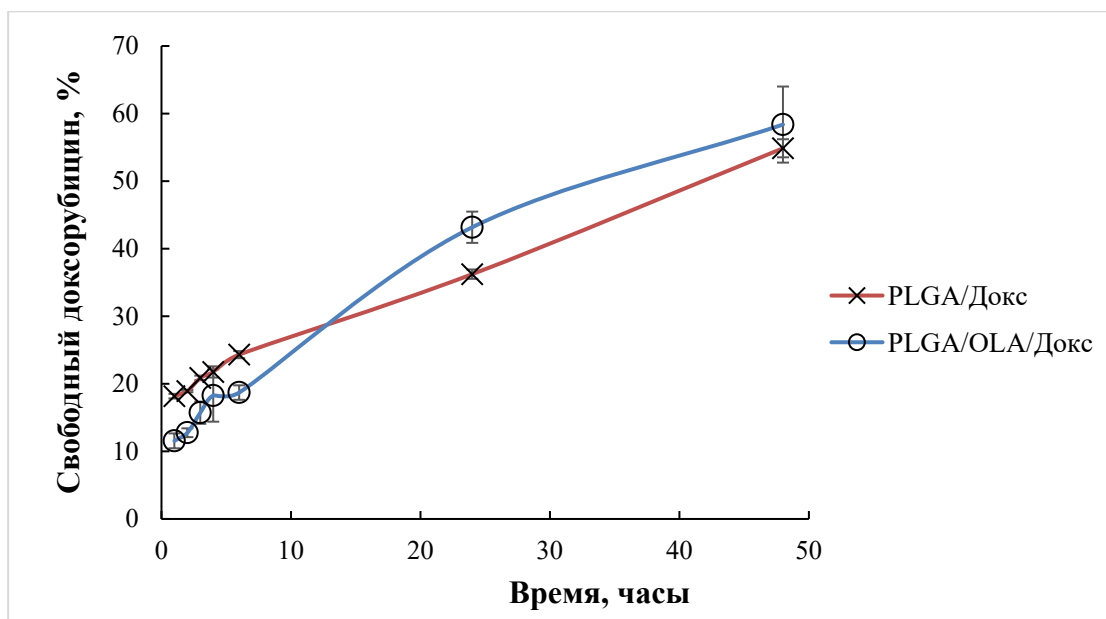


Рис. 2 Влияние добавки OLA к PLGA на профиль высвобождения Докс из НЧ

Как было показано ранее [10], в составе наноразмерной PLGA ЛФ основное количество Докса находится в приповерхностном слое НЧ и, соответственно, он существенно влияет на поверхностный заряд НЧ.

Известно, что биodeградация PLGA НЧ протекает в основном путем гидролиза [11]. Изучение влияния введения OLA на скорость гидролитической деградации PLGA НЧ (рисунок 1) показало, что при pH 4,5 и pH 7,4 в фосфатных 50 мМ буферных растворах введение в полимерный состав OLA (OLA : PLGA = 1:5) значительно ускоряет процесс гидролиза НЧ. Так, при гидролизе при pH 4,5 за 21 день гидролизуется 93 % PLGA из НЧ PLGA/OLA, в то время как без добавки OLA, этот показатель составляет только 63 %. При pH 7,4 гидролитическая деградация НЧ идет медленнее, но влияние добавки OLA сохраняется: на 21 день гидролизовано 61 % и 47 % полимера, соответственно. Важно, что значимые различия в доле высвободившегося PLGA наблюдаются во всех временных точках, начиная с первого часа (нулевая точка) для pH 7,4 и с 24 часа для pH 4,5.

Ускорение скорости гидролитической деградации НЧ при введении в их состав низкомолекулярной олигомерной фракции закономерно и его можно объяснить действием нескольких факторов: 1) увеличение кислотных групп в составе полимера катализируют его гидролиз; 2) при введении низкомолекулярной водорастворимой фракции OLA происходит гидрофилизация полимерного ядра НЧ, что способствует ускорению процесса диффузии молекул воды внутрь PLGA НЧ и к ускорению гидролиза полимера.

Далее изучали влияние добавки OLA (OLA : PLGA = 1:10) на релиз Докс из НЧ (рисунок 2). Как следует из данных таблицы 1, при введении в полимер добавки OLA включение Докс в PLGA НЧ увеличивается до 98,6 % (PLGA/OLA/Докс) против 89,7 % (PLGA/Докс). Это объясняется тем, что увеличение концентрации поверхностных кислотных групп в НЧ, содержащих OLA (табл. 1), способствуют связыванию Докс с участием его аминогрупп, так как молекула Докс достаточно гидрофильна и доля его ионизированных молекул в кислой среде (0,001 н HCl при получении НЧ) велика. Сравнение профилей высвобождения Докс из НЧ двух типов (рисунок 2), показывает, что в случае добавки в состав НЧ OLA высвобождение из них Докс в первой точке (0 часов) значительно меньше и составляет 11,56 % против 20,41 % для PLGA/Докс. Со временем разница в доле высвободившегося Докс из НЧ двух типов уменьшается. Так, через 1 ч инкубации высвобождение составило 18,2 % для PLGA/Докс и 11,6 % для PLGA/OLA/Докс и через 6 ч 24,3 % и 18,7 %, соответственно. Таким образом, введение OLA уменьшает высвобождение Докс в первые часы инкубации, делая менее заметным так называемый «burst-effect» (высвобождение лекарства в первые часы после начала инкубации). В дальнейшем скорость высвобождения Докс из обоих типов НЧ выравнивается и разница становится не значимой.

Заключение. Введение добавки олигомерной фракции полимолочной кислоты (1 кДа) к PLGA (лактид: гликолид 50:50, 10 кДа) в массовом соотношении 1:10 существенно сказывается на профиле высвобождения доксорубина из ЛФ на основе PLGA НЧ (in vitro). Наибольшие отличия – замедление высвобождения антибиотика – наблюдаются в первые 15 часов (уменьшение burst-эффекта). Наблюдаемое уменьшение скорости высвобождения ЛВ, вероятно, объясняется более эффективным удерживанием молекулы Докс в полимерной матрице в результате электростатического взаимодействия.

Введение OLA существенно ускоряет гидролитическую деградацию НЧ PLGA: 20 %-ная по массе добавка приводит к ускорению процесса, начиная с первых часов наблюдения. Максимальная разница в долях высвободившегося PLGA составляет 93 % против 63 % в случае гидролитической деградации при pH 7,4 в среде 5 мМ фосфатного буферного раствора. Однако установленный фактор ускорения гидролитической деградации НЧ при введении в их состав добавки OLA на процесс высвобождения Докс из НЧ не оказывает существенного влияния и не ускоряет этот процесс в наблюдаемом периоде времени (50 часов).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект 19-015-00155.

Авторы выражают благодарность сотрудникам РХТУ им. Д.И. Менделеева Мантрову Сергею Николаевичу за разработку методики синтеза OLA и Семенкину Алексею Сергеевичу за синтез OLA.

Литература

- Гельперина С.Э. и Швец В.И. 2009 Системы доставки лекарственных веществ на основе полимерных наночастиц *Биотехнология* **3** 8–23
- Bala I., Hariharan S. and Kumar R. 2004 PLGA Nanoparticles in Drug Delivery: The State of the Art *Critical Reviews in therapeutic Drug Carrier Systems* **21(5)** 387–422
- Rezvantab S., Drude N.I., Moraveji M.K., Güvener N., Koons E.K., Shi Y, Lammers T and Kiessling F. 2018 PLGA-Based Nanoparticles in Cancer Treatment *Frontiers in Pharmacology* **9** 1260
- Gupta P.N., Jain Sh., Nehate Sh., Alam N., Khare V., Dubey R.D., Saneja A., Kour S., Singh Sh. K. 2014 Development and evaluation of paclitaxel loaded PLGA:poloxamer blend nanoparticles for cancer chemotherapy *International Journal of Biological Macromolecules* **69** 393–399
- Farazuddin M. et al. 2010 Efficacy of amoxicillin bearing microsphere formulation in treatment of *Listeria monocytogenes* infection in Swiss albino mice *Journal of drug targeting* **18 (1)**. – 45–52
- Ghitman J., Biru E.I., Stan R., Iovu H. 2020 Review of hybrid PLGA nanoparticles: Future of smart drug delivery and theranostics medicine *Materials and Design* **193** 108805
- Budhian A., Siegel S.J. and Winey K.I. 2008 Controlling the in vitro release profiles for a system of haloperidol-loaded PLGA nanoparticles *International Journal of Pharmaceutics* **346** 151–159
- Cao Y., Wang B., Wang Y. and Lou D. 2014 Polymer controlled core-shell nanoparticles: A novel strategy for sequential drug release *RSC Advances* **4 (57)** 30430–30439
- Luo R., Neu B. and Venkatraman S.S. 2012 Surface Functionalization of Nanoparticles to Control Cell Interactions and Drug Release *Small* **8(16)** 2585–2594
- Ковшова Т.С., Осипова Н.С., Фортунa А.С., Ермоленко Ю.В., Максименко О.О., Балабаньян В.Ю., Гельперина С.Э. 2020 Оптимизация методов оценки степени включения доксорубина в наночастицы на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA) *Разработка и регистрация лекарственных средств* **9(2)** 113–118
- Makadia H., Siegel S. 2011 Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier *Polymers*, 2011, **3**, 1377–1397

УДК 577.322

РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ПОДХОДА, ОСНОВАННОГО НА ОБНАРУЖЕНИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКЕ САЙТОВ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ВЭЖХ-МС/МС В БЕЛКОВЫХ КОМПОНЕНТАХ ПЛАЗМЫ КРОВИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ УПРОЩЕННОЙ ОДНОСТАДИЙНОЙ МЕТОДИКИ ПРОБОПОДГОТОВКИ)**В.С. Иванов, А.Д. Васильева, Д.Ю. Азарова, А.С. Кононихин, М.А. Розенфельд***Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия*

Фибриноген, ключевой белок системы свертывания крови, среди всех белков плазмы проявляет самую высокую чувствительность к воздействию окислителей [1]. Окислительная модификация белков может привести к фрагментации боковой и основной цепи, агрегации посредством ковалентного поперечного сшивания и нарушению конформации, сопровождающим повышение гидрофобности молекулы и приводящим к изменению взаимодействий с биологическими партнерами [2]. Окисление фибриногена ведет к изменению процесса самосборки фибрина и формированию аномальных тромбогенных сгустков. Они характеризуются тонкими индивидуальными фибриновыми фибриллами, малой пористостью, низкой проницаемостью и, как следствие, повышенной устойчивостью к плазминовому гидролизу [3].

Разработка эффективной методики, которая бы включала выделение целевого белка из исследуемого образца плазмы или любой другой физиологической жидкости с последующим гидролизом выделенного белка для дальнейшего анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) с исключением большого количества стадий процесса (например, многочисленных стадий переосаждения, различных видов хроматографии при выделении целевых белков) и использования агрессивных условий (например, при элюировании белков с носителей), а также с уменьшением общей трудоемкости и времени подготовки проб к анализу, является необходимой для использования в протеомных исследованиях.

В рамках данного исследования была разработана и опробована методика ферментативного гидролиза на магнитных частицах за исключением стадии элюирования для дальнейшего анализа с помощью ВЭЖХ – МС/МС, позволила: 1) упростить процедуры при работе с большим количеством образцов, 2) сократить общее время анализа, 3) во избежание появления окислительных модификаций, не связанных с патологическими условиями или вызванных окислением, но возникающих в результате длительной подготовки образца или использования агрессивных условий элюирования, которые препятствуют анализу результатов.

В работе использовали оборудование ЦКП ИБХФ РАН.

Исследование выполнено в рамках бюджетного финансирования по Государственному заданию (тема 0084–2014–0001 и 0084–2014–0005) и при финансовой поддержке гранта РНФ № 21–74–00146.

Литература

- Shacter E., Williams J.A., Levine R.L. Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by western blot immunoassay. *Free Radic. Biol. Med.* 1994; 17:429–437.
- Davies M.J. Protein oxidation and peroxidation. *Biochem J.* 2016; 473(7):805–825. doi:10.1042/BJ20151227.
- Katie M. Weigandt, Nathan White, Dominic Chung, Erica Ellingson, Yi Wang, Xiaoyun Fu, and Danilo C. Pozzo. Fibrin Clot Structure and Mechanics Associated with Specific Oxidation of Methionine Residues in Fibrinogen // *Biophysical Journal*. 2012. Vol. 103, P. 2399–2407.

ДИНАМИКА АНТИТЕЛОБРАЗОВАНИЯ И ИЗОТИПЫ АНТИТЕЛ В ИММУННОМ ОТВЕТЕ МЫШЕЙ BALB/C НА S БЕЛОК ВИРУСА SARS-COV-2

В.Ю. Кан, А.Д. Бидина, А.Т. Ожаровская, Д.В. Воронина, О.В. Зубкова

НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

Вирус SARS-CoV-2, возникший в декабре 2019 года, вызывает тяжелый острый респираторный синдром и является причиной пандемии COVID-19. Вакцины представляют собой важную контрмеру и необходимы для борьбы с пандемией. Для оценки вакцин-индуцированного иммунного ответа необходимо изучение динамики различных антител. Имеющиеся исследования показывают, что титры IgA и IgG1 у заболевших коррелируют с титром нейтрализующих антител, а преобладание субтипов IgG1 и IgG3 над IgG2/IgG4 связано с Th1-ответом и более легким течением заболевания. Данные по клиническим испытаниям вакцин против COVID-19 свидетельствуют о легко протекающей болезни у вакцинированных, а для мРНК-вакцины BNT162b1 (BioNTech SE) Th1 иммунный ответ был определен как доминантный. Таким образом, похожий профиль иммунного ответа при легком течении естественной инфекции и при иммунизации может служить показателем эффективности вакцинации.

IgG человека включают четыре субтипа: IgG1, IgG2, IgG4 и IgG3, которые соответствуют IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 у мышей. IgG1 и IgG2b вырабатываются в ответ на вирусные и бактериальные белковые антигены, в то время как IgG2a – на углеводные антигены. На субтип продуцируемых IgG влияет структура и количество антигена, а также путь и продолжительность антигенной стимуляции.

Целью данной работы являлась оценка динамики формирования различных субтипов IgG к S белку SARS-CoV-2.

Иммунную сыворотку получали путем однократного введения мышам линии BALB/c рекомбинантного аденовируса, несущего последовательность S-белка вируса SARS-CoV-2. Отбор крови производился на 21-й, 42-й день, а также на 3-й и 6-й месяцы. Титры IgG различных субтипов определяли с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). В качестве антигена использовался рецептор-связывающий домен (RBD) S-белка. Детекция IgG в сыворотке крови иммунизированных мышей проводилась с помощью козьих поликлональных антител к IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3, конъюгированных с пероксидазой хрена.

В результате нами было показано, что титр IgG всех субтипов пропорционально возрастает до 3-го месяца и составляет для IgG1 – 1:144800, IgG2a – 1:102400, IgG2b – 1:18100, IgG3 – 1:12800. После полугода титр IgG1 снижается в 5,5 раз, а IgG2a и IgG2b – в 3 раза. IgG3 на 6-ой месяц перестают детектироваться. Доминирующими субтипами в течение всего периода наблюдения были IgG1 и IgG2a. Преобладание IgG1 объясняется Th1-ориентированным иммунным ответом на вирусный антиген, а высокая концентрация IgG2a, по-видимому, обусловлена реакцией на гликановый «щит», покрывающий S-белок.

Литература

- Sahin U, Muik A, Derhovanessian E, Vogler I, Kranz LM, Vormehr M, et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. *Nature*. 2020; 586(7830):594–9.
- Visciano, M.L., Tagliamonte, M., Tornesello, M.L. *et al.* Effects of adjuvants on IgG subclasses elicited by virus-like Particles. *J Transl Med* **10**, 4 (2012).
- Harshad P. Patil, Prajakta S. Rane, Shubham Shrivastava, Sonali Palkar, Sanjay Lalwani, Akhilesh C. Mishra, and Vidya A. Arankalle. *Viral Immunology*. Apr 2021. 201–209.
- Yun Shan Goh, Jean-Marc Chavatte, Alicia Lim Jieling, Bernett Lee, Pei Xiang Hor, Sensitive detection of total anti-Spike antibodies and isotype switching in asymptomatic and symptomatic individuals with COVID-19, *Cell Reports Medicine*. Feb 2021.

УДК 66.063.62, 615.07, 618.14–006

ПОЛУЧЕНИЕ НАНОРАЗМЕРНЫХ СИСТЕМ ДЛЯ СО-ДОСТАВКИ ПАКЛИТАКСЕЛА И ПРОИЗВОДНОГО ЭТОПОЗИДА НА ОСНОВЕ АЛЬБУМИНА И СОПОЛИМЕРОВ МОЛОЧНОЙ И ГЛИКОЛЕВОЙ КИСЛОТ И СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИХ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НА ЛИНИИ КЛЕТОК МЫШИНОЙ ГЛИОМЫ GL261

Т.С. Ковишова, С.А. Бойко, Ю.А. Малиновская, М.А. Меркулова, С.Э. Гельперина

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

Введение. Во всем мире наблюдается неуклонный рост онкологических заболеваний, поэтому поиск новых методологических подходов, а также усовершенствование традиционной химиотерапии для повышения эффективности лечения злокачественных новообразований являются приоритетными задачами онкологии [1]. Принципиально новый подход к комбинированной химиотерапии рака заключается в одновременной доставке двух противоопухолевых агентов в клетку опухоли путем включения их в наноразмерную систему доставки [2]. Такие формы обеспечивают возможность внутривенного введения трудно растворимых лекарственных веществ (ЛВ), повышение стабильности ЛВ, увеличение времени циркуляции в кровотоке или облегчение доступа в целевые органы / ткани путем повышения накопления в опухоли за счет пассивного (эффект EPR, англ. *Enhanced Permeation and Retention Effect*) или активного (рецептор-опосредованного) транспорта наночастиц (НЧ), а также снижение неспецифической токсичности за счет предсказуемого изменения биораспределения ЛВ [3; 4]. Эффективность этого подхода показана в исследованиях систем для со-доставки противоопухолевых агентов паклитаксела (PTX) и этопозид (ЕТР), которые обладают низкой растворимостью в воде и относятся к IV классу ЛВ по БКС, для лечения рака молочной железы, рака лёгких, остеосаркомы, а также злокачественных глиом [5–8]. В соответствии с принципами комбинированной химиотерапии данные ЛВ имеют различные механизмы действия [9,10]. Эффективность РТХ и ЕТР в комбинации с другими агентами в составе НЧ активно исследуется *in vitro* и *in vivo* в отношении мультиформной глиобластомы – наиболее распространенной и агрессивной глиомы [11, 12]. Для создания систем для со-доставки РТХ и ЕТР часто используют амфифильные самособирающиеся синтетические полимеры (PLGA, PEG-PLA и т.д.) [3], в то время как использование НЧ на основе человеческого сывороточного альбумина менее изучено.

Целью настоящего исследования было изучение возможности разработки системы для со-доставки РТХ и ЕТР наноразмерных систем на основе человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) и сополимеров молочной и гликолевой кислот (PLGA) и сравнительное исследование цитотоксичности полученных форм *in vitro* на линии клеток мышинной глиомы GL261.

Материалы и методы. В работе использовали; этопозид (100 %, QILI ANTIBIOTICS, Linyi, Китай); паклитаксел (99,81 %, Shanghai Jinhe Bio-Technology Co., Ltd, Китай.); р-р человеческого сывороточного альбумина (HSA, 20 %, Плазбумин-20®, Grifols Therapeutics Inc., США); сополимер молочной и гликолевой кислот Resomer® RG 502H (лактид: гликолид 50:50) (Evonik Nutrition & Care GmbH, Германия) (PLGA), поливиниловый спирт (ПВС, 9–10 кДа, степень гидролиза 80 %, Sigma, Германия); D-маннит (Диа-М, Россия); хлористый метилен (ДХМ), ацетон, этиловый спирт, натрия хлорид (99 %, Sigma, Германия), среда для культивирования клеток DMEM (Thermo Fisher Scientific, США), полисорбат 80 (Tween® 80) (Sigma, Германия), дигидрофосфат калия (Sigma-Aldrich, США), гидрофосфат натрия (Sigma-Aldrich, США); эстераза из печени свиньи лиофилизированная (Sigma-Aldrich, США); ацетонитрил (АЦН) 99,9 % и метанол (MeOH) 99,8 % марки «для ВЭЖХ».

Получение производного ЕТР. Для повышения степени включения ЕТР в НЧ на основе ЧСА и PLGA синтезировали гидрофобное 4'-О-бензилоксикарбонильное производное ЕТР, Рис. 1, (4'-O-benzoyloxycarbonyl ЕТР, ЕТР-cbz), описанное ранее в [13], посредством взаимодействия ЕТР с бензилхлорформиатом в тетрагидрофуране, продукт очищали препаративной хроматографией. Структуру ЕТР-cbz подтверждали данными элементного анализа и ЯМР-спектроскопии и исследовали *in silico* с использованием Molinspiration Cheminformatics для определения молекулярных свойств.

Получение НЧ. Наночастицы на основе ЧСА, содержащие бинарные комбинации ЛВ (PTX, ЕТР-cbz), были получены с использованием принципа технологии солюбилизации гидрофобных веществ альбумином, успешно используемой для производства препарата Abraxane® (наночастицы паклитаксела, стабилизированные альбумином, nab™-технология), одобренного в 2006 FDA для лечения метастатического рака молочной железы [14].

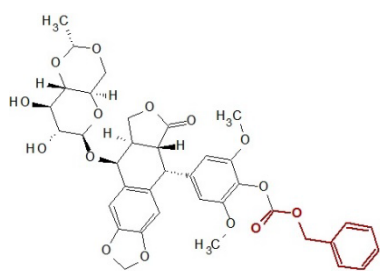


Рис. 1. Структура ETP-cbz

Навески РТХ и ЕТР-cbz в различных соотношениях (1:0, 1:1, 0:1) общей массой 60 мг растворяли в смеси 1,1 мл хлороформа и 0,1 мл 96 % этанола для получения органической фазы, которую смешивали с охлажденным до 13–14 °С 1 % водным раствором ЧСА, приготовленным путем разведения Плазбумина-20®, при этом соотношение ЛВ и ЧСА составляло 1:10. Смесь гомогенизировали, вначале используя роторный смеситель с высоким усилием сдвига Ultra-Turrax T18 Basic (IKA, Германия), а затем с помощью гомогенизатора высокого давления Microfluidizer M-110P (Microfluidics, США) при 2068 бар (30000 psi) в течение 3 мин 45 сек при охлаждении. После удаления

остаточного органического растворителя на роторном вакуумном испарителе (Laborota 4000) полученные суспензии фильтровали через фильтр 0,2 мкм, разливали во флаконы и лиофилизировали. Нагруженные РТХ и ЕТР-cbz НЧ на основе PLGA НЧ были получены методом эмульгирования под давлением с последующим удалением органического растворителя. Навеску полимера PLGA Resomer® 502H (600 мг) и ЛВ в различных соотношениях РТХ и ЕТР-cbz (1:0, 1:1, 0:1, суммарно 60 мг) растворяли в 12 мл хлористого метилена, гомогенизировали с 60 мл 1 % раствора ПВС с использованием Ultra-Turrax T18 Basic, а затем Microfluidizer M-110P при 1034 бар (15000 psi) в течение 2 мин при охлаждении. Остаточный органический растворитель удаляли под вакуумом. Добавляли криопротектор маннит (1 %) и лиофилизировали.

Изучение физико-химических параметров НЧ. Средний размер НЧ (ZaveD) и распределение по размерам (PDI), а также ζ -потенциал поверхности (ZP) определяли с помощью анализатора Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, Великобритания). Содержание ЕТР-benz и РТХ в НЧ определяли методом ВЭЖХ (LC-20, Shimadzu, Япония). В случае НЧ на основе ЧСА лиофилизат разбавляли MeOH, обрабатывали УЗ, центрифугировали (15000 g; 10 мин) и анализировали супернатант (метод а, таблица 1). В случае PLGA НЧ в лиофилизат добавляли АЦН, диспергировали УЗ до однородного состояния, центрифугировали (15000 g; 20 мин, 20 °С), супернатант разбавляли в 10 раз АЦН и анализировали методом ВЭЖХ (метод а, таблица 1). Для определения содержания ЧСА в образцах НЧ лиофилизат восстанавливали 0,9 % раствором натрия хлорида, разбавляли в 20 раз и анализировали методом ВЭЖХ (метод б, таблица 1). Содержание PLGA определяли методом капиллярного электрофореза как описано в [15] (КЭ, Капель 105М, Люмэкс, Россия). Степень включения (СВ, %) ЕТР-benz, РТХ в PLGA НЧ определяли путем отделения НЧ центрифугированием (48254 g, 30 мин, 18 °С) с последующим анализом содержания в супернатанте методом ВЭЖХ (метод а, таблица 1); нагрузку (%) рассчитывали как отношение СВ% к соотношению PLGA:ЛВ. Концентрацию дезинтеграции, C_{desint} НЧ на основе ЧСА в 0,9 % растворе хлорида натрия при 25 °С и среде DMEM при 37 °С определяли методом динамического лазерного светорассеивания по появлению фракции 7–10 нм (по объему) после серийного разведения наносуспензии.

Изучение превращения ЕТР-cbz в ЕТР в модельной среде. Для подтверждения превращения ЕТР-cbz в ЕТР, навеску субстанции ЕТР-cbz растворяли в 25 мл модельной среды (0,05 М фосфатный буфер при pH 7,4 с добавлением 1 % Tween® 80), не содержащей или содержащей эстеразу при молярном соотношении 1:4, инкубировали при 37 °С 200 об/мин (шейкер-инкубатор ES-20, Biosan). Через установленные интервалы (0, 2, 4, 6, 8, 24 и 48 ч) отбирали 1,5 мл (без замены среды), центрифугировали (48254 g, 30 мин, 18 °С), отбирали супернатант 0,5 мл и измеряли содержание ЕТР и ЕТР-cbz методом ВЭЖХ (метод в, таблица 1). Определяли % свободного ЕТР-cbz и % ЕТР-cbz, перешедшего в ЕТР через концентрацию ЕТР в среде. В случае НЧ на основе ЧСА для изучения конверсии ЕТР-cbz в cbz в присутствии и отсутствии эстеразы использовали аналогичную методику, однако при инкубации суспензии НЧ отбирали 3 мл приемной среды, центрифугировали и 1 мл супернатанта лиофильно высушивали. Далее лиофилизат растворяли в 1 мл метанола на УЗ-бане, центрифугировали (48254 g, 10 мин, 18 °С) для осаждения альбумина, и 500 мкл супернатанта отбирали для анализа методом ВЭЖХ (метод в, таблица 1).

Таблица 1. Параметры ВЭЖХ анализа для определения РТХ, ЕТР, ЕТР-cbz, ЧСА в НЧ

Хроматографическая колонка:	Метод а	Метод б	Метод в
	Partisphere TAC-1 PFP 265x4,6 мм, 5 мкм зернение	TSKgel G3000SWXL 300x7,8 мм, 5 мкм зернение	Kromasil 100-5-C18 150x4,6 мм, 5 мкм зернение
Длина волны детектирования:	228 нм (Ртх); 285 нм (ЕТР, ЕТР-cbz)	228 нм (ЧСА)	285 нм (Етр, Етр-Вз)
Температура анализа:	30° С	25° С	40° С
Подвижная фаза (ПФ)	А – H ₂ O, В – CH ₃ CN А: В = 55 : 45 (об. %) изократический режим	0,1 М К ₂ НРO ₄ , pH 7 изократический режим	А – Et ₃ N : HCOOH : H ₂ O = 1 : 1 : 998 (об.) В – Et ₃ N : HCOOH : CH ₃ CN = 1 : 1 : 998 (об.) градиентный режим: 0–7 мин: А 75 % 7–23 мин: А 75 % → 27 % 23–25 мин: А 27 % → 75 % 25–40 мин: А 75 %
Объём ввода пробы – 10 мкл, скорость потока ПФ – 1 мл/мин			

Изучение профиля высвобождения ЕТР-cbz и РТХ из НЧ на основе PLGA. Скорость высвобождения РТХ и ЕТР-cbz из PLGA НЧ изучали в модельной среде методом центрифугирования (без смены среды), а также методом диализа с последующим анализом содержания методом ВЭЖХ (метод а, таблица 1). Во втором случае содержимое 1 флакона ресуспендировали в 1,0 мл воды очищенной, 1,0 мл суспензии НЧ помещали в диализный мешок (предел отсечения – 10 кДа, материал – регенерированная целлюлоза, Float-A Lyzer, Spectra/Por®, США), помещали в приемную среду и инкубировали при 37 °С, 200 об/мин (шейкер-инкубатор ES-20, Biosan). Через установленные интервалы (1, 2, 4, 6 и 24 ч) отбирали по 1 мл пробы с заменой на приёмную среду анализировали.

Исследование цитотоксической активности in vitro (MTS-тест). MTS-тест выполняли согласно стандартному протоколу с модификациями Protocol TB245, Promega). В работе использовали CellTiter 96 AQueous One Solution Reagent PROMEGA, США. Клетки мышинной глиомы GL261 высаживали в 96-луночные планшеты (Corning, США) по 4×10³ клеток в 100 мкл культуральной среды (DMEM с добавлением 10 % фетальной телячьей сыворотки) за 48 ч до начала эксперимента. В части лунок культуральную среду заменяли на среду с образцами НЧ (0,625–160 мкМ в пересчете на ЛВ). В контрольные лунки к клеткам вносили 100 мкл среды. Через 48 ч инкубации определяли количество жизнеспособных клеток (%) с помощью MTS-теста (%), оптическую плотность измеряли на планшетном анализаторе Perkin Elmer Enspire, США (λ=490 нм).

Индекс взаимодействия (CI) РТХ и ЕТР-cbz, включенных в системы доставки на основе ЧСА и PLGA, рассчитывали по формуле: $CI = C_{РТХ} / IC50_{РТХ} + C_{ЕТР-cbz} / IC50_{ЕТР-cbz}$, где $IC50_{РТХ}$ и $IC50_{ЕТР-cbz}$ – IC50 для моно-формы РТХ и ЕТР-cbz, соответственно, мкМ; $C_{РТХ}$ и $C_{ЕТР-cbz}$ – IC50 для РТХ и ЕТР-cbz, соответственно, в составе системы со-доставки, мкМ. Эффект считается аддитивным при CI 0,9–1,1, синергическим при CI < 0,9, и антогонистическим при CI > 1,1.

Результаты. Ацетилирование полярных гидроксильных (фенильных) групп ЛВ бензиловым эфиром является успешной стратегией их маскировки с целью увеличения липофильности вещества и его способности проникать через клеточную мембрану [16]. Первоначально было доказано, что благодаря лабильной карбаматной связи полученное производное ЕТР-cbz превращается в ЕТР только в присутствии эстеразы (то есть является пролекарством) (Рис. 2). На основе ЧСА получены наносуспензии со средним размером частиц 100–150 нм и отрицательным потенциалом поверхности (≈ -20 мВ) (таблица 2). Показано, что деградация ЕТР-cbz в составе ЧСА НЧ в модельной среде происходит также только в присутствии эстеразы, причем зависит от концентрации Етр-cbz (конверсия за 24 ч 100 % и 27 % при концентрациях 100 мкг/мл и 20 мкг/мл, соответственно). Интересно, что при указанных разведениях суспензии 70 % и 85 % от включенного ЕТР-cbz, соответственно, уже находится в растворе в комплексе с ЧСА, хотя при этом еще не происходит полного распада НЧ. Наноразмерные формы на основе PLGA (таблица 3) характеризуются размером частиц 90–100 нм, отрицательным потенциалом поверхности, большой степенью включения и нагрузки обоих ЛВ и высоким выходом синтеза (около 80 % по ЛВ).

Скорость высвобождения РТХ и ЕТР-cbz из PLGA НЧ в модельной среде исследовали методом диализа и путем отделения НЧ центрифугированием, данные приведены на Рис. 3. Цитотоксичность наноразмерных форм *in vitro* исследована на культуре клеток злокачественной мышинной глиомы GL261 (таблица 4).

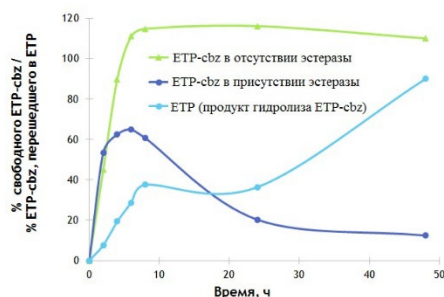


Рис. 2. Превращение ЕТР-cbz в ЕТР в отсутствие и в присутствии эстеразы

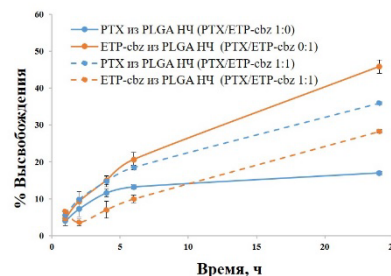


Рис. 3. Профиль высвобождения ЛВ из PLGA-НЧ, (диализ через мембрану)

Таблица 2. Физико-химические параметры ЧСА НЧ, нагруженных РТХ и ЕТР-cbz (n=3, среднее ± sd)

РТХ / ЕТР-cbz	ZaveD, нм	PDI	ZP, мВ	ЧСА, мг/мл	ЛВ, мг/мл		C _{desint} , мг/мл	
					РТХ	ЕТР-cbz	0,9 % NaCl, +25 °C	DMEM, +37 °C
1:0	131,2±0,7	0,166±0,012	-20,5±0,6	18,7±0,3	2,08±0,3	-	20,0±5,7	20,1±3,8
1:1	129,3±0,1	0,134±0,015	-24,4±0,2	18,2±0,1	0,80±0,1	0,95±0,2	8,1±1,5	14,0±1,4
0:1	133,0±2,8	0,199±0,008	-22,5±0,9	18,4±0,4	-	1,70±0,1	4,2±1,2	7,5±0,7

Таблица 3. Физико-химические параметры PLGA НЧ, нагруженных РТХ и ЕТР-cbz (n=3, среднее ± sd)

РТХ / ЕТР-cbz	ZaveD, нм	PDI	ZP, мВ	СВ, %		Нагрузка, %	
				РТХ	ЕТР-cbz	РТХ	ЕТР-cbz
1:0	101,6±0,5	0,221±0,001	-20,1±3,8	80,7±1,1	-	7,4±0,2	-
1:1	91,8±0,4	0,139±0,014	-32,5±2,1	86,1±0,5	87,5±1,2	3,0±0,1	3,7±0,1
0:1	101,0±5,8	0,173±0,046	-27,9±0,4	-	78,9±0,6	-	7,5±0,3

Таблица 4. Цитотоксическая активность (IC₅₀, мкМ) РТХ и ЕТР-cbz в составе ЧСА НЧ *in vitro*

Тип носителя	ЧСА			PLGA		
PTX / ETP-cbz	1:0	1:1	0:1	1:0	1:1	0:1
IC50, мкМ n=9, среднее ± sd	74,0 ± 2,3	8,3 ± 0,4 CI = 0,53	9,4 ± 2,6	61,0 ± 3,8	7,1 ± 1,8 CI = 0,37	11,4 ± 1,3

Дискуссия. В отличие от ЕТР, производное (ЕТР-cbz) эффективно включается в PLGA НЧ и легко образует наносuspension с молекулами ЧСА, что, скорее всего, объясняется его более высокой липофильностью и увеличением количества осей вращения молекулы. Размер НЧ на основе ЧСА, содержащих РТХ, составлял ~130 нм, а размер полилактидных НЧ был несколько меньше – ~100 нм (таблица 2). При исследовании кинетики высвобождения РТХ и ЕТР из полимерных наноразмерных форм в основном используют метод диализа [6, 7, 11, 17]. В данном исследовании при использовании диализа было выявлено замедленное высвобождение РТХ и ЕТР-cbz из PLGA НЧ (Рис. 3) – первоначальное высвобождение составляло ≈ 15–20 % и выросло до 45 % за 24 ч. В то же время, несмотря на достаточно высокое включение ЛВ в PLGA НЧ в случае двойной нагрузки, при отделении НЧ методом центрифугирования замечен значительный «burst-эффект» – высвобождение веществ из носителя в модельной среде происходило сразу на 65–75 % и практически полностью уже через 2 часа, что может свидетельствовать о преимущественно поверхностной локализации ЛВ на поверхности НЧ (данные не приведены). Отличие профиля высвобождения в случае диализа можно объяснить значительной сорбцией части ЛВ на мембране диализного мешка (≈ 20 % в случае НЧ, содержащих бинарную композицию) и ограниченной диффузией РТХ и ЕТР-cbz через мембрану.

Полученные системы со-доставки на основе ЧСА и PLGA продемонстрировали больший цитотоксический эффект на культуре клеток мышинной глиомы GL261 (таблица 4) по сравнению с формами, содержащими одно ЛВ; при этом рассчитанные значения CI (combination index) для обоих типов носителей были $< 0,9$, что предполагает синергию между РТХ и ЕТР-cbz в составе НЧ. В случае моноформ следует отметить более высокую цитотоксичность наноразмерных форм ЕТР-cbz по сравнению с наноформами РТХ.

Заключение. Таким образом, были получены наноразмерные системы со-доставки, содержащие РТХ и гидрофобное производное этопозида (ЕТР-cbz) на основе ЧСА и PLGA, и определены их основные физико-химические параметры и профиль высвобождения ЛВ. Сравнительное исследование цитотоксичности *in vitro* на культуре клеток мышинной глиомы GL261 продемонстрировало синергический эффект между РТХ и ЕТР-cbz в составе наноразмерных форм обоих типов. Таким образом, применение систем со-доставки РТХ и ЕТР-cbz для химиотерапии злокачественных глиом представляется перспективным и заслуживает дальнейшего изучения.

Авторы выражают благодарность сотруднику РХТУ им. Д.И. Менделеева Мантрову Сергею Николаевичу за синтез 4' – О-бензилоксикарбонильного производного этопозида и компаниям Evonik Nutrition & Care GmbH и CPH Pharma b.v. за предоставленный образец полимера PLGA Resomer® 502H.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ № 075–15–2020–792 (Уникальный идентификатор RF-190220X0031).

Литература

1. Sung H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries // *A Cancer Journal of Clinicians*. 2021; 71(3): 209–249.
2. Zeinali M. et al. Nanovehicles for co-delivery of anticancer agents // *Drug Discovery Today*. – 2020.
3. Pan J. et al. Polymeric co-delivery systems in cancer treatment: An overview on component drugs' dosage ratio effect // *Molecules*. 2019; 24(6):1035.
4. Afsharzadeh M. et al. Recent advances in co-delivery systems based on polymeric nanoparticle for cancer treatment // *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. 2018; 46(6): 1095–1110.
5. Maleki H. et al. Effect of Paclitaxel/etoposide co-loaded polymeric nanoparticles on tumor size and survival rate in a rat model of glioblastoma // *International journal of pharmaceutics*. 2021; 604:120722.
6. Wang B. et al. Paclitaxel and etoposide co-loaded polymeric nanoparticles for the effective combination therapy against human osteosarcoma // *Journal of nanobiotechnology*. 2015; 13(1):1–11.
7. Duan R. et al. Polymer–lipid hybrid nanoparticles-based paclitaxel and etoposide combinations for the synergistic anticancer efficacy in osteosarcoma // *Colloids and surfaces b: biointerfaces*. 2017; 159: 880–887.
8. Huang T. et al. Synergistic increase in the sensitivity of osteosarcoma cells to thermochemotherapy with combination of paclitaxel and etoposide // *Molecular medicine reports*. 2012; 6(5):1013–1017.
9. Weaver B.A. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells // *Mol Biol Cell*. 2014; 25(18): P.2677–2681.
10. Montecucco A. et al. Molecular mechanisms of etoposide // *EXCLI Journal*. 2015; (14): 95–108.
11. Xu Y. et al. The synergic antitumor effects of paclitaxel and temozolomide co-loaded in mPEG-PLGA nanoparticles on glioblastoma cells // *Oncotarget*. 2016; 7(15): 20890.
12. Luiz M.T. et al. Highlights in targeted nanoparticles as a delivery strategy for glioma treatment // *International Journal of Pharmaceutics*. 2021; 120758.
13. Ohnuma T. et al. Preparation and Antitumor Activity of 2'' – O-, 3'' – O-and 2'', 3'' – Di-O-substituted Derivatives of Etoposide // *Chemical and pharmaceutical bulletin*. 1992; 40(7): 1783–1788.
14. Neil I. Nab technology: a drug delivery platform utilizing endothelial gp60 receptor-based transport and tumor-derived SPARC for targeting // *Drug Deliv. Rep*. 2007; 37–41.
15. Kumskova N. et al. How subtle differences in polymer molecular weight affect doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles degradation and drug release // *Journal of microencapsulation*. 2020; 37(3): 283–295.
16. Leu Y.L. et al. Benzyl ether-linked glucuronide derivative of 10-hydroxycamptothecin designed for selective camptothecin-based anticancer therapy // *Journal of medicinal chemistry*. 2008; 51(6): 1740–1746.
17. Maleki H. et al. Preparation of Paclitaxel and Etoposide Co-loaded mPEG-PLGA Nanoparticles: an Investigation with Artificial Neural Network // *Journal of Pharmaceutical Innovation*. 2019; 1–15.

РАЗРАБОТКА МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ОТ-ПЦР В ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ФАЗЕ ДЛЯ УСКОРЕННОГО ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ПНЕВМОНИИ

С.А. Лапа, Е.С. Клочихина, А.А. Топилина, Р.А. Мифтахов, А.В. Чудинов

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

Инфекционная пневмония – острый воспалительный процесс легочной ткани, вызываемый широким рядом возбудителей. Вспышки инфекционных пневмоний, вызванных коронавирусами, вирусами гриппа А и В, а также бактериальными возбудителями, являются серьезной социальной угрозой. От своевременной постановки точного диагноза зависит успешность назначенной терапии и стратегия лечения пациента в целом [1]. Создание методов экспресс-диагностики для точного выявления этиологии пневмонии имеет важное значение как для назначения индивидуальной терапии, так и для решения эпидемиологических задач.

Биочипы являются универсальной платформой для одновременного определения нескольких биологических объектов и находят применение в научных исследованиях и клинической диагностике.

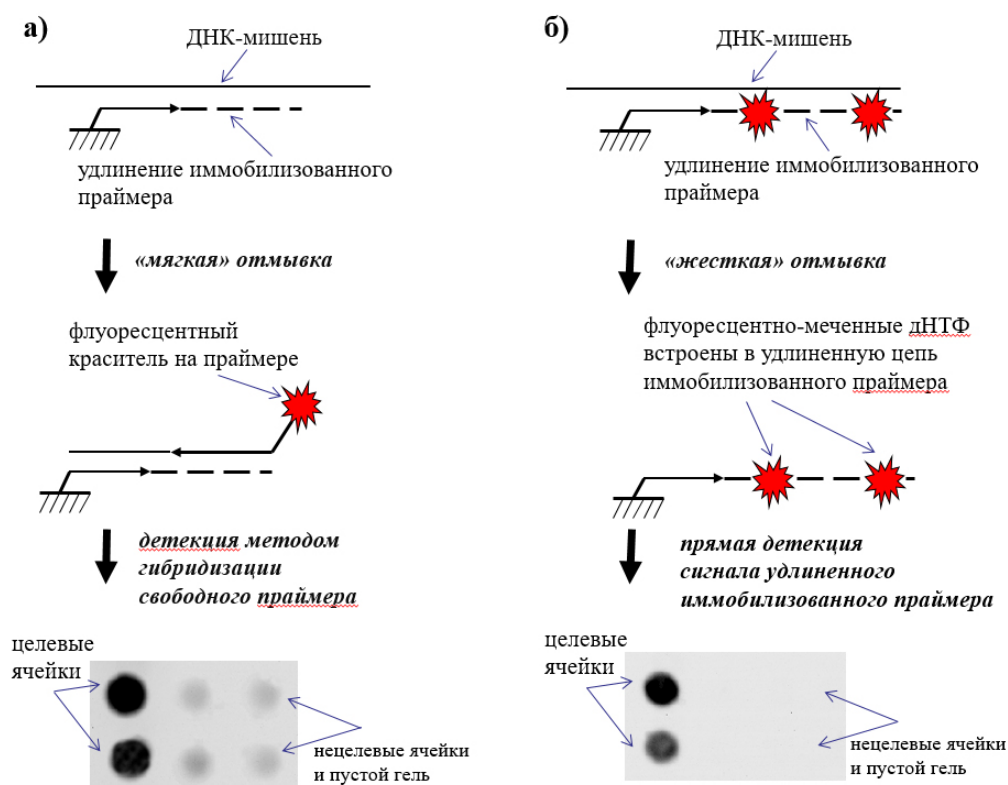


Рисунок 1. Варианты ПЦР на чипе (схема): а) стандартный вариант ПЦР с использованием свободного (не иммобилизованного) флуоресцентно-меченного праймера в смеси, б) предлагаемый нами вариант ПЦР с использованием флуоресцентно-меченного трифосфата дезоксиуридина.

Ранее мы докладывали о разработке мультиплексной ПЦР в одном общем объеме для видового определения бактериальных возбудителей пневмонии человека [2]. Это позволило нам сформулировать требования к видоспецифичным праймерам и оптимизировать ПЦР в мультиплексном варианте. Развитием тест-системы [2] стала разработка мультиплексной ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в иммобилизованной фазе для выявления шести бактериальных и двух вирусных возбудителей инфекционной пневмонии человека [3]. Накопление сигнала удлиняющихся иммобилизованных праймеров происходит за счет включения в растущую цепь флуоресцентно-меченных нуклеотидов. Детекция сигнала осуществляется после удаления всех компонентов смеси, что существенно снижает фон и увеличивает чувствительность анализа (Рис. 1).

В качестве носителя для иммобилизованных праймеров использовали акриламидные гелевые ячейки. В качестве подложки применяли как специальным образом обработанные предметные стекла, так и различные виды полимеров, включая ПЭТ.

На Рис. 2 показаны примеры применения прототипа разработанной системы.

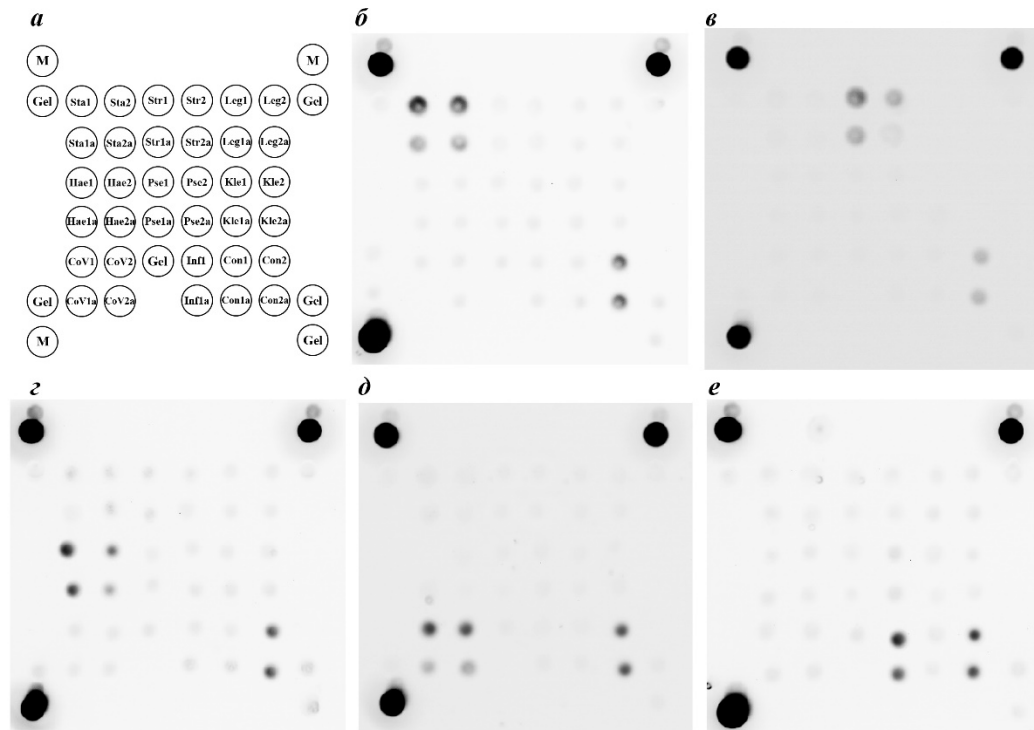


Рисунок 2. Результаты мультиплексной ОТ-ПЦР на чипе. а – Схема: М – флуоресцентный маркер для автоматического наложения сетки для расчета интенсивности сигнала; Gel – ячейка пустого геля; Sta – *Staphylococcus aureus*, Str – *Streptococcus pneumoniae*, Leg – *Legionella pneumophila*, Hae – *Haemophilus influenzae*, Pse – *Pseudomonas aeruginosa*, Kle – *Klebsiella pneumoniae*, Cov – SARS-CoV-2, Inf – вирус гриппа А; Con1 – внутренний контроль обратной транскрипции (резервный; в настоящее время не используется), Con2 – внутренний контроль ПЦР. б–е – результаты определения вида (примеры) соответственно: *St. aureus*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, SARS-CoV-2, вирус гриппа А. Для удобства приведены фото с инвертированными сигналами (негативы).

Исследование поддержано грантом РФФИ № 20-14-00287.

Литература

1. Harris M., Clark J., Coote N., Fletcher P., Harnden A., McKean M., Thomson A. British Thoracic Society guidelines for the management of community acquired pneumonia in children: update 2011 // Thorax. – 2011. – 66 Suppl 2:ii1–23.
2. Лапа С.А., Клочихина Е.С., Мифтахов Р.А., Золотов А.М., Заседателев А.С., Чудинов А.В. Мультиплексная ПЦР для выявления бактериальных возбудителей инфекционной пневмонии // Биоорг. Химия. – 2020. – Т. 46. – Стр. 550–552.
3. Лапа С.А., Мифтахов Р.А., Клочихина Е.С., Аммури Ю.И., Благодатских С.А., Шершов В.Е., Заседателев А.С., Чудинов А.В. Разработка мультиплексной ОТ-ПЦР с иммобилизованными праймерами для идентификации возбудителей инфекционной пневмонии человека // Молекуляр. биология. – Т. 55. – № 5. – В печати.

ВЛИЯНИЕ ПРИЕМА ПИЩИ, ОБОГАЩЕННОЙ МАСЛЯНЫМ ЭКСТРАКТОМ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ РАЗЛИЧНЫХ ТАКСОНОВ НА МАССУ ТЕЛА И УРОВНИ САХАРА В КРОВИ У МЫШЕЙ-САМОК C57BL6

А.П. Лыков¹, И.П. Уваров², Р.Г. Геворгиз³, С.Н. Железнова³

¹ НИИКЭЛ-филиал Института цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² ГБУ НСО «Управление ветеринарии города Новосибирска», Новосибирск, Россия

³ ФИЦ ИнБЮМ им. А.О. Ковалевского РАН, Севастополь, Россия

Микроводоросли представляют собой альтернативный источник питательных веществ, включая белки, жиры, углеводы, микроэлементы и биологически активные добавки, которые могут использоваться как пищевые добавки в сельском хозяйстве [1]. Кроме этого, микроводоросли являются источником биологически активных молекул, способных регулировать процессы метаболизма в организме человека и животных [2]. Показано, что включение в рацион цыплят спирулины (2 г/кг корма) способствовало увеличению на 8,95 % потребление корма, приросту массы на 12,5 % и активации ответа на иммунизацию [1]. Установлено, что прием пищи содержащей микроводоросли *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oceanica* и *Phaeodactylum tricornutum* мышами в течение 2-х недель способствовало увеличению массы тела, сопоставимое с контрольной группой или превосходящее прирост массы тела в контроле [2]. Прием крысами с сахарным диабетом экстракта *Spirulina platensis* в дозах 20 и 30 мг/кг способствовали снижению уровня малонового альдегида, глюкозы, липидов, аспаратаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, фактора некроза опухоли-альфа и интерлейкина-6 и увеличивает уровни цинка железа, меди и селена в плазме крови и активность антиоксидантных ферментов [3].

Целью исследования стал анализ влияния приема стандартной сухой пищи для грызунов, обработанных масляным экстрактом микроводорослей различных таксонов.

Материал и методы. Все работы с животными проведены с соблюдением принципов гуманности. Микроводоросли зеленые *Chlorella vulgaris* Beijerinck (*Chlorella*) и *Coelastrella* sp. (*Coelastrella*), цианобактерии *Arthrospira platensis* (Nordstedt) Gomont (*Spirulina*), диатомовые *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin (*Cylindrotheca*) и красные *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew et Ross (*Porphyridium*) из коллекции культур ФИЦ ИнБЮМ РАН. Масляный экстракт микроводорослей готовили на подсолнечном масле (5 г сухой массы микроводорослей на 100 мл масла), настаивали в термостате (ТС-80, Россия) при 37° С в течение 72 часов, далее ими пропитывали стандартную гранулированную пищу для грызунов (300 г.). Опытные группы были сформированы в соответствии с исследуемыми экстрактами микроводорослей: *Chlorella*, *Coelastrella*, *Spirulina*, *Cylindrotheca*, *Porphyridium* и контроль (пропитка пища чистым подсолнечным маслом). Объем выборки в опытных группах составил 5 особей и 6 особей в контрольной группе. Животные получали пищу, обработанную масляными экстрактами микроводорослей или же только подсолнечным маслом в течение 12 суток. На день 0, 7 и 12 производили взвешивание животных и забор периферической крови для определения уровня глюкозы. Для оценки уровня глюкозы в крови использовали Gluco Calea (wellionvet, MED TRUST, Австрия). Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 10.0 for Windows (StatSoft, США). Данные представлены как среднее и стандартное отклонение (M±SD), статистически значимое различие между группами оценивали однофакторным дисперсионным анализом (ANOVA) и принимали при p<0.05.

Результаты. Установлено, что мыши из группы *Coelastrella* имели меньшую массу тела чем мыши в группе *Cylindrotheca* и *Porphyridium*, а также мыши из группы *Spirulina* имели меньшую массу по сравнению с группой *Cylindrotheca* на начало эксперимента (Рис. 1, p<0.05). В группе *Chlorella*, *Coelastrella* и *Spirulina* масса тела значимо меньше, чем в группе *Cylindrotheca* на 7-е и 12-е сутки (p<0.05). Масса мышей в группе *Coelastrella* была меньше, чем в группе *Porphyridium* на 7-е и 12-е сутки, а в группе *Spirulina* масса тела на 12-е сутки также меньше, чем в группе *Porphyridium* (p<0.05).

По уровню глюкозы в крови на начало эксперимента не выявлено существенных различий между группами (p>0.05). На 7-е сутки эксперимента показано значимое увеличение уровней глюкозы в крови группы *Spirulina* по сравнению с группой *Coelastrella*, *Cylindrotheca* и контролем, а в группе *Porphyridium* уровни глюкозы в крови выше, чем в контроле (p<0.05).

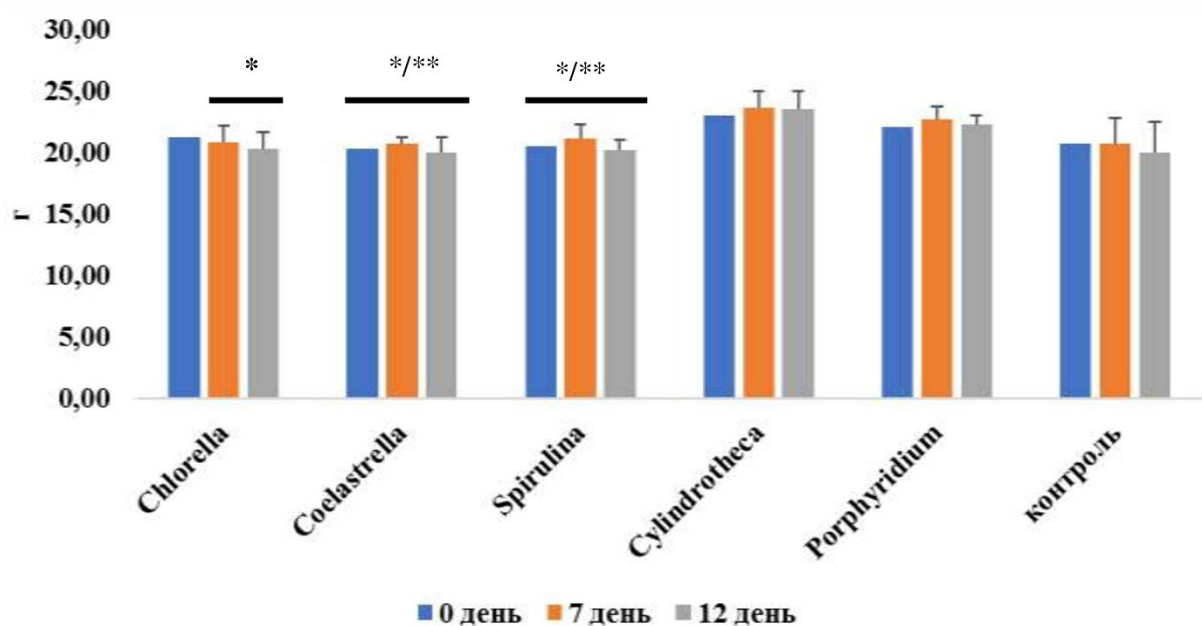


Рисунок 1. Динамика изменения массы тела мышей-самок C57Bl6, принимавших в пищу масляный экстракт микроводорослей. $p < 0.05$ *с *Cyndrotheca*, **с *Porphyridium*.

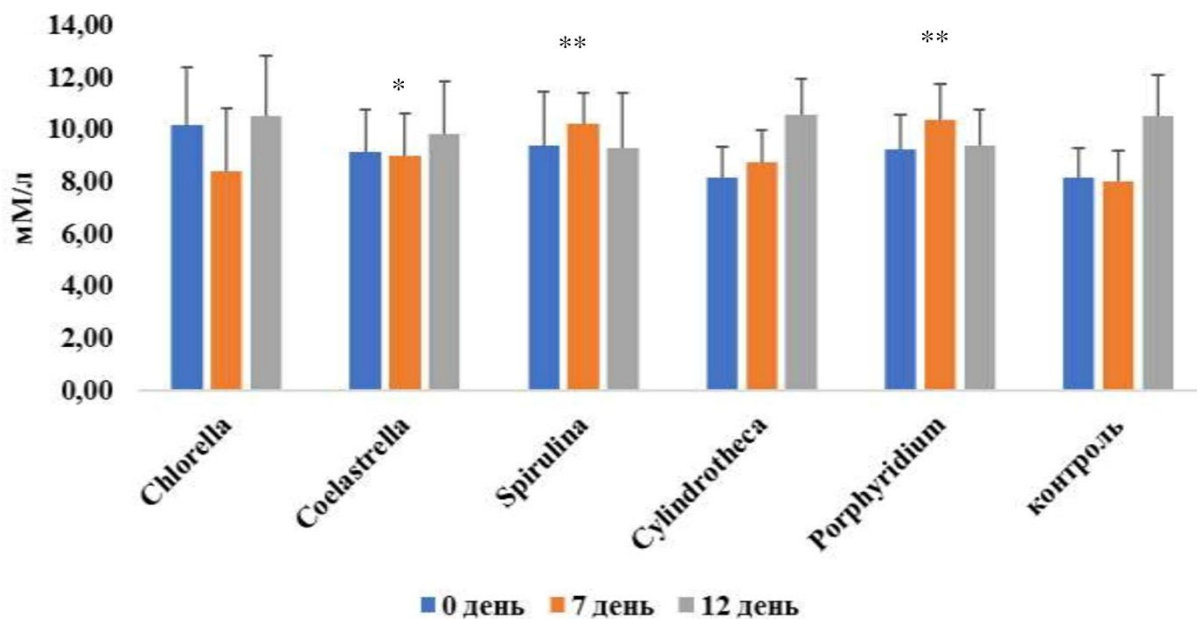


Рисунок 2. Влияние приема в пищу масляного экстракта микроводорослей на уровни глюкозы в крови у мышей-самок C57Bl6. $p < 0.05$ *с *Spirulina*, **с контролем

Обсуждение. Полученные нами результаты указывают на то, что прием в пищу масляных экстрактов микроводорослей различных таксонов не приводили к гибели животных, существенному изменению массы тела в группах по сравнению с исходными показателями (разброс массы тела от -4 % до +2 %), что может быть результатом привыкания мышей к новым вкусовым качествам пищи, а также тем, что в добавке отсутствовали белки. В отношении уровней глюкозы в крови установлено, что размах колебаний глюкозы в группах был от -1 % до +20 %, значимое увеличение показателя выявлено в группе *Cyndrotheca* (+29,66 %) и в контроле (+28,57 %) от исходного уровня. Показано что включение *Chlorella vulgaris* в рацион рыб увеличивает массу тела [4].

Микроводоросли из арктических льдов *Chlamydomonas* sp. у мышей вызывали улучшения в тимусе, мозге, сердце, печени, селезенке и почках, предотвращало снижение активности аспаратаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, щелочной фосфатазы, супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и глутатиона [5]. Прием в пищу *Isochrysis galbana* увеличивал физическую выносливость у мышей, уровни гликогена в печени, мышечного гликогена и глюкозы в крови [6]. У кроликов употребление в пищу *Chlorella vulgaris* существенно не влияло на массу тела [7]. Микроводоросли являются источником каротиноидов, так включение в рацион креветок *Dunaliella* sp. способствовало приросту массы тела и выживаемости при инфицировании *Vibrio parahaemolyticus* [8]. На радужной форели показано, что добавление в рацион *Haematococcus pluvialis* как источника астаксантина способствовало снижению уровня глюкозы [9]. Диета, обогащенная микроводорослями, у цыплят способствовало увеличению частоты мышечных сокращений, потере мышечной массы [10]. В тоже время включение в рацион цыплят *Arthrospira platensis* существенно не увеличивали прирост массы тела [11]. Спиртовой экстракт *Phaeodactylum tricornutum* у мышей склонных к ожирению способствовал накоплению фукоксантина в жировых тканях и меньшему приросту массы тела по сравнению с контрольной группой [12].

Заключение. Масляные экстракты микроводорослей различных таксонов не проявляли токсического влияния и не влияли существенно на прирост массы тела и уровни глюкозы у мышей.

Исследование проведено в рамках государственного задания НИИКЭЛ-филиал ИЦиГ СО РАН «Разработка методов молекулярного профилирования и инновационных технологий прогнозирования, ранней диагностики, лекарственной и клеточной терапии социально-значимых заболеваний дисметаболической государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме «Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса» (No 121030300149–0).

Литература

1. Khan S, Mobashar M, Mahsood FK, Javaid S, Abdel-Wareth AA, Ammanullah H, Mahmood A. Spirulina inclusion levels in a broiler ration: evaluation of growth performance, gut integrity, and immunity. *Trop Anim Health Prod.* 2020; 52(6):3233–3240.
2. Neumann U, Derwenskus F, Gille A, Louis S, Schmid-Staiger U, Briviba K, Bischoff SC. Bioavailability and Safety of Nutrients from the Microalgae *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oceanica* and *Phaeodactylum tricornutum* in C57BL/6 Mice. *Nutrients.* 2018; 10(8):965. doi: 10.3390/nu10080965.
3. Nasirian F, Dadkhah M, Moradi-Kor N, Obeidavi Z. Effects of *Spirulina platensis* microalgae on antioxidant and anti-inflammatory factors in diabetic rats. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2018; 11:375–380.
4. Mahmoud EA, El-Sayed BM, Mahout VII, El-Murr AEI, Neame-Allah ANF. Effect of *Chlorella vulgaris* enriched diet on growth performance, hepato-immunological responses, antioxidant and transcriptomics profile disorders caused by deltamethrin toxicity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Shellfish Immunol.* 2020; 102:422–429.
5. Yi R, Deng L, Mu J, Li C, Tan F, Zhao X. The Impact of Antarctic Ice Microalgae Polysaccharides on D-Galactose-Induced Oxidative Damage in Mice. *Front Nutr.* 2021; 8:651088. doi:10.3389/fnut.2021.651088.
6. Li W, Luo C, Huang Y, Zhan J, Lei J, Li N, Huang X, Luo H. Evaluation of antifatigue and antioxidant activities of the marine microalgae *Isochrysisgalbana* in mice. *Food Sci Biotechnol.* 2019; 29(4):549–557.
7. Abdelnour SA, Sheiha AM, Taha AE, Swelum AA, Alarifi S, Alkahtani S, Ali D, AlBasher G, Almeer R, Falodah F, Almutairi B, Abdel-Daim MM, Abd El-Hack ME, Ismail IE. Impacts of Enriching Growing Rabbit Diets with *Chlorella vulgaris* Microalgae on Growth, Blood Variables, Carcass Traits, Immunological and Antioxidant Indices. *Animals* (Basel). 2019; 9(10):788. doi: 10.3390/ani9100788.
8. Medina Félix D, Campa Córdoba ÁI, López Elías JA, Martínez cordovan LR, Preciado GF, Cortés Jacinto E, Luna González A, Mendoza Cano F, Huerta Ladas N. Dosage and frequency effects of the microalgae *Dunaliella* sp. on the diet of *Lithopone's* vannamei challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. *J Invertebr Pathol.* 2019; 161:14–22.
9. Sheikhzadeh N, Tayefi-Nasrabadi H, Oushani AK, Enferadi MH. Effects of *Haematococcus pluvialis* supplementation on antioxidant system and metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol Biochem.* 2012; 38(2):413–419.
10. Khan IA, Parker NB, Löhr CV, Cherian G. Docosahexaenoic acid (22:6 n-3) – rich microalgae along with methionine supplementation in broiler chickens: effects on production performance, breast muscle quality attributes, lipid profile, and incidence of white striping and myopathy. *Poult Sci.* 2021; 100(2):865–874.
11. Pestana JM, Puerta B, Santos H, Madeira MS, Alfaia CM, Lopes PA, Pinto RMA, Lemos JPC, Fontes CMGA, Lordelo MM, Prates JAM. Impact of dietary incorporation of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) and exogenous enzymes on broiler performance, carcass traits, and meat quality. *Poult Sci.* 2020; 99(5):2519–2532.
12. Gille A, Stojnic B, Derwenskus F, Trautmann A, Schmid-Staiger U, Posten C, Briviba K, Palou A, Bonet ML, Ribot J. A Lipophilic Fucoxanthin-Rich *Phaeodactylum tricornutum* Extract Ameliorates Effects of Diet-Induced Obesity in C57BL/6J Mice. *Nutrients.* 2019; 11(4):796. doi: 10.3390/nu11040796.

УДК 640

МОДЕЛЬ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ЧЕЛОВЕКА**В.С. Павлов, А.А. Ильина, Д.С. Спасская, Д.С. Карпов, А.В. Кудрявцева***Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия*

Благодаря высокой консервативности митохондриальных генов дрожжи служат важным модельным организмом для изучения функций митохондрий и их роли в патогенезе заболеваний человека. Митохондриальный комплекс II (сукцинатдегидрогеназа) является одним из ключевых компонентов электрон-транспортной цепи и цикла трикарбоновых кислот. Комплекс состоит из четырех субъединиц, мутации в которых приводят к таким заболеваниям как наследственная парагангиома, детская лейкоэнцефалопатия, синдром Ли, феохромоцитома и др. Целью данной работы стала функциональная проверка варианта Y108R в дрожжевом гене *SDH4*, аналогичного замене H102R в гене *SDHD* человека. Мутация H102R была обнаружена в ходе секвенирования экзона опухоли пациента с множественными парагангиомами.

Замена *SDH4*:Y108R, аналогичная варианту *SDHD*:H102R, была определена путем выравнивания последовательностей белков Sdh4 дрожжей и SDHD человека. На основе дрожжевого вектора YCpLAC36 получены плазмиды, несущие ген *SDH4* дикого типа, а также мутантный ген *SDH4* с целевой и контрольной миссенс мутациями в позициях 108 и 120 белка, соответственно. Кроме того, в вектор YCpLAC36 клонировали ген *SDHD* человека. Дрожжевой штамм с делецией гена *SDH4* (*sdh4*-Δ) получали путем CRISPR/Cas9 опосредованного редактирования генома *S. cerevisiae* с плазмидой pCRCT, несущей iCas9 и направляющую РНК. Штамм *sdh4*-Δ трансформировали плазмидами, содержащими ген дрожжей дикого типа (pYSDH4, 2 биологических повтора), пустой вектор YCp36, человеческий ген (pHSDHD, 2 биологических повтора) и плазмидами, несущими ген *SDH4* с мутацией (pYSDH4-Y120C или pYSDH4-Y108R). Колонии растили на чашках Петри с селективными средами SM-URA и SM-URA-Glc+EtOH (вместо глюкозы в качестве источника углерода используется этанол) и SM-URA-Glc+Glycerol (вместо глюкозы в качестве источника углерода используется глицерин) в виде серии последовательных разведений в течение четырех суток.

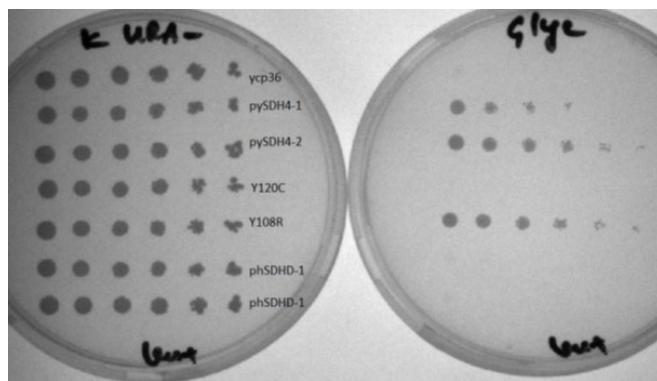


Рис. 1. Оценка скорости формирования колоний рекомбинантных штаммов дрожжей на чашках Петри с селективной питательной средой, содержащей неферментируемый источник углерода – глицерин. Источник: составлено авторами

Согласно полученным результатам плазмида pYSDH4-Y108R восстанавливает способность мутантного штамма *sdh4*-Δ расти на среде с неферментируемыми источниками углерода, в то время как плазмиды pYSDH4-Y120C и pHSDHD не способны комплементировать делецию гена *SDH4* (Рисунок 1).

Таким образом, присутствие мутации Y108R не влияет на способность дрожжей штамма *sdh4*-Δ осуществлять окислительное фосфорилирование при отсутствии ферментативного углерода.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-15-00419). Работа выполнена на оборудовании ЦКП “Геном” ИМБ РАН (http://www.eimb.ru/rus/ckp/ccu_genome_c.php).

ФОРМИРОВАНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ, ВОССТАНОВЛЕНИЕ РЕГЕНЕРАЦИИ И ПРОФИЛАКТИКА ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У ЛЮДЕЙ СТАРШЕ 40 ЛЕТ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

А.В. Печерский^{1*}, В.И. Печерский, А.Б. Смолянинов², В.Н. Вильянинов³, Ш.Ф. Адылов²,
А.Ю. Шмелёв¹, О.В. Печерская, В.Ф. Семиглазов⁴

¹ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

² Покровский банк стволовых клеток, Санкт-Петербург, Россия

³ Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

⁴ НИИ онкологии им. профессора Н.Н. Петрова, Санкт-Петербург, Россия

Цель исследования. Изучение связи между снижением пула плюрипотентных стволовых клеток, обусловленного этим нарушения обновления (регенерации) тканей, и повышением риска развития онкологических заболеваний у людей старше 40 лет (повышением образования у них промоторных факторов канцерогенеза).

Материалы и методы. В первой части исследование проводилось у 11 больных раком почки, мочевого пузыря, предстательной железы III–IV стадии заболевания в возрасте от 54 до 76 лет. Во второй части исследование проводилось у 4-х пациентов 60–82 лет, которым в целях восстановления обновления тканей (регенерации) было проведено от 4 до 7 переливаний моноклеарной фракции периферической крови от молодых доноров 19–23 лет одинакового пола и групп крови с реципиентами.

Результаты. В первой части исследования через 1 месяц после проведения химиотерапии или таргетной терапии у всех 11 онкологических больных развивалась лейкопения, сопровождавшаяся увеличением содержания основного фактора роста фибробластов (FGFb) в крови в среднем в 1,74 раза. Из них у 4-х пациентов наблюдалось увеличение уровня человеческого васкулоэндотелиального фактора роста А (human VEGF-A) в среднем в 1,25 раза, у 3-х пациентов – увеличение уровня эпидермального фактора роста человека (human EGF) в среднем в 1,13 раза. Во второй части исследования у 4-х пациентов через 3–6 месяцев после завершения курса из 4–7 трансфузий моноклеарной фракции периферической крови содержание ГКП CD34+ периферической крови увеличилось в среднем в 3,25 раза до уровня молодых лиц, а уровень FGFb уменьшился в среднем в 1,78 раза. Из них у 2-х пациентов уровень human VEGF-A уменьшился в среднем в 1,48 раза, у 3-х пациентов уровень human EGF уменьшился в среднем в 4,12 раза. В буккальном эпителии у всех 4-х пациентов экспрессия p53 снизилась в среднем в 6,02 раза, у 3-х из них – экспрессия Bcl-2 снизилась в среднем в 60,0 раз.

Заключение. Нарушение обновления тканей (регенерации) является основной причиной канцерогенеза у людей старше 40 лет. Недостаточность возмещения погибших старых клеток молодыми клетками-предшественниками приводит к компенсаторному избыточному образованию клеточных ростовых факторов (промоторных факторов канцерогенеза), стимулирующих деление оставшихся клеток. Избыточную стимуляцию митотической активности у людей старше 40 лет можно снизить до нормального уровня посредством восстановления численности пула плюрипотентных стволовых клеток при переливании моноклеарной фракции периферической крови от молодых доноров 18–23 лет одних с реципиентом групп крови и пола. Обновление донорскими плюрипотентными стволовыми клетками эпителиально-ретикулярных клеток тимуса, обучающих Т-хелперы, приводит к восприятию иммунной системой реципиента тканеспецифичных антигенов донора как «своей». Развивается иммунологическая толерантность, при которой донорские плюрипотентные стволовые клетки и клетки, в которые они дифференцируются, не отторгаются иммунной системой реципиента. Теоритически после предварительной трансфузии моноклеарной фракции периферической крови, содержащей плюрипотентные стволовые клетки, последующая трансплантация тканей и органов от того же донора не будет приводить к их отторжению (Pechersky A.V. et al., 2015, Патент РФ № 2350340).

Литература

1. Pechersky AV, Pechersky VI, Aseev MV, Droblenkov AV, Semiglazov VF. Several aspects of the regeneration process carried out by means of pluripotent stem cells. *Tsitologiya* 2008; 50(6): 511–520.
2. Pechersky AV, Pechersky VI, Smolyaninov AB, Vilyaninov VN, Adylov ShF, Shmelev AYU, Pecherskaya OV, Semiglazov VF. Regeneration and carcinogenesis. *Journal of Stem Cells* 2015; 10(4): 255–270.
3. Pechersky AV, Pechersky VI, Aseev MV, Droblenkov AV, Semiglazov VF. Immune system and regeneration. *Journal of Stem Cells* 2016; 11 (2): 69–87.

УДК 360

ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА AGT MET235THR У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ С ОЖИРЕНИЕМ, ПРОЖИВАЮЩИХ В РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ**Абд Али Алаа Хашиш^{1,4}; О.В. Бочарова²; Е.Д. Теплякова³; Т.П. Шкурат⁴; Г.В. Карантыш⁴**¹ Технический университет Аль-Фурат Аль-Авсат, Куфа, Ирак² Ростовский государственный медицинский университет, Россия³ Ростовский государственный медицинский университет, Россия⁴ Южный федеральный университет, Россия

Введение: детское ожирение отрицательно влияет на здоровье и увеличивает риск заболеваний во взрослом возрасте, таких как рак, сахарный диабет и ишемическая болезнь сердца. Поэтому детское ожирение является серьезной медико-социальной проблемой современного здравоохранения. В текущем исследовании изучали взаимосвязь ожирения с геном ангиотензиногена (*AGT*), расположенным на хромосоме 1q41, который кодирует *AGT*, в детской и подростковой популяции Ростовской области России.

Материалы и методы: В исследовании случай-контроль была изучена взаимосвязь между ожирением и полиморфизмом *Met235Thr* гена *AGT* у 500 детей и подростков обоего пола в возрасте от 3 до 17 лет с индексом массы тела (ИМТ) > 30. а также 40 детей и подростков того же возраста без ожирения (ИМТ ≤ 20). В основную группу вошли 300 детей и подростков с ожирением, а в контрольную – двести детей и подростков без ожирения. Экспериментальную часть по генотипированию полиморфизма *Met235Thr* гена *AGT* в образцах ДНК проводили с использованием коммерческих тест-систем НПФ Liteh (Россия) с электрофоретической детекцией. Анализ основан на реакциях амплификации с двумя парами аллель-специфичных праймеров. Продукты амплификации разделяли горизонтальным электрофорезом в 3 %-ном агарозном геле.

Результаты: В группе с ожирением и контрольной группе носительство полиморфизма *Met235Thr* достоверно различалось ($\chi^2 = 19,820$; $p=0,0001$). Также были отмечены различия между частотами генотипов в этих группах: количество носителей генотипов *MM* ($p=0,0001$; OR 2,89; 95 % CI 1,68–4,96) и *TT* ($p=0,005$; OR 0,54; 95 % CI 0,35–0,83) различалось в группе с ожирением и контрольной группе, как и распределение частот аллелей *M* ($p=0,0001$; OR 1,83; 95 % CI 1,38–2,44) и *T* ($p=0,0001$; OR 0,55; 95 % CI 0,41–0,73). Это доказывает связь между полиморфизмом *Met235Thr* и риском ожирения в детской и подростковой популяции.

Выводы: В данном исследовании установлена ассоциация между полиморфизмом *Met235Thr* гена *AGT* с ожирением в детской и подростковой популяции Ростовской области (Россия).

БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЕ ДНК-ИММУНОГЕНА НА ОСНОВЕ ГЕНОВ КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2

А.А. Рябченкова, Е.Р. Чирак, Е.Л. Чирак, Н.Н. Колмаков, И.В. Духовлинов

ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия

Плазмидные векторы являются одним из способов доставки генов в клетки для их временной экспрессии. Конструирование экспрессионных векторов на основе плазмидных ДНК является перспективным направлением в генной терапии и разработке вакцин. Исследование биораспределения является важным этапом в изучении фармакокинетики кандидатного лекарственного средства.

Для обнаружения очень низких концентраций целевой ДНК используют крайне чувствительный метод qPCR. Основным преимуществом этого метода перед методами мечения является возможность выявления в тканях именно фрагмента гена интереса, при этом деградировавшая ДНК не будет амплифицироваться (Liu, 2008). qPCR позволяет оценить количество плазмидной ДНК относительно общего количества ДНК, выделенной из ткани.

Целью нашего исследования было исследование биораспределения ДНК-иммуногена pCMV-3Tag-3A-CVVV3 в мышцах и оценка длительности его сохранения в тканях. Для исследования мы выбрали метод qPCR за его простоту и удобство использования.

Исследуемый ДНК-иммуноген представляет собой плазмиду pCMV-3Tag-3A, содержащую ген CVVV3. Ген кодирует гибридный белок длиной 424 аминокислотных остатка, содержащий иммуногенные участки структурных белков М, S, N, Е β-коронавируса SARS-CoV-2. Конструкция запатентована (Dukhovlinov, 2020). Суммарная длина плазмиды pCMV-3Tag-3A-CVVV3 составляет 5519 п.н.

Наработку ДНК проводили в штамме *E. coli* DH5α. Очистку проводили до показателей качества, соответствующих Фармакопее РФ (ОФС 1.7.1.0013.18).

Для инъекций готовили раствор ДНК-иммуногена, содержащий 1 мг/мл ДНК-иммуногена, 9 мг/мл натрия хлорида, 3 мкл/мл бензилового спирта и воду для инъекций. Мышам линии BALB/c вводили по 0,5 мл ДНК-иммуногена (0,5 терапевтической дозы, 500 мкг плазмидной ДНК) или плацебо (9 мг натрия хлорида на 1 мл воды для инъекций) внутримышечно в бедренную мышцу. Всего в исследовании принимало участие 35 мышей в контрольной группе и 35 мышей в испытываемой группе. Мышей содержали согласно правилам GLP и соответствии с ГОСТ 33044–2014. Через 10 минут, 6 часов, 24 часа, 7 дней, 14 дней, 21 день, 42 дня после инъекции животных забивали и отбирали органы (головной мозг, кишечник, костный мозг, кровь цельная, лёгкое, лимфоузел, место введения – бедренная мышца (далее – место введения), бедренная мышца интактной лапы (далее – мышца), печень, почка, селезёнка, сердце и яичник или яичко). Все органы хранили при -80 °С

Для выделения тотальной ДНК из органов экспериментальных животных использовали набор «ДНК-Экстран-2» (Синтол, Россия). Выделение проводили согласно протоколу производителя. Концентрацию выделенной тотальной ДНК определяли спектрофотометрически. Для последующего анализа все пробы разводили безнуклеазной водой до концентрации тотальной ДНК 10 нг/мкл.

Для определения концентрации использовали метод qPCR. С помощью программы Primer3 (Koressaar, 2007) подобрали праймеры, отжигающиеся на плазмиде, но не отжигающиеся в геноме мыши. Последовательности праймеров для ПЦР были 5' – CATCAATGGGCGTGGATAGC-3' и 5' – ATAGACCTCCCACCGTACAC-3'. Длина амплифицируемого фрагмента составила 172 п.н.

В ходе исследования проанализировали 910 образцов ДНК (по 35 животных в контрольной и экспериментальной группах, по 13 органов на животное). В результате qPCR для образцов от контрольных животных (инъецированных физиологическим раствором) был получен ряд значений, отличающийся от нулевых. При этом в данных образцах кривые плавления показывали аналогичную температуру плавления, что и стандарты (84,5–85 °С). По этим данным определили порог «шумовой» области значений.

Для всех 455 контрольных образцов рассчитали среднее значение шумового сигнала (и соответствующую «шумовую» концентрацию плазмидной ДНК) и медианное значение сигнала. Среднее значение шумового сигнала составило 4,72 фг/образец (на 10 нг тотальной ДНК), медианное значение сигнала составило 2,13 фг/образец. Рассчитали 95-й процентиль для определения границы уровня шума. Данное значение составило 15,17 фг/образец. Это значение приняли за фоновый уровень шума.

Для каждого из экспериментальных образцов нашли среднее количество плазмидной ДНК на образец по результатам ПЦР в реальном времени. Для каждой группы из 5 образцов (каждый орган, каждая временная точка) рассчитали медианное значение количества плазмидной ДНК в группе. Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1. Медианные значения количества плазмидной ДНК в образцах, фг/образец (на 10 нг тотальной ДНК).

	10 минут	6 часов	24 часа	7 дней	14 дней	21 день	42 дня
Головной мозг	382,98	16,88	85,80	52,00	4,32	4,29	6,80
Печень	111,08	2,69	2,16	2,39	3,23	2,75	3,21*
Почка	82,10	3,71	2,60	3,63*	5,60*	4,67	2,58
Сердце	32,56	2,04	1,85	1,95	1,08	1,91	2,01
Селезёнка	27,92	2,17	2,45	1,74	2,36	2,35	3,39
Лёгкое	80,52	4,28	3,14*	5,73*	4,67	3,88	4,07
Яичник/яичко	431,30	7,96*	7,50*	9,53*	7,17*	7,03*	12,74*
Лимфоузел	2737,49	12,20*	4,13*	5,98	5,38	7,11	6,46
Кишечник	216,13	7,78	3,87	4,39	4,09	5,10*	4,81
Мышца	4515,91	286,98	105,01	19,21	16,02	21,51	18,26
Место введения	34802,54	99,78	16,37	12,20*	18,95	31,92	19,47
Кровь	598,34	245,40	42,52	28,28	28,87	42,26	203,02
Костный мозг	29,15	1,34	0,67	0,38	2,36	10,30	11,69*

Note Жирным шрифтом выделены значения, превышающие фоновый уровень шума (более 15,17 фг/образец); * – некоторые значения в группе выше фоновых.

Плазмидная ДНК распределяется по органам неравномерно. Через 10 минут после инъекции препарата плазмидная ДНК детектируется во всех органах без исключения. В крови плазмидная ДНК сохраняется до 42 суток.

В месте введения плазмидная ДНК сохраняется до 42 дней. Через 10 минут после введения плазмидная ДНК детектируется в месте введения в максимальных количествах. Затем её количество на порядки падает в течение первых 6 часов. К концу 24 часов количество плазмидной ДНК уменьшается до значений, близких к фоновым, и сохраняется в таких количествах до 42 суток.

Ряд органов показывает схожую динамику распределения плазмидной ДНК. В сердце, селезёнке, костном мозге, легких, печени, почке и кишечнике плазмидная ДНК детектируется через 10 минут после введения и исчезает уже к 6 часам после введения. Отдельные обнаруженные положительные ответы составляют 16–18 фг/образец, что практически равно фоновым значениям.

В бедренной мышце интактной лапы количество плазмидной ДНК также падает в течение первых 24 часов. В течение продолжительного времени плазмидная ДНК сохраняется в количествах немного выше фоновых.

В яичнике и яичках плазмидная ДНК исчезает к 6 часам после введения. Несмотря на качественное присутствие плазмидной ДНК в отдельных образцах, медианные значения располагаются ниже фоновых.

Количество плазмидной ДНК в лимфоузлах через 10 минут после введения на порядок превышает содержание в большинстве остальных органов. В отдельных образцах плазмидная ДНК может сохраняться до 24 часов.

В головном мозге плазмидная ДНК сохраняется до недели.

На биораспределение плазмидной ДНК в тканях животных влияет широкий ряд факторов. Так, на него влияет способ введения (внутримышечное, внутрикожное, внутривенное, электропорация), количество вводимой ДНК, наличие вспомогательных веществ для формирования комплексов для увеличения эффективности трансфекции и предотвращения деградации (липосомы, поликатионы, белки), соотношение изоформ.

При внутрикожном введении 5 мкг плазмидной ДНК она сохраняется в месте введения до 3 суток (Palumbo, 2012). Более высокая доза в 500 мкг плазмидной ДНК (0,5 терапевтической дозы) приводит к более продолжительному сохранению плазмидной ДНК в месте введения. Через 10 минут после введения плазмидная ДНК обнаруживается во всех органах. Данный факт свидетельствует о том, что она разносится по организму с кровотоком, где циркулирует продолжительное время.

Плазмидная ДНК сохраняется до 42 суток в месте введения, в интактной мышце и крови. При этом количество плазмидной ДНК падает нелинейно. Данный феномен можно объяснить тем, что разные изоформы плазмидной ДНК (суперскрученная, открытая кольцевая и линейная) мигрируют метаболизируются с разной скоростью (Houk 2001). Так, линейная плазмидная ДНК демонстрирует кинетику 1го порядка, а суперскрученная нелинейную кинетику (Houk 2001). Во вводимом растворе доля суперскрученной фракции плазмидной ДНК составляла не менее 80 % (согласно ОФС 1.7.1.0013.18).

В большинстве остальных органов плазмидная ДНК отсутствовала через 6 часов. Вероятно, это связано с разной скоростью деградации плазмидной ДНК в разных органах. На скорость деградации влияет изоформенный состав раствора (Houk 2001) и возможное образование комплексов с белками и липидами (Clark 2013). Комплексы могут защищать ДНК от воздействия нуклеаз. Кроме того, анализируемый фрагмент составляет всего 172 п.н., и сохранение в клетках такого фрагмента не говорит о сохранении полноразмерной плазмиды. Вероятнее всего, до 42 суток сохраняются как раз небольшие фрагменты деградирующей плазмидной ДНК.

Плазмидная ДНК, преодолевшая гематоэнцефалический барьер, может сохраняться в клетках головного мозга надолго из-за низкой скорости регенерации клеток и ограниченного иммунного ответа (Rivest 2009).

Стоит отметить, что использованная методика позволяет оценивать динамику распределения плазмидной ДНК в рамках одного органа. Однако, она не позволяет напрямую сравнивать количество плазмиды, сохраняющееся в разных органах в связи с разной эффективностью выделения из них тотальной ДНК.

Исследование плазмидной ДНК pCMV-3Tag-3A-CV3V3 (80 % суперскрученной изоформы) показало, что биораспределение препарата носит преимущественно нелинейный характер. Она детектируется в месте введения, бедренной мышце интактной лапы и крови до 42 суток, в головном мозге до 7 суток и в остальных органах менее 6 часов.

Мы показали, что с помощью qPCR можно исследовать биораспределение и оценивать время жизни плазмидной ДНК в органах. Исследование биораспределения является частью фармакокинетики.

Литература

- Dukhovlinov, I.V., Chirak, E.L., Kolmakov, N.N., Fedorova, E.A. and Alekseev, A.V., (2020) Pat. of the Russian Federation № 2747762, PCT/RU2020/000257 appl. 5.04.2020
- Houk B E, Martin R, Hochhaus G and Hughes J A 2013 Pharmacokinetics of Plasmid DNA in the Rat Molecular Biology 25 pp 641–646
- Koressaar T and Remm M 2007 Enhancements and modifications of primer design program Primer3 Bioinformatics 23(10) pp 1289–1291
- Liu C, Fan M, Xu Q and Li Y 2008 Biodistribution and expression of targeted fusion anti-caries DNA vaccine pGJA-P/VAX in mice J Gene Med. 10 pp 298–305
- Palumbo R N, Zhong X, Panus D, Han W, Ji W and Wang C 2012 Transgene expression and local tissue distribution of naked and polymer-condensed plasmid DNA after intradermal administration in mice J of Controlled Release 159 pp 232–239
- Rivest S 2009 Regulation of innate immune responses in the brain Nat. Rev. Immunol. 9(6) pp 429–439

УДК 60.606

РАЗРАБОТКА И ПОЛУЧЕНИЕ ДНК-ИММУНОГЕНА НА ОСНОВЕ ГЕНОВ SARS-COV-2**А.А. Рябченкова, Е.Р. Чирак, Е.Л. Чирак, Н.Н. Колмаков, И.В. Духовлинов***ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия*

Возбудителем COVID-19 является бета-коронавирус SARS-CoV-2, распознанный в качестве патогена посредством секвенирования метагеномной РНК и выделения вируса из образцов жидкости бронхоальвеолярного лаважа пациентов с тяжелой пневмонией (Zhao, 2020).

За последний год был достигнут огромный прогресс в создании эффективных вакцин против SARS-CoV-2. Согласно предварительному проекту ВОЗ по вакцинам, в настоящее время 172 вакцины-кандидата находятся в стадии доклинической разработки, 63 – в стадии клинической разработки, 6 из которых основаны на технологии плазмидной ДНК (Dey, 2021). Эти вакцины могут легко производиться бактериями в больших количествах, их производство достаточно просто масштабируется и менее затратно по сравнению с иными вариантами вакцин (Xu, 2014).

На данный момент высказываются опасения по поводу безопасности и эффективности вакцин, разрабатываемых на основе различных технологических платформ. Важно, чтобы на введение вакцины не возникло аутоиммунной перекрестной реактивности за счет присутствия в активных агентах вакцины участков, гомологичных участкам генома человека (Vojdania, 2020). Кроме того, предпочтительнее использование вакцин, которые также действенны против мутировавших штаммов нового коронавируса.

Разработанные на данный момент вакцины недостаточно эффективны от мутирующих штаммов, поскольку содержат в себе в том числе неконсервативные последовательности S белка (Rodrigues, 2020). В связи с развитием пандемии и необходимостью массовой вакцинации разработка вакцин нового поколения против коронавирусной инфекции COVID-19 является важнейшей задачей медицины и биотехнологии. Поэтому актуальна разработка ДНК-иммуногена, безопасного и активного против мутирующих штаммов SARS-CoV-2.

Целью нашей работы было разработать и получить ДНК-иммуноген на основе плазмидной ДНК, кодирующей иммуногенные фрагменты структурных белков нового β -коронавируса SARS-CoV-2, вызывающего коронавирусную инфекцию 2019 (COVID-19).

Полноразмерная последовательность генома базового дикого типа SARS-CoV-2 была получена с сайта NCBI (NC_045512.2). Наиболее иммуногенные (клеточный иммунный ответ) фрагменты структурных белков M, S, N, E SARS-CoV-2 выбрали с помощью программы “CD4 T cell immunogenicity prediction” (Dhanda, 2018). Участки белков, содержащие наибольшее количество иммуногенных фрагментов, объединили с помощью полиглициновых линкеров. Выровняли полученную последовательность с помощью BLAST против белков человека, чтобы убедиться в отсутствии сходства. Для экспрессии в эукариотических клетках к гибридной последовательности также добавили транспортный сигнал белка ИГФ человека, последовательность Козака и старт-кодон.

Синтез гибридной последовательности с последующей вставкой в экспрессионный вектор pCMV-3Tag-3a был произведен на коммерческой основе в компании GenScript (США). Полученную плазмиду pCMV-3Tag-3a-CVVV3 нарабатывали в клетках *E.coli* DH5 α . Подлинность плазмиды подтверждали методом ПЦР, рестрикцией по сайтам клонирования BamHI и XhoI и секвенированием по Сэнгеру.

Выделение плазмидной ДНК из биомассы *E.coli* осуществляли методом щелочного лизиса. Осадок ДНК растворяли в воде и обрабатывали РНКазой А. Для последующей хроматографической очистки использовали последовательно анионообменную, гидрофобную и вновь анионообменную хроматографию.

Определение доли содержания суперспирализованных топоизомеров плазмидной ДНК производили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в градиенте натрия хлорида (Gen-Pak FAX, NP, АХС 4,6*100 мм 2,5 мкм, (Waters, США)). Отсутствие РНК проверяли по отсутствию диффузной полосы в области 200–500 пар нуклеотидов в 1 % агарозном геле. Определение содержания бактериальных эндотоксинов проводили с помощью ЛАЛ-теста (Pyrotell) согласно рекомендациям производителя. Определение содержания остаточных белков осуществляли методом твердофазного ИФА с помощью набора Cygnus *E.coli* Host Cell Proteins (Cygnus, № F410, США) согласно инструкции к набору.

Суммарные кроличьи антитела из сывороток крови получали двукратной иммунизацией с интервалом в 2 недели 6 самок кроликов породы Советская Шиншилла внутримышечно (в бедро) 2 мл следующей смеси: плазмидная ДНК – 0,2 мг/мл, полиэтиленмин – 1,2 мг/мл, Sabowax – 2 %, глюкоза – 10 %, бензиловый спирт – 0,3 %. Выделение и очистку антител проводили высаживанием насыщенным раствором сульфата аммония.

Наличие специфических антител к гибриднему белку CVVV3 определяли с помощью Вестерн-блоттинга с использованием белка CVVV3 в качестве антигена (был наработан в культуре эукариотических клеток HEK293) и антител, выделенных из сыворотки кроликов. Использовали поликлональные антитела Goat Anti-Rabbit IgG conjugate (HRP) (EMD Millipore Corp, USA), специфичные к линейным участкам белковой молекулы. Образовавшиеся в месте локализации исследуемого белка иммунные комплексы проявлялись с помощью тетраметилбензидина (ТМБ). Как отрицательный контроль была использована сыворотка кроликов до иммунизации.

Созданная конструкция (рисунок 1), представляет собой ДНК-иммуноген, кодирующий гибридный белок, состоящий из фрагментов основных белков М, S, N и Е коронавируса SARS-CoV-2. Химерный белок, экспрессирующийся в клетках млекопитающих, содержит 424 аминокислоты, имеет прогнозируемую массу 46,5 кДа и рI 9,61, является стабильным и его период полураспада у млекопитающих составляет около 100 часов (Dukhovlinov, 2020).

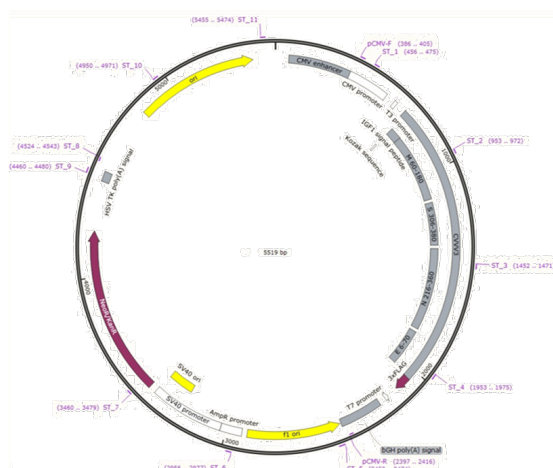


Рис. 1. Структура плазмиды pCMV-3Tag-3A-CVVV3 с праймерами, необходимыми для секвенирования вектора вместе со вставкой

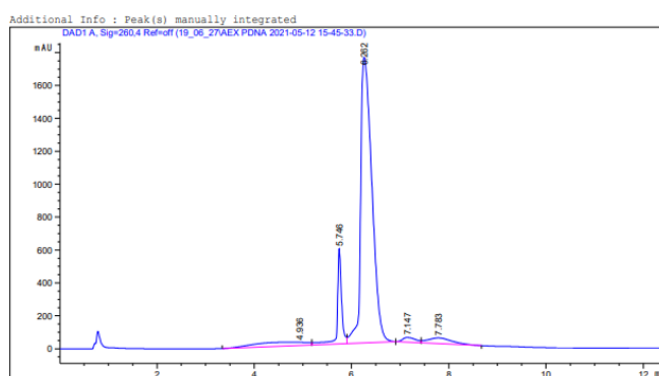


Рис. 2. Анализ образца pCMV-3Tag-3A-CVVV3 с помощью ВЭЖХ. Суперспирализованная изоформа – пик на 6,26 мин

В результате лизиса и хроматографической очистки из 1 кг биомассы получили 100 мг ДНК-иммуногена pCMV-3Tag-3A-CVVV3 в растворе с концентрацией 1 мг/мл.

Полученный образец проанализировали согласно ряду критериев, указанных в Государственной Фармакопее РФ (ОФС.1.7.1.0013.18 ДНК-вакцины). Время выхода суперспирализованной изоформы плазмидной ДНК составило 6,26 минут, площадь пика 85,64 % (рисунок 2).

Концентрация эндотоксинов в растворе 1 мг/мл составила менее 25,0 ЕЭ на 1 мл, концентрация остаточных белков штамма-продуцента составила менее 100нг на 1 мл. Таким образом, по перечисленным критериям наш ДНК-иммуноген по перечисленным параметрам качества соответствует ГФ РФ.

Из кроличьих сывороток было получено 30 мл суммарных иммуноглобулинов с концентрацией 10 мкг/мл. Антиген CVVV3, наработанный в линии эукариотических клеток HEK293, специфически связывается с иммуноглобулинами IgG из кроличьих сывороток после иммунизации ДНК-иммуногеном pCMV-3Tag-3A-CVVV3 (рисунок 3).

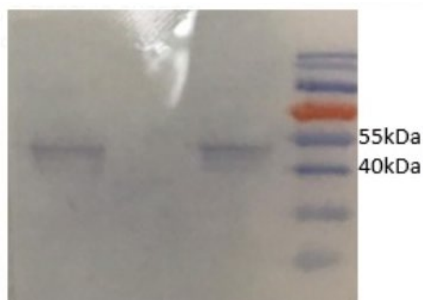


Рис. 3. Проверка экспрессии гибридного белка методом Вестерн-блоттинга. Образец рекомбинантного белка CVVV3, нарабатанный в культуре клеток НЕК293, нанесен в двух нагрузках. Source: Составлено авторами

В ходе работы был разработан и очищен ДНК-иммуноген для транзientной экспрессии в клетках млекопитающих, содержащий иммуногенные участки структурных белков М, S, N, Е β-коронавируса SARS-CoV-2.

Также была подтверждена экспрессия закодированного в нём рекомбинантного белка CVVV3 в клетках млекопитающих. Метод Вестерн-блоттинга позволил оценить формирование гуморального иммунного ответа на антиген CVVV3 и предварительно оценить его использование для разработки метода, аналогичного иммунофлуоресцентному анализу (He, 2004).

Кролики были двукратно иммунизированы рCMV-3Tag-3a-CVVV3 с адьювантным комплексом ПЭИ-Sabowax, поскольку существуют трудности в достижении достаточной иммуногенности ДНК-вакцин (Lee, 2018). В данном случае повышение иммуногенности ДНК-иммуногена требует добавления в состав вакцины иного адьюванта, поскольку адьювантный комплекс ПЭИ-Sabowax не зарегистрирован, либо изменения способа введения на внутрикожный с

использованием систем доставки. Также возможен вариант интраназальной иммунизации с добавлением адьюванта.

Разработанная технология получения ДНК-иммуногена приводит к выходу 0,1 мг/г – достаточно низкий выход по сравнению с литературными данными (Williams, 2010), однако данный фактор зависит большей частью от процесса ферментации и производственных мощностей. Для наработки большего количества ДНК-иммуногена процесс ферментации будет усовершенствован.

Разработана схожая ДНК-вакцина ZyCoV-D, кодирующая фрагменты S-белка SARS-CoV-2. ДНК-вакцина-кандидат индуцирует в том числе нейтрализующие антитела и обеспечивает ответ Th-1, о чем свидетельствуют повышенные уровни IFN-γ (Momin, 2021). Дизайн нашего ДНК-иммуногена позволяет прогнозировать схожие данные исследований иммуногенности и безопасности.

Мы разработали ДНК-иммуноген рCMV-3Tag-3a-CVVV3, кодирующий гибридный белок, содержащий иммуногенные участки структурных белков М, S, N, Е β-коронавируса SARS-CoV-2, для транзientной экспрессии в клетках млекопитающих. Данный ДНК-иммуноген рассматривается как перспективная кандидатная вакцина против SARS-CoV-2. Методом Вестерн-блоттинга подтверждена экспрессия гибридного белка CVVV3 в клетках млекопитающих. Усиление иммуногенных свойств ДНК-иммуногена рCMV-3Tag-3a-CVVV3 возможно изменением способа введения на интраназальный или внутрикожный. Созданный ДНК-иммуноген отвечает критериям кандидатной вакцины против COVID-19 нового поколения и в дальнейшей работе будет изучена иммуногенность и протективность.

Литература

- Dey, A. (2021) Immunogenic potential of DNA vaccine candidate, ZyCoV-D against SARS-CoV-2 in animal models. *Vaccine*, 39(30), 4108–4116.
- Dhanda, S.K. (2018) Prediction of HLA CD4 immunogenicity in human populations. *Front. Immunol.*, 9, 1369.
- Dukhovlinov, I.V., Chirak, E.L., Kolmakov, N.N., Fedorova, E.A. and Alekseev, A.V., (2020) Pat. of the Russian Federation № 2747762, PCT/RU2020/000257 appl. 5.04.2020
- He, Q. (2004) Development of a Western Blot Assay for Detection of Antibodies against Coronavirus Causing Severe Acute Respiratory Syndrome. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 11(2), 417–422.
- Lee, J. (2018) Engineering DNA vaccines against infectious diseases. *Acta Biomater.*, 80, 31–47.
- Momin, T. (2021) Safety and Immunogenicity of a DNA SARS-CoV-2 vaccine (ZyCoV-D): Results of an open-label, non-randomized phase I part of phase I/II clinical study by intradermal route in healthy subjects in India. *EClinicalMedicine*, 38.
- Rodrigues, João P.G.L.M. (2020) Insights on cross-species transmission of SARS-CoV-2 from structural modeling. *PLoS Comput Biol.*, 16(12).
- Vojdania, A., Kharrazianb, D. (2020) Potential antigenic cross-reactivity between SARS-CoV-2 and human tissue with a possible link to an increase in autoimmune diseases. *Clinical Immunology*, 217, 1–2.
- Williams, J.A. (2010) Generic plasmid DNA production platform incorporating low metabolic burden seed-stock and fed-batch fermentation processes. *Biotechnol Bioeng.*, 103(6), 1129–1143.
- Zhao, J. (2020) Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel Coronavirus disease 2019. *Clin. Infect. Dis.*, 71(16), 2027–2034.

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ IGY-ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ HBsAg

В.Б. Сбойчаков¹, С.В. Борисенко², А.М. Сокурова³

¹Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

³Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

Введение. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в мире зарегистрировано свыше 300 млн. человек, больных вирусным гепатитом В [16, 19]. Однако эти данные приблизительны и не отражают истинное число носителей HBsAg, так как при использовании высокочувствительных иммунологических тестов частота носительства HBsAg среди здорового населения может вырасти в 5–6 раз [12]. В России все пациенты, поступающие на стационарное лечение, обязаны обследоваться на наличие HBsAg, а сотрудники медицинских лабораторий – обследоваться на наличие этого маркера ежегодно [2]. Основным методом этиологической лабораторной диагностики вирусного гепатита В помимо клинико-биохимических признаков, является выявление поверхностного антигена вируса – HBsAg (Hepatitis B surface antigen) [1, 3].

Производство диагностических антител к HBsAg является длительным и дорогостоящим. Мы испробовали более гуманную и рентабельную биологическую модель для получения диагностических иммуноглобулинов. Это желточные иммуноглобулины (Ig Y, от англ. yolk) от различных видов птиц. Ig Y не вызывают ложноположительных реакций при тестировании на HBsAg, так как птицы эволюционно представляют собой отдельную ветвь развития, отличную от млекопитающих [10,20]. Получение яиц от иммунизированных птиц, вполне физиологично, в то время как получение сыворотки крови у лабораторных животных-млекопитающих – болезненная процедура, часто окончившаяся летально. Взятие крови в больших объемах часто приводит к смерти животного-донора [6, 17].

Цель исследования. На основе использования литературных данных и собственных исследований изучить возможности использования так называемых желточных антител для индикации HBsAg, как основного маркера вирусного гепатита В.

Материалы и методы. В качестве антигена для иммунизации использовали рекомбинантную вакцину против гепатита В фирмы «Engerix B™» (Бельгия), содержащую HBsAg, сорбированный на гидроокиси алюминия. Для усиления иммунного ответа применяли адъювант «Montanide ISA 70 VG» фирмы «Seppic» (Франция), который смешивали с антигеном до однородной эмульсии.

В качестве птиц-продуцентов использовали 47 перепелок вида *Coturnix japonica* породы «Фараон». Птицы были получены из ОАО «Перепелочка» (поселок Терволово Ленинградской области). Согласно требованиям SPF (specific pathogen free) [21] проверяли перепелок на наличие возбудителей кокцидиоза, сальмонеллёза, лейкоза и саркомы птиц, а также – болезни Гамборо, инфекционного бронхита и ларинготрахеита, реовирусного теносиновита, инфекционной анемии, болезни Ньюкасл, гриппа птиц, респираторного микоплазмоза и инфекционного синовита.

Перепелок иммунизировали дозой 200 мкг однократно в область тимуса. Ежедневно контролировали появление специфических антител (HBsAb) в пробах крови. В течение всего наблюдения у иммунизированных птиц не отмечены постинъекционные осложнения. Патологоанатомическое вскрытие показало, что в месте распределения иммунизирующего антигена воспаление визуально не определялось. Ткани тимуса и мышц перепелок не имели определяемых визуально изменений. Иммунизация птиц HBsAg практически не оказывала влияния на их физиологические функции и не приводила к снижению яйценоскости.

В литературе описано три группы методов получения желточных иммуноглобулинов [8,13,20]. Это, в первую очередь, методы осаждения различными химическими веществами, хроматографические методы (ионообменная хроматография, гель-хроматография) и ультрафильтрация.

Для выделения Ig Y мы использовали метод осаждения сернокислым аммонием $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Отделение овоальбуминов от желточных шаров проводили следующим способом. Яйцо после обработки антисептиком вскрывали с «тупой» стороны и его одержимое помещали на марлевую салфетку медицинской плотностью 36 г./м² [4], увлажненную 0,85 % раствором хлорида натрия.

Освобождали желток от белка покачиванием, затем желточную массу разводили дистиллированной водой в 5 раз. После перемешивания центрифугировали 30 минут при температуре +12 °С на центрифуге «MLW k-80» фирмы «Medizin Technik» (Германия) при 2200 об./мин. К супернатанту добавляли равный объём трихлорметана (CHCl_3) и перемешивали в течение 30 мин. Вновь повторяли центрифугирование, но уже при 8000 об./мин. и температуре +4 °С. Искомые Ig Y находились в верхней водной фазе.

Чистота полученных Ig Y определялась электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии лаурилсульфата натрия ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$). При этом белки находились в растворе, содержащем, отрицательно заряженный детергент – лаурилсульфат натрия. По результатам электрофореза обнаружено два вида белков с унифицированными единицами атомной массы 70 и 21 соответственно. Это равно массе «тяжёлых» и «лёгких» цепей Ig Y.

Анализ информации осуществляли с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0 for Windows. В основном, использовали методы непараметрической статистики [5, 14].

Результаты. На сегодняшний день основным методом лабораторной диагностики инфекционных заболеваний является иммуноферментный анализ [7, 9, 15]. Далее сконструировали тест-систему на основе твердофазного иммуноферментного анализа для индикации HBsAg в сыворотках крови больных.

Сорбцию выделенных нами IgY в лунках полистироловых планшетов осуществляли в 0,1 М карбонатно-бикарбонатный буфере (pH 9,5–9,6) в течение ночи (14–16 часов) при температуре +6 °С. Оптимальная концентрация IgY составила 100 мкг/мл. Прочие компоненты для осуществления анализа по индикации HBsAg брали из диагностической тест-системы «Вектоген-HBs-антиген-стрип» производства ЗАО «Вектор-Бест» (Россия). Реакцию осуществляли согласно прилагаемой инструкции производителя.

Учет результатов реакции проводили фотометрически при длине волны 492 нм. Для измерения величин оптической плотности продукта ферментативной реакции применяли вертикальный спектрофотометр (ридер) «Microplate Reader MP-6000» фирмы «Meredith Diagnostics» (Англия).

Для тестирования разработанной нами тест-системы на основе желточных иммуноглобулинов для индикации HBsAg в сыворотках больных использовали 35 сывороток больных с диагнозом «вирусный гепатит В», у которых ранее был выявлен HBsAg. В качестве контрольной группы исследовали 32 сыворотки, полученные от здоровых доноров.

Основными и главными характеристиками диагностических тест-систем являются чувствительность и специфичность. Для определения этих показателей использовали методы непараметрической статистики, в частности, – четырехпольные таблицы взаимной сопряженности (табл. 1).

Таблица 1. Четырехпольная таблица для расчета диагностических показателей тест-системы на основе Ig Y

Исследуемые сыворотки	Серопозитивные в ИФА	Серонегативные в ИФА	Всего
Сыворотки, содержащие HBsAg	ИП (32)	ЛО (3)	ИП+ЛО (35)
Сыворотки, не содержащие HBsAg	ЛП (4)	ИО (28)	ЛП+ИО (32)
Всего	ИП+ЛП (36)	ЛО+ИО (31)	ИП+ЛП+ИО+ЛО (67)

где: ИП – заведомо положительные; ЛП – ложноположительные; ЛО – ложноотрицательные; ИО – заведомо отрицательные.

Чувствительность (Ч), то есть способность разработанного метода давать правильный результат, определяемый как доля истинно положительных результатов среди всех проведенных анализов, выявляли по формуле (1). Специфичность (С) то есть способность разработанного метода не давать при отсутствии заболевания ложноположительных результатов, определяется как доля истинно отрицательных результатов среди здоровых лиц в группе исследуемых (2). Также определяли такие характеристики разработанной нами тест-системы как прогностичность положительного и отрицательного результатов. Эти показатели определяют количество действительно положительных или действительно отрицательных результатов анализа при наличии или отсутствии болезни или носительства HBsAg.

Прогностичность положительного значения вычисляли по (3). Аналогичное отрицательное значение определяли по формуле (4).

Также вычисляли такой интегративный показатель анализа как диагностическую эффективность (комбинация диагностической чувствительности и специфичности теста), который характеризует долю истинных результатов среди всех результатов лабораторного теста (5).

$$Ч = ИП / ИП + ЛО \times 100 \%. \quad (1)$$

$$С = ИО / ИО + ЛП \times 100 \%. \quad (2)$$

$$ПЗ+ = ИП / ИП + ЛП \times 100 \%. \quad (3)$$

$$ПЗ- = ИО / ИО + ЛО \times 100 \%. \quad (4)$$

$$ЭФ = ИП + ИО / ИП + ЛП + ИО + ЛО. \quad (5)$$

После несложных расчетов было показано, что чувствительность разработанной нами тест-системы на основе IgY-антител для индикации HBsAg составила 91,4 %, специфичность – 87,5 %, прогнозируемое положительное значение – 88,9 %, отрицательное – 90,3 %, а диагностическая эффективность приблизилась к 90 % (89,6 %).

Дискуссия. Применение в биотехнологии птиц для получения специфических иммуноглобулинов гораздо эффективнее по следующим причинам: птицы эволюционно представляют собой отдельную ветвь развития хордовых организмов, что снижает риск возможных ложноположительных реакций при исследовании биологических жидкостей млекопитающих; получение птичьих яиц – это чисто физиологическое явление, в данном случае никакое насилие над животными не применяется; многие птицы обладают высокой яйценоскостью – до 300 яиц в год, то есть практически по одному яйцу в день, что позволяет получать большое количество Ig Y-антител.

Поскольку молекула Ig Y не имеет шарнирной области, то желточные антитела менее подвержены протеолитической деградации и фрагментации за счет присутствия на ее месте зоны ограниченной гибкости на основе пролиновых и глициновых аминокислотных остатков [18,20]. Более того IgY не взаимодействуют с Fc-рецептором, ответственным за осуществление многочисленных эффекторных функций; не способны активировать комплемент, не связываются с ревматоидным фактором и не обладают перекрестной реактивностью с тканями человека.

При разработке IgY-технологий основным источником сырья служат куры (*Gallus domesticus*), однако куры, как и другие птицы, в связи с более низкой, чем у перепелок температурой тела, гораздо чаще инфицированы различными возбудителями бактериальной и вирусной природы. У кур гораздо сложнее поддерживать статус SPF [21]. Температура тела перепелок на 2 °C выше, чем у других видов птиц и составляет 41–42 °C, поэтому они не чувствительны к большинству птичьих патогенов.

Перепелиные яйца являются высококачественным диетическим продуктом, их также можно позиционировать как функциональные продукты питания (Food for Specific Health Use) [11]. Яйца перепелок буквально насыщены витаминами В₁ и А, минералами (железо и калий). Перепелиные яйца довольно редко вызывают аллергических реакций, поэтому могут быть рекомендованы и детям. Питательная ценность перепелиных яиц в 4 раза выше, чем куриных [10].

Помимо этого, перепелки обладают малой массой тела, что позволяет содержать их на малых производственных площадях. Они также отличаются высокой яичной продуктивностью. Перепелки имеют короткий период полового созревания, яйцекладка у них не зависит от сезона года. Использование перепелок в качестве продуцентов IgY-антител экономически более рентабельно, чем использование других видов животных, поскольку финансовые затраты на единицу массы получаемых антител значительно ниже.

Заключение. Оптимизирована технология получения и очистки желточных антител (IgY). В качестве птиц-продуцентов IgY наиболее целесообразно использовать перепелок вида *Coturnix coturnix japonica*. Показана реальная возможность использования IgY для индикации HBsAg. Особенностью IgY является устойчивость к трипсину и химотрипсину. Это в перспективе открывает возможности для энтеральной этиотропной терапии вирусного гепатита В. IgY-технологии, даже если они и нуждаются в дальнейших совершенствованиях, несомненно, будут иметь большое значение для биотехнологии и медицины во всем мире.

Литература

Приказ Минздрава РФ от 21 октября 2002 г. № 322 «О применении в практике здравоохранения иммуноферментных тест-систем для выявления поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) и антител к вирусу гепатита С (анти-ВГС) в сыворотке крови человека».

Совместный Приказ Министерства труда и социальной защиты Российской Федерации и Министерства здравоохранения Российской Федерации от 31.12.2020 г. № 988н/1420н «Об утверждении перечня вредных и (или) опасных производственных факторов и работ, при выполнении которых проводятся обязательные предварительные медицинские осмотры при поступлении на работу и периодические медицинские осмотры».

Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 28 января 2021 г. № 4 "Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 3.3686–21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». – Регистрационный № 62500 – 1092 с.

Межгосударственный стандарт ГОСТ 9412–93 «Марля медицинская. Общие технические условия» (введен в действие постановлением Комитета РФ по стандартизации, метрологии и сертификации от 18 января 1995 г. № 6).

Бакаева, О.А. Разработка визуального метода исследования зависимости категориальных переменных на основе таблиц сопряженности / О.А. Бакаева // Образовательные ресурсы и технологии. – 2014 – вып. 1/4. – С. 270–276.

Денисов, А.В. Этические аспекты использования животных в современных экспериментальных исследованиях / А.В. Денисов, В.А. Чепракова, А.В. Анисин, С.И. Безруков // Вестн. Росс. воен.-мед. акад. – 2018. – № 3 (63). – С. 238–243.

Долгов, В.В. Иммунохимический анализ в лабораторной медицине / В.В. Долгов. – М. – Тверь: ООО «Издательство Трида», 2015. – С. 34–38.

Иванов, А.П. Опыт применения IgY-технологии для лабораторной диагностики вирусных инфекций / А.П. Иванов, Т.Д. Клеблеева, О.Е. Иванова // Вопросы вирусологии. – 2020. – № 65(1). – С. 21–26.

Кропанева, М.Д. Нанозимы на основе берлинской лазури и иммуноанализ / М.Д. Кропанева, П.В. Храпцов, М.Б. Раев // Актуальная биотехнология – 2020. – № 3(34). – С. 294–297.

Сбойчаков, В.Б. Перепелиные яйца как диетический продукт и лекарство / В.Б. Сбойчаков, С.В. Борисенко // Мат-лы V Международного Балтийского морского форума. – Калининград: изд-во БГАРФ. – 2017. – С. 146–147.

Сбойчаков, В.Б. Желточные антитела (IgY) для диагностики и терапии инфекционных заболеваний / В.Б. Сбойчаков // Известия Российской Военно-медицинской академии. – 2020. – Т.39, № S3–2. – С. 145–150.

Сологуб, Т.В. Носительство HBsAg: состояние или болезнь? / Т.В. Сологуб, Е.В. Эсауленко, М.Г. Романцов, И.В. Фолитар // Инфекционные болезни. – 2008. – Т.6, № 3. – С. 5–10.

Юдина, А.Н. Способ селективного выделения и очистки иммуноглобулинов (IgY) из желтка яиц сельскохозяйственной птицы / А.Н. Юдина, А.А. Красноштанова // Успехи в химии и химической технологии: сб. науч. тр., том XXXIV (234). – М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2020 – С. 21–24.

Corder, G.W. Nonparametric statistics: a step-by-step approach. Second edition / G.W. Corder, D.I. Foreman // John Wiley & Sons. – 2014. – 452 p.

Engvall, E. The ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay / E. Engvall // Clinical Chemistry. – 2010. – № 56(2). – P. 319–320.

Golzar, H. Pre S1 mutations alter the large HBsAg antigenicity of a hepatitis B virus strain isolated in Bangladesh / H. Golzar, M. Muket, N. Nazmul, U. Keiji // Int. J. Mol. Sci. – 2020. – № 2 (15). – P. 546.

Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Research Council, National Academy Press, 2011. – 246 p.

Pereira, E.P. / Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health // E.P. Pereira, M.F. van Tilburg, E.O. Florean, M.I. Guedes // Int. Immunopharmacology. – 2019. – № 79. – P. 293–303.

Resolution WHA 63.18. Viral hepatitis. In Sixty-third World Health Assembly // Geneva: World Health Organization. – 2017. – 63 p.

Schade, R. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine / R. Schade, E.G. Calzado, R. Sarmiento, P.A. Chacana // Altern. Lab. Anim. – 2005/ – № 33(2). – P. 129–54.

Yeoman, C. J. The microbiome of the chicken gastrointestinal tract / C. J. Yeoman, N. Chia, P. Jeraldo, M. Sipos, N. D. Goldenfeld, B. A. White // Anim. Health Res. Rev. – 2012. – Vol. 13. – Pp. 89–99.

НАКОПЛЕНИЕ БИОМАССЫ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ НА РАЗЛИЧНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

А.В. Солдатенкова, С.А. Лазарев, Н.А. Михайлова

НИИВС им. И.И. Мечникова

Традиционным средством профилактики инфекционных заболеваний являются специфические вакцины. В последние годы особую значимость приобретают иммунобиологические препараты на основе условно-патогенных бактерий стимулирующие неспецифический иммунитет и обеспечивающие защиту от инфекции на ранних этапах ее развития.

Данное исследование выполнено в рамках НИР, проводимой ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова по созданию иммунобиологического препарата бактериального происхождения.

Целью настоящего исследования явился подбор рецептуры питательной среды для культивирования бактерий штаммов *E. coli* F147 и *P. vulgaris* 177 и выделения антигенов как иммунобиологического препарата.

Оценку свойств питательных сред проводили по показателям эффективности и скорости роста бактерий. Эффективность определяли по выходу микробных тел с 1 мл питательной среды в (млрд/мл), скорость роста – по минимальному времени инкубации после посева культур до достижения стационарной фазы, достаточному для их выявления.

Сравнительную характеристику питательных сред в микрообъемах (200 мкл) проводили на приборе Multiscan ascent, оснащенном программным обеспечением «Микроб-Автомат». С наиболее перспективными питательными средами, выявленными в ходе эксперимента, проводили культивирование на ферментере ФА 10 («Проинтех»), контролируя следующие показатели: O₂, pH, содержание глюкозы, концентрацию микробных клеток.

На основании проведенных экспериментов за солевую основу питательной среды взята рецептура среды Лиденберга, в качестве белковой основы – панкреатический гидролизат казеина (ПКГ) – 40 г./л. В дальнейшем варьировали содержание в них глюкозы от 1 до 4 г/л, дрожжевого экстракта от 1 до 3 г и соевого пептона 10 г./л. Всего приготовили и апробировали 24 варианта состава питательных сред. В результате определен оптимальный состав для накопления микробной массы: солевая основа среды лиденберга, ПКГ-40 г./л, глюкоза – 3 г/л, дрожжевой экстракт – 2 г/л и проведено 7 циклов культивирования на ферментере.

После культивирования на ферментере микробную массу собирали центрифугированием, осадок разводили в дистиллированной воде и инактивировали гидроксиламином. После обезвреживания проводили диализ. В дальнейшем антигены лиофильно высушивали и оценивали биохимическими и иммунологическими методами.

Литература

МУК 4.2.2316–08. Методические указания. Методы контроля бактериологических питательных сред. – М. : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. – 67 с.

УДК 577.322

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СТРУКТУРНОЙ АДАПТАЦИИ БЕЛКОВ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА (НА ПРИМЕРЕ ФИБРИНОГЕНА, КОАГУЛЯЦИОННОГО ФАКТОРА XIII И ПЛАЗМИН(ОГЕН)А)**Л.В. Юрина, А.Д. Васильева, В.С. Иванов, М.И. Индейкина, М.А. Розенфельд***Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия*

Белки представляют собой высокочувствительные мишени для активных форм кислорода (АФК). Окислительные модификации белков могут вызывать нарушение их структуры и механизма функционирования. В данной работе была исследована структурная адаптация белков системы гемостаза (на примере фибриногена, коагуляционного фактора XIII и плазмин(оген)а) к воздействию окислителя.

Пост-трансляционные окислительные модификации ФГ вызывают нарушения функциональных свойств белка и, как следствие, сборку фибрина, характеризующегося аномальной архитектурой, пониженной прочностью и эластичностью [1]. Альтернативная сборка трехмерной структуры фибриновой сети при окислении ФГ может быть обусловлена окислительными модификациями специфических остатков метионина, принадлежащих Aα-, Bβ- и γ-полипептидным цепям и, прежде всего, метионина AαMet476, локализованного в αC-доме [2]. Было показано, что окисление белка вызывало ингибирование процесса самосборки фибриновой сети. Методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии была проанализирована структура фибриновых гелей; отчетливо видно наличие тонких фибрилл и мелкопористой структуры фибрина после обработки окислителем. Методом ВЭЖХ-МС/МС был идентифицирован набор аминокислотных остатков, локализованных во всех трех Aα-, Bβ- и γ-полипептидных цепях фибриногена. Впервые установлено, что ряд сайтов, ответственных за превращение фибриногена в фибрин, не подвергается окислительным повреждениям. В покрытии области E, в том числе в структурах knob 'A', knob 'B', а также тромбин-связывающих участков, за исключением непокрытого AαTrp33, не обнаружено ни одного остатка, вовлеченного в окисление. В структурах hole 'a' и hole 'b', исключая окисленные остатки γHis240 и βMet367, в покрытиях также не выявлено ни одного модифицированного сайта. Идентифицированы окисленные аминокислотные остатки в αC-областях, в суперспиральном сегменте и C-терминальной части Bβ-цепи, которые могли бы влиять на агрегацию протофибрилл. Детектированы множественные окисленные остатки метионинов, которые могли бы служить перехватчиками АФК [3].

Плазменный коагуляционный фактор XIII (rFXIII) является ключевым белком системы свертывания крови, основная функция которого заключается в ферментативной ковалентной стабилизации полимерной структуры фибрина. Белок обладает гетеротетрамерой структурой, состоящей из двух каталитических FXIII-A2 и двух регуляторных субъединиц FXIII-B2 [4].

Методом масс-спектрометрии высокого разрешения, изучено гипохлорит-индуцированное окисление молекул rFXIII и его ферментативной формы FXIIIa. Показано, что серосодержащие и ароматические аминокислотные остатки являются наиболее уязвимыми к окислительной атаке. Данные масс-спектрометрии свидетельствуют о том, что в исследуемом нами белке за исключением активационного пептида, окисленные аминокислотные остатки обнаруживаются во всех структурных элементах каталитической субъединицы FXIII-A, в то время как в регуляторной субъединице FXIII-B целый ряд доменов остается в нативной форме. При обработке гипохлоритом FXIIIa были выявлены дополнительные сайты модификаций как в субъединице FXIII-A2*, так и в FXIII-B2. Полученные данные позволили постулировать, что в процессе превращения профермента в FXIIIa новые аминокислотные остатки, ранее недоступные окислителю, мигрируют к поверхности белковой глобулы, становясь уязвимыми мишенями для молекул окислителя, в то время как некоторые из исходно поверхностно-экспонированных аминокислотных остатков перемещаются внутрь белка, теряя способность вовлекаться в окислительные модификации [5].

Плазминоген, будучи предшественником плазмина, основная функция которого заключается в осуществлении внутрисосудистого тромболизиса, является полностью неизученным белком плазмы крови в отношении его посттрансляционных окислительных модификаций и, как следствие, структурных нарушений.

В данной работе было исследовано влияние окисления плазминогена и плазмина как на модификацию отдельных сайтов в первичной структуре белков, а также на ферментативную активность плазмина, образованного из окисленного плазминогена.

Используя метод масс-спектрометрии высокого разрешения показано, что малое количество окислителя вовлекало в процесс окисления только домены KR-2, KR-4 и SP, в то время как при более высоком количестве окислителя все структурные области плазминогена и плазмина были окислены. Наибольшее число сайтов окисления приходится на остатки метионина и циклические аминокислоты, среди которых триптофаны были наиболее доступными для окислителя. Окисление плазмина сопровождалось образованием дополнительных центров окисления в белке, отсутствующих в окисленном плазминогене.

Сделан вывод, что менее свернутая структура плазмина по сравнению с компактной структурой плазминогена становится более уязвимой для действия АФК. Обсуждается антиоксидантная роль метиониновых остатков в сохранении целостности ключевых остатков плазминогена [6].

В работе использовали оборудование ЦКП ИБХФ РАН.

Исследование выполнено в рамках бюджетного финансирования по Государственному заданию (тема 0084–2014–0001 и 0084–2014–0005) и при финансовой поддержке гранта РНФ № 21–74–00146.

Литература

- Weigandt K.M., White N., Chung D., Ellingson E., Wang Y., Fu X., Pozzo D.C. // Biophys. J. 2012. V. 103. P. 2399–2407.
Burney P.R., White N., Pfaendtner J. // PLOS ONE 2014. V. 9. P. 1–10.
Yurina L.V., Vasilyeva A.D., Bugrova A.E., Indeykina M.I., Kononikhin A.S., Nikolaev E.N., Rosenfeld M.A. // Doklady Biochemistry and Biophysics 2019, V. 484. P. 37–41.
Muszbek L., Bereczky Z., Bagoly Z., Komaromi I., Katona E. // Physiol. Rev. 2011, V. 91 (3). P. 931–939.
Vasilyeva A.D., Yurina L.V., Shchegolikhin A.N., Indeykina M.I., Bugrova A.E., Kononikhin A.S., Nikolaev E.N., Rosenfeld M.A. // Biomolecules 2020, V. 10. P. 914–931.
Vasilyeva A.D., Yurina L.V., Shchegolikhin A.N., Bugrova A.E., Konstantinova T.S., Indeykina M.I., Kononikhin A.S., Nikolaev E.N., Rosenfeld M.A. // Dokl Biochem Biophys. 2019, V. 488(1). P. 332–337.

УДК 616–006–092.9

Е3-УБИКВИТИНЛИГАЗА PIRH2 ВЛИЯЕТ НА УРОВЕНЬ АУТОФАГИИ В КЛЕТКАХ РАКА ЛЕГКОГО

О.А. Федорова, А.И. Гудович, А.А. Дакс, О.Ю. Шувалов, А.В. Петухов, Е.В. Байдюк, Н.А. Барлев

ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Аутофагия – естественный, регулируемый процесс в клетках, при котором ненужные компоненты клеток доставляются внутрь ее лизосом и вакуолей и подвергаются в них деградации.

Важно отметить, что на поздних стадиях онкогенеза раковые клетки используют аутофагию для поддержания пролиферации в неблагоприятных условиях, включая противораковую лекарственную терапию.

Известно, что Е3 – убиквитинлигазы играют важную роль в контроле аутофагии. В данной работе мы показали, что Е3-убиквитинлигаза Pirh2 участвует в регуляции аутофагии в клетках рака легкого. Используя метод ПЦР в реальном времени, мы показали, что Pirh2 влияет на регулирующий уровень аутофагии. Важно отметить, что Pirh2 влиял на экспрессию генов на разных этапах аутофагии (инициация, элонгация и образование аутофагосомы). Существует несколько методик оценки уровня аутофагии в клетках, среди которых общепризнанной является оценка уровня LC3-II в клетках. При активации аутофагии цитозольная форма LC3 (LC3-I) связывается с липидом PE, что приводит к образованию липидной формы LC3 (LC3-II). В линиях с нокадауном Pirh2 сигнал LC3-II был понижен, что также свидетельствует о подавлении аутофагии в клетках с пониженной экспрессией Pirh2. Эти результаты были подтверждены иммуноцитохимией с использованием антитела к LC3 и красителя LysoTracker. Известно, что один из механизмов устойчивости к химиопрепаратам является активация аутофагии в клетках. Мы также показали, что клетки с нокадауном Pirh2 были более чувствительны к доксорубину. Обобщая полученные данные, мы показали, что Е3-убиквитинлигаза Pirh2 регулирует уровень аутофагии в клетках рака лёгкого.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 18–75–10076.

УДК 547.458.6+637.144.5

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КОМПЛЕКСОВ β - И γ -ЦИКЛОДЕКСТРИНА С ГИДРОЛИЗАТОМ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ МОЛОКА НА ТЕСТ-ОБЪЕКТЕ *TETRAHYMENA PYRIFORMIS*

Т.Н. Головач¹, В.Г. Цыганков², А.М. Бондарук², Л.Н. Журихина², В.П. Курченко¹

¹ Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

² Научно-практический центр гигиены, г. Минск, Республика Беларусь

Введение. Циклодекстрины (ЦД) обладают конусообразной пространственной структурой с гидрофобной полостью, в которую могут быть включены соединения различной природы. β - и γ -ЦД состоят из 8 и 9 мономеров глюкозы соответственно, формирующих циклическую структуру. В полости β -ЦД могут быть размещены гетероциклические или ароматические группы, тогда как γ -ЦД способны связываться макроциклические и стероидные вещества [1, 2].

Гидролизаты белков с глубокой степенью гидролиза, которые вносят в специализированные продукты питания, характеризуются специфическим горьким вкусом. Формирование наноконплексов с циклическими олигосахаридами приводит к снижению горечи включенных пептидов и увеличению их биологически активных свойств [3, 4]. Целесообразным представляется проведение токсикологической оценки опытных образцов клатратов β - и γ -ЦД с пептидами сывороточных белков молока.

В настоящее время инфузории *Tetrahymena pyriformis* являются универсальным тест-объектом для оценки биологической ценности и безопасности продуктов питания и кормов, а также широкого спектра соединений различной природы [5, 6, 7].

Цель работы – определение токсического действия наноконплексов β - и γ -циклодекстрина, включающих пептиды сывороточных белков молока, в тест-системе с инфузориями *T. pyriformis*.

Материалы и методы. В работе применяли клатраты β - и γ -ЦД с гидролизатом белков молочной сыворотки, полученные в НИЛ прикладных проблем биологии (Белорусский государственный университет).

На базе РУП «Научно-практический центр гигиены» проведена первичная токсикологическая оценка наноконплексов с применением тест-объекта *T. pyriformis*. Уровень токсического воздействия определяли по времени 50 % гибели инфузорий в культуральной среде с заданной концентрацией токсического вещества (LD_{50}). Готовили суспензии, содержащие 50–400 мг/мл клатратов, устанавливали активную кислотность суспензий на уровне 7,1–7,2 ед. рН. По 1 мл образца с различной концентрацией клатратов вносили во флакон объемом 10 мл (в двух повторностях), затем добавляли культуру инфузорий в стационарной фазе роста, содержащую $100\,000 \pm 1000$ организмов.

Продолжительность инкубирования образцов при 25 °С в остром эксперименте составляла 2–3 ч, в случае подострого эксперимента – 24 ч. Впоследствии в нативном препарате наблюдали картину интоксикации. В счетной камере Фукса-Розенталя определяли количество лизированных инфузорий до и после фиксации 5 % раствором йода. Пробит-анализ прямой летальности осуществляли с применением метода В.Б. Прозоровского [7].

Согласно результатам расчета % летальности *T. pyriformis* в остром (*acuta*) и подостром (*subacuta*) экспериментах устанавливали основные параметры токсичности (LD_{16} , LD_{50} , LD_{84}). Коэффициент кумуляции в остром эксперименте ($K_{кум\,acuta}$) определяли как соотношение $LD_{50\,subacuta}/LD_{50\,acuta}$.

Результаты и обсуждение. В сравнительных условиях оценены параметры токсичности образцов наноконплексов β - и γ -ЦД с гидролизатом сывороточных белков молока на тест-объекте *T. pyriformis*.

При исследовании показателей токсичности (острый эксперимент) в 1 мл питательной среды, содержащей культуру инфузорий в стационарной фазе роста, вносили 50–300 мг образца наноконплекса β -ЦД с пептидами сыворотки молока. Время экспозиции проб с простейшими при определении острой токсичности составляло 5 ч.

Спустя 5 ч инкубации при содержании клатрата 50 мг/мл численность инфузорий не отличалась от контрольного уровня, при концентрации 100–300 мг/мл – численность культуры снизилась на 8–54 % (летальность 8–54 %).

При исследовании подострой токсичности (время экспозиции 24 ч) наноконплекса β -ЦД с пептидами наблюдалось усиление токсического эффекта согласно показателям LD_{16} , LD_{50} и LD_{84} . В пробах, содержащих 100 мг/мл тестируемого образца, летальность простейших составила 12 %, а при внесении 150–300 мг/мл – летальность достигала 31–95 %.

Методом пробит-анализа [7] летальности инфузорий в остром и подостром экспериментах рассчитаны основные параметры токсичности клатрата β -ЦД с пептидами, что отражено в таблице 1.

Первичная токсиколого-гигиеническая оценка комплекса включения β -ЦД с пептидами в остром и подостром экспериментах на *T. pyriformis* показала, что в среднесмертельной дозе тестируемый объект относится к 5 классу токсичности (является нетоксичным), а по коэффициенту кумуляции – 4 классу токсичности (является малотоксичным).

Таблица 1 – Параметры токсичности наноконплекса β -ЦД с пептидами сыворотки молока по результатам оценки на *T. pyriformis*

Показатель токсичности	Величина токсичности	Класс токсичности
Острая токсичность		
ЛД ₁₆ , мг/мл	151,91±0,38	–
ЛД ₅₀ , мг/мл	277,25±1,30	5
ЛД ₈₄ , мг/мл	402,58±1,13	–
Подострая токсичность		
ЛД ₁₆ , мг/мл	111,20±4,19	–
ЛД ₅₀ , мг/мл	173,23±9,94	–
ЛД ₈₄ , мг/мл	235,26±0,61	–
Ккум _{acuta}	0,62	4

В эксперименте по определению острой токсичности в 1 мл питательной среды с культурой инфузорий в стационарной фазе роста вносили комплекс γ -ЦД с пептидами в количестве 50–400 мг. Продолжительность экспозиции проб с тест-объектом *T. pyriformis* составила 5 ч.

Через 5 ч инкубации инфузорий с клатратом γ -ЦД при концентрации 100 мг/мл численность инфузорий снизилась на 10–12 % (летальность составила 10–12 %), при 200–400 мг/мл – на 17–36 % по сравнению с контрольным уровнем.

В случае экспозиции наноконплекса γ -ЦД с пептидами в течение 24 ч (подострый эксперимент) наблюдалось усиление токсического эффекта по показателям ЛД₁₆, ЛД₅₀ и ЛД₈₄. При содержании комплекса 100 мг/мл летальность достигала 17–18 %, при увеличении концентрации клатрата до 200–400 мг/мл – 26–48 %. Параметры острой и подострой токсичности γ -ЦД с пептидами сывороточных белков представлены в таблице 2.

В целом, согласно среднесмертельной дозе образец наноконплекса γ -ЦД с пептидами относится к 5 классу токсичности, а по коэффициенту кумуляции – к 4 классу токсичности.

Таблица 2 – Параметры токсичности наноконплекса γ -ЦД с пептидами сыворотки молока по результатам оценки на *T. pyriformis*

Показатель токсичности	Величина токсичности	Класс токсичности
Острая токсичность		
ЛД ₁₆ , мг/мл	200,87±5,91	–
ЛД ₅₀ , мг/мл	493,06±4,01	5
ЛД ₈₄ , мг/мл	785,25±13,94	–
Подострая токсичность		
ЛД ₁₆ , мг/мл	127,40±3,93	–
ЛД ₅₀ , мг/мл	403,26±4,91	–
ЛД ₈₄ , мг/мл	679,10±13,76	–
Ккум _{acuta}	0,82	4

Принадлежность изучаемого объекта к классу токсичности (опасности) устанавливается по параметру, соответствующему наиболее высокому классу опасности (токсичности). Согласно классификации, представленной в таблице 3, клатраты β - и γ -ЦД с пептидами сыворотки молока отнесены к 4 классу токсичности (малоопасные соединения).

Таблица 3 – Токсикологическая классификация объектов по результатам их тестирования на *T. pyriformis*

Показатель	Классы по убывающей степени токсичности				
	1 (чрезвычайно опасные соединения)	2 (высоко опасные соединения)	3 (умеренно опасные соединения)	4 (малоопасные соединения)	5 (нетоксичные соединения)
ЛД ₅₀ , мг/мл	менее 0,1	0,1–1,0	1,1–20	21–50	более 50
Ккум _{acuta}	менее 0,1	0,10–0,30	0,31–0,49	0,50–1,0	более 1,0

Заключение. Представлено сравнительное исследование показателей токсичности нанокомплексов β - и γ -ЦД с гидролизатом сывороточных белков молока по результатам оценки на *T. pyriformis*. Согласно экспериментальным данным опытные образцы клатратов соответствуют 4 классу опасности (малоопасные соединения). Практическая значимость работы связана с внесением клатратов циклических олигосахаридов с пептидами в продукты специализированного питания на основе гидролизированных белков молока.

Литература

- Amphiphilic cyclodextrin nanoparticles / G. Varan, C. Varan, N. Erdoğan [et al.] // Int. J. Pharm. – 2017. – Vol. 531, № 2. – P. 457–469.
- γ -Cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications / Z. Li, M. Wang, F. Wang [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – Vol. 77, N2. – P. 245–255.
- Antimutagenic and antibacterial activity of β -cyclodextrin clathrates with extensive hydrolysates of colostrum and whey / T.M. Halavach [et al.] // Biointerface Res. Appl. Chem. – 2021. – Vol. 11, № 2. – P. 8626–8638.
- The use of 2D NMR to study β -cyclodextrin complexation and debittering of amino acids and peptides / G.A. Linde [et al.] // Food Res. Int. – 2010. – Vol. 4, № 1. – P. 187–192.
- Combinatorial QSAR modeling of chemical toxicants tested against *Tetrahymena pyriformis* / H. Zhu [et al.] // J. Chem. Inf. Model. – 2008. – Vol. 48, № 4. – P. 766–784.
- Альтернативные методы исследования (экспресс-методы) для токсиколого-гигиенической оценки материалов, изделий и объектов окружающей среды: метод. пособ. / Л.Г. Подунова, Т.А. Меньшикова, Я.Г. Двоскин. – Москва, 1999. – 108 с.
- Прозоровский, В.Б. Использование метода наименьших квадратов для пробит-анализа кривых летальности / В.Б. Прозоровский // Фармакология и токсикология. – 1962. – № 1. – С. 41–63.

МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И ПОЛИВИНИЛОВОГО СПИРТА ДЛЯ МЕДИЦИНЫ

Е.К. Мохова, Е.А. Соколова, М.Г. Гордиенко, Е.В. Мищенко, С.В. Каленов

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

В настоящее время разработка композиционных материалов на основе природных и синтетических полимеров, частицами серебра, золота или селена является довольно перспективной задачей для медицины, биотехнологии и тканевой инженерии [1, 2].

Целью данной работы являлась разработка пленок медицинского назначения на основе низкомолекулярного хитозана и поливинилового спирта (ПВС) с внедренными частицами селена. В настоящей работе, также изучался вопрос размера синтезированных частиц селена, введенных в пленки.

Методику получения пленок можно представить следующим образом: 4 % ПВС растворяли в 100 мл дистиллированной воды при температуре 80–90 °С в течение 3 часов; в 100 мл 2 % раствора низкомолекулярного хитозана (рН=1) добавляли заранее приготовленный 0,1М раствор аскорбиновой кислоты (5 мл). Затем, при интенсивном перемешивании к полученному раствору по каплям добавляли 0,125М селенистую кислоту (1 мл); затем, 100 мл раствора ПВС и 100 мл раствора низкомолекулярного хитозана, содержащего синтезированные частицы селена смешивали и выдерживали при температуре 60 °С в течение 2 часов, по истечении времени, полученный раствор полимеров оставляли на 24 часа при комнатной температуре. Далее на подложки из полипропилена, тонким слоем наносили полученный раствор ПВС и низкомолекулярного хитозана и обрабатывали глутаровым альдегидом, который выступал в качестве сшивающего агента.

В работе был проведен ряд аналитических исследований образцов: сканирующая электронная микроскопия, тест на растворимость, ИК-спектроскопия, тест на острую токсичность. Кроме того, были определены размеры синтезированных частиц селена и коэффициенты полидисперсности (Pdl), представленные в таблице 1.

Таблица 1. Размеры и коэффициенты полидисперсности синтезированных частиц селена

Образец	Время синтеза частиц селена, ч			Дисперсионная среда			Разбавление, % масс.
I	18			Уксусная кислота			15
II	42			Уксусная кислота			15
III	42			Вода			15
Образец	Количество измерений			Размеры частиц, нм			Pdl
	1	2	3	1	2	3	
I	Se 1	Se 2	Se 3	200,8–1083	831,5	104,2–799,7	0,530
II	Se 21	Se 22	Se 23	1462	1133–3901	1228	0,309
III	Se 31	Se 32	Se 33	162,3–490,8	423,7–5283	451,1	0,263

В настоящей работе были получены пленки на основе поливинилового спирта и хитозана; были проведены и проанализированы результаты исследований. Полученные материалы медицинского и биотехнологического назначения обладают гибкостью, эластичностью и структурной целостностью, которую пленки сохраняют в течении длительного времени в водной среде. Модификация пленок частицами селена позволяет улучшить их антиоксидантные и антибактериальные свойства, что особенно важно при применении данных материалов в качестве ранозаживляющих и противоожоговых средств.

Литература

- Sakr M. et al. Selenium nanomaterials in biomedicine – An overview of new opportunities in nanomedicine of selenium. JDDST, 2018, vol. 46, pp. 223–233.
- Tan L. et al. In vitro study on the individual and synergistic cytotoxicity of adriamycin and selenium nanoparticles against Bel7402 cells with a quartz crystal microbalance. Biosensors and bioelectronics, 2009, vol. 24, pp. 2268–2272.

УДК 577.344:611.441

ИЗМЕНЕНИЕ БАЛАНСА СТАБИЛЬНЫХ ИЗОТОПОВ ВОДОРОДА В ОРГАНИЗМЕ КАК ФАКТОР АКТИВАЦИИ ФУНКЦИИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**Н.В. Яглова, С.С. Обернихин, Е.П. Тимохина, В.В. Яглов***НИИ морфологии человека, Москва, Россия*

Атом водорода имеет три изотопа – протий, дейтерий и тритий, первые два из которых являются стабильными. Содержание дейтерия в организме достаточно велико [4], но его биологическая роль в функционировании клеток изучена крайне мало. Данные, полученные в экспериментах на культурах клеток о изменении скорости химических реакций, не всегда отражают изменения, которые происходят в органах *in vivo*, поскольку в организме все метаболические реакции и процессы регулируются гормонами, цитокинами, нейромедиаторами и т. д. [3]. Насколько изменение поступления дейтерия в организм может влиять на функционирование регуляторных органов, а именно, эндокринных желез не понятно. В наших предыдущих исследованиях мы установили, что понижение содержания дейтерия в организме в течение 24 ч активирует продукцию тиреоидных гормонов [1].

Цель исследования – изучить продукцию гормонов щитовидной железы мышей при краткосрочном повышении содержания дейтерия во внутренней среде организма.

Материалы и методы. Исследование выполнено на самцах крыс Вистар, полученных из питомника ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (филиал «Столовая»). Экспериментальную группу составили животные, которые вместо водопроводной воды потребляли воду с повышенным содержанием дейтерия 500000 ppm (ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Россия). Содержание дейтерия в воде определяли с помощью спектрального жидкостного изотопного анализатора T-LWIA-45-EP («Los Gatos Research», США). Контрольную группу составили животные, потреблявшие дистиллированную воду с содержанием дейтерия 146 ppm. Животных контрольной и экспериментальной выводили из эксперимента через 1 и 3 суток передозировкой золетила.

Содержание и уход за животными в виварии осуществлялся по нормам и правилам обращения с лабораторными животными, в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985 г.), правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ от 19.06.2003 г. № 267) и законом «О защите животных от жестокого обращения» гл. V, ст. 10, 4679-ГД от 01.12.1999 г. Эксперимент проведен в соответствии с правилами работы с использованием экспериментальных животных, утвержденными приказом Минздрава СССР № 577 от 12.08.1977 г.

Учет потребляемой воды и определение массы тела крыс проводили ежедневно. Определяли потребление воды на единицу массы тела. Рассчитывали объем циркулирующей плазмы и сопоставляли его с объемом потребления воды в сутки.

В сыворотке крови крыс определяли содержание гормонов щитовидной железы: общего тироксина (Т4), свободного тироксина (сТ4), общего трийодтиронина (Т3) и свободного трийодтиронина (сТ3), и гипоталамического тиреотропного гормона (ТТГ) методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью коммерческих наборов («BioVendor», США).

Статистический анализ проводили с помощью программы Statistica 7.0 («Statsoft Inc.», США). Для описания количественных признаков проводили анализ соответствия вида распределения признака закону нормального распределения с использованием критериев Колмогорова-Смирнова, Лиллиефорса, Шапиро-Уилка. Сравнение независимых групп по количественному признаку проводили с помощью t-критерия Стьюдента с учетом значений критерия Левена о равенстве дисперсий. Статистически значимыми различия считались при $p < 0,05$.

Результаты. Объем потребленной воды в контрольной и экспериментальной группах в 1-е, 2-е и 3-и сутки не отличался и превышал объем циркулирующей плазмы почти вдвое.

Через сутки после начала эксперимента у крыс, потреблявших воду с содержанием дейтерия 500000 ppm, обнаружено статистически значимое повышение продукции Т4 в системном кровотоке. Содержание его свободной фракции не изменялось и не отличалось от значений контрольной группы. Концентрация Т3 в сыворотке крови снизилась незначительно, а содержание свободного Т3, напротив, был статистически значимо меньше контрольных значений. Уровень ТТГ был в три раза ниже, чем у крыс контрольной группы (рис. 1).

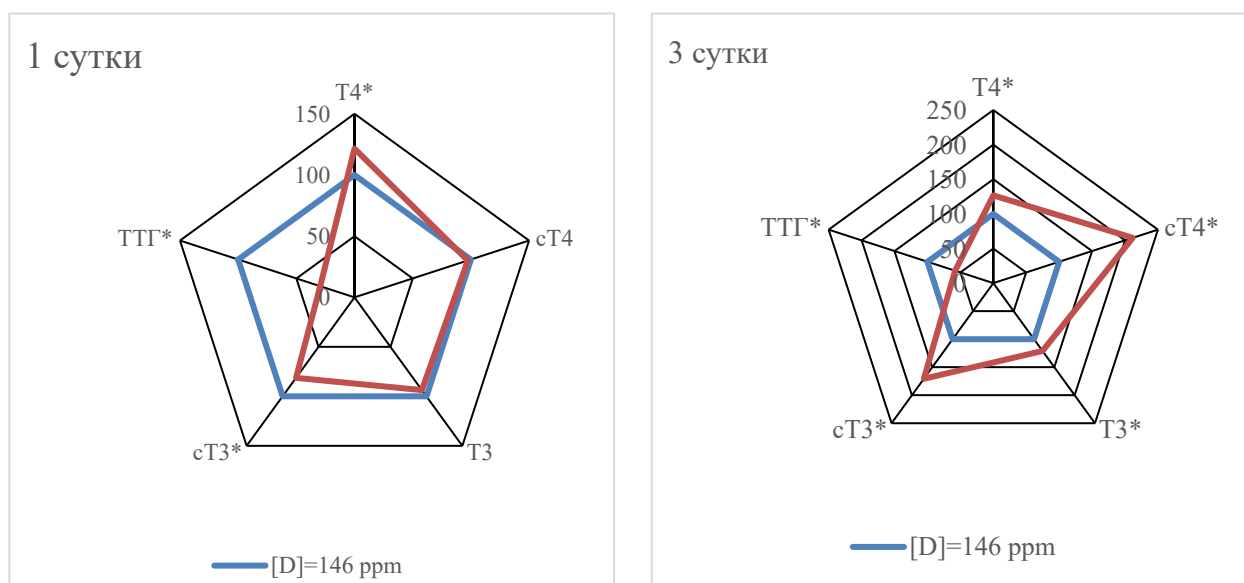


Рис. 1. Изменения продукции гормонов щитовидной железы и ТТГ гипофиза через 1 и 3 суток потребления воды с содержанием дейтерия 500000 ppm. Примечания: значения контрольной группы [D]=146ppm приняты за 100 %. * – $p < 0,05$ при сравнении с контролем

Через трое суток у крыс экспериментальной группы выявлены повышение концентрации Т4 как по сравнению с предыдущим сроком исследования, так и значениями контрольной группы. Уровень свободного Т4 также повысился и втрое превысил значения аналогичного показателя в контроле. Аналогично Т4 продукция Т3 также значительно повысилась. Содержание в сыворотке свободной фракции Т3 увеличилось и превысило контрольные значения. Уровень ТТГ повысился по сравнению с предыдущим сроком исследования, но был ниже контрольных значений (рис. 1).

Таким образом, тиреоидный статус крыс свидетельствует об усилении функциональной активности щитовидной железы. Снижение секреции ТТГ указывает, что эти изменения обусловлены непосредственно реакцией щитовидной железы на повышение содержания дейтерия во внутренней среде организма. Поскольку усиления превращения Т4 в Т3 не наблюдалось, можно прийти к заключению, что активность периферических дейодиназ не изменялась, и, видимо, эти ферменты менее чувствительны к повышению содержания дейтерия в организме [2].

Выводы. Увеличение поступления дейтерия в организм в течение 3 суток является фактором, активирующим продукцию гормонов в щитовидной железе и непосредственно не влияющем на секрецию тиреотропного гормона гипофизом.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-015-00236 А.

Литература

- Яглова Н.В., Обернихин С.С., Тимохина Е.П., Яглов В.В. Реакция гипофизарно-тиреоидной оси на кратковременное изменение содержания дейтерия в организме // Бюлл. exper. биол. 2021. Т. 171. № 2. С. 232–234.
- Bates J.M., St. Germain D.L., Galton V.A. Expression Profiles of the Three Iodothyronine Deiodinases, D1, D2, and D3, in the Developing Rat. *Endocrinology*. 1999. Vol. 140. No. 2. P. 844–851.
- Boros L.G., D'Agostino D.P., Katz H.E., Roth J.P., Meuillet E.J., Somlyai G. Submolecular regulation of cell transformation by deuterium depleting water exchange reactions in the tricarboxylic acid substrate cycle. *Med Hypotheses*. 2016. Vol. 87. P. 69–74.
- Somlyai G., Javaheri B., Davari H., Gyöngyi Z., Somlyai I., Tamaddon K.A., Boros L.G. Pre-Clinical and Clinical Data Confirm the Anticancer Effect of Deuterium Depletion. *Biomacromol. J*. 2016. Vol. 2. No. 1. P. 1–7.

УДК 66.047

СРАВНЕНИЕ ПРОТИВОПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ОЧИЩЕННОГО ЭКДИСТЕРОНА С ЭКСТРАКТАМИ ЕГО ОСНОВНЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ**Ю.Н. Кирдеева¹, Н.П. Тимофеев², Н.А. Барлев¹, О.Ю. Шувалов¹***Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
Крестьянское Хозяйство «БИО», Коряжма, Россия*

Экдистерон (20-гидроксиэкдизон) является представителем широкого класса стероидных соединений (фитоэкдистероидов – ФЭС), синтезируемых рядом растений и регулирующих процессы развития насекомых. Интересно, что в организме человека экдистерон проявляет анаболические, гипогликемические, антиоксидантные, кардио-, нейропротекторные и адаптагенные свойства (Lafont et al. 2009). Кроме того, нами и рядом других исследователей были обнаружены противоопухолевые свойства экдистероидов (Kononova et al. 2002; Martins et al. 2015; Shuvalov et al. 2020).

Несмотря на столь обширные экдистерон-опосредованные фармакологические активности, внимание исследователей сконцентрировано в основном на изучении его анаболических свойств, проявляемых в мышечных тканях. Следует отметить, что экдистерон широко используется спортсменами для повышения как выносливости, так и силовых показателей (Dinan and Lafont, 2006), поэтому он с недавнего времени находится в фокусе внимания всемирного антидопингового комитета (ВАДА) в качестве потенциального допинга. Главным образом благодаря анаболическим свойствам, на мировом рынке БАДов продается большое количество экдистерон-содержащих препаратов. При этом в настоящее время не известны ни точные механизмы воздействия экдистерона на мышечные клетки, ни молекулярные механизмы, лежащие в основе всего спектра опосредованных экдистероном фармакологических эффектов.

Основными продуцентами экдистерона и других биологически активных фитоэкдистероидов для человека являются: Левзея сафроловидная (*Rhaponticum carthamoides* – моралий корень), Аюга туркестанская (*Ajuga turkestanica* – живучка) и Цианотис паукообразный (*Cyanotis arachnoidea*). Главным образом используются спиртовые экстракты корней и корневищ, либо надземных частей этих растений с их последующим концентрированием. Как правило, такие экстракты, помимо набора основных (20-гидроксиэкдизон, туркестерон, инокостерон, аюгастерон и др.), содержат так же и ряд минорных ФЭС, которые в значительной степени способны изменять биологическую активность основных ФЭС, влияя на их стабильность в пищеварительном тракте (Тимофеев, 2005). В дополнении к ФЭС, такие растительные экстракты содержат ещё фенольные соединения (флавоноиды и фенольные кислоты), терпены и сесквитерпены, которые так же влияют на биологическую активность экстрактов рассматриваемых растений.

В данном исследовании мы сравнили противоопухолевую активность химически чистого экдистерона (чистота $\geq 95\%$), а так же экстрактов Левзеи, Живучки и Цианотиса с установленным содержанием экдистерона. Изучалось их влияние на цитотоксичность, сенсibilизацию к цитотоксическим препаратам, способность к пролиферации и миграции, клеточный цикл, интенсивность энергетического метаболизма, уровень активных форм кислорода и апоптоза. Для исследования были использованы клеточные модели немелкоклеточного рака легкого человека (H1299, H1975, H460, A549), а так же фибробласты (DF2, WI_38).

Результаты данного исследования свидетельствуют о значительно менее выраженной противоопухолевой активности химически чистого экдистерона в сравнении с растительными экстрактами с известным его содержанием.

Данное исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ № 21–75–10138.

Литература

- Dinan, L., Harmatha, J., Volodin, V., & Lafont, R. (2009). Phytoecdysteroids: diversity, biosynthesis and distribution. In Ecdysone: structures and functions (pp. 3–45). Springer, Dordrecht.
- Lafont, R., & Dinan, L. (2003). Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: and update. Journal of insect science, 3(1), 7.
- Kononova, N.P., et al. (2002). Ecdysterone modulates antitumor activity of cytostatics and biosynthesis of macromolecules in tumor-bearing mice. Biology Bulletin of the Russian Academy of Sciences, 29(6), 530–536.
- Martins, A., et al. (2015). Ecdysteroids sensitize MDR and non-MDR cancer cell lines to doxorubicin, paclitaxel, and vincristine but tend to protect them from cisplatin. BioMed research international, 2015.
- Shuvalov, O., Fedorova, O., Tananykina, E., Gnennaya, Y., Daks, A., Petukhov, A., & Barlev, N.A. (2020). An arthropod hormone, ecdysterone, inhibits the growth of breast cancer cells via different mechanisms. Frontiers in Pharmacology, 11.
- Тимофеев, Н.П. (2005). Экдистероиды и их биологическая активность: физиологические действия, молекулярные механизмы, компьютерные модели и кофакторы. In Информационно-вычислительные технологии в решении фундаментальных и прикладных научных задач: Сессия ИВТН-2005 (pp. 37–45).

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ФУЛЛЕРЕНОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

К.С. Эльбекьян¹, А.А. Комарова¹, О.А. Дюдюн¹, З.Х. Султыгова², Р.Д. Арчакова², О.А. Яндиев²

¹ *Ставропольский государственный медицинский университет, Ставрополь, Россия*

² *Ингушский государственный университет, Магас, РИ, Россия*

Модифицирующие добавки фуллеренов к маслам вызывают резкое уменьшение окисляемости, увеличение фотостабильности и бактерицидности жидкой фазы. Исследование растворимости в растительном масле связано, прежде всего, с изучением вопроса о совместимости лёгких фуллеренов с маслами [1].

Фермент щелочная фосфатаза (ЩФ) является катализатором процессов расщепления эфиров фосфорной кислоты при рН 8,6–10,1. Этот показатель имеет как самостоятельное диагностическое значение, так и входит в состав «печеночных проб». Выявление уровня фермента в крови используется для оценки работы печени, почек и желчных протоков, мониторинга состояния костной ткани.

Цель исследования: изучение биологических свойств композиции смеси фуллеренов C60-C70 на основе растительного масла на активность щелочной фосфатазы.

Для достижения поставленной цели был проведён эксперимент на крысах-самцах линии Wistar (с начальной массой 340±5 г.) Животные были разделены на 3 группы по 10 особей в каждой. Первую группу составили животные, находящиеся на стандартном рационе питания, составленного по ГОСТ 33215–2014, вторая группа в течение 14 дней получала вместе с кормом рафинированное кукурузное масло в объеме 0,5 мл, а третья группа – композицию смеси фуллеренов с кукурузным маслом (1 мг/мл) в том же объеме.

Композиция смеси фуллеренов C60-C70 (установка ДУГА-4М) [2] на основе растительного масла (рафинированного кукурузного) получена способом диспергирования в ультразвуковой мойке Elmasonic S10H при температуре 50° С и частоте 37 кГц в течение 15–60 мин. По результатам микроскопических и спектрофотометрических исследований (микроскоп ЛОМО МСП-1, спектрофотометр Unico 2100) увеличение времени диспергирования приводит к эффективному разрушению агрегатов и формированию устойчивых микрогетерогенных систем [3].

На 15-ый день осуществлялся забор крови из хвостовой вены для определения активности щелочной фосфатазы (биохимический анализатор Vitalon 400). В результате параллельного определения массы тела и активности ЩФ в сыворотке крови у животных выявили закономерные, статистически значимые сдвиги.

Выявлено что активность фермента достигает максимальной величины в крови у животных второй группы 282,9±14,1 Ед./л (в контроле 177,1±1,1 Ед./л). В данной группе отмечалось увеличение массы тела на 23 % по сравнению с контрольной группой. Ожирение и повышенная активность ЩФ может указывать на жировую инфильтрацию печени у данных животных. В ходе эксперимента было обнаружено, что даже относительно невысокая доза фуллеренов при ежедневном введении в организм лабораторных животных оказывает влияние на изучаемые параметры. Масса тела животных в третьей группе после использования фуллереносодержащего рациона снизилась на 6 %, а активность ЩФ на 30 %. Таким образом, полученные данные позволяют рассматривать фуллерены и их производные в качестве перспективных препаратов для медицины.

Литература

1. Растворимость легких фуллеренов в некоторых эфирных и растительных маслах / К.Н. Семенов, Н.А. Чарыков, О.В. Арапов, О.В. Проскурина, А.О. Тарасов, Е.Н. Строгонова, Н.М. Сафьянников // *Химия растительного сырья*, 2010, № 2, С. 147–152.
2. Разработка методов выделения фуллеренов из сажи / Парчиева М.М., Цурова А.Т., Султыгова З.Х., Арчакова Р.Д. // *Материалы региональной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Молодые исследователи в поиске»*. – Магас, 2012. С. 65–67.
3. Способ получения композиции фуллеренов на основе растительного масла методом ультразвукового диспергирования / Эльбекьян К.С., Комарова А.А., Дюдюн О.А., Султыгова З.Х., Арчакова Р.Д., Яндиев О.А., Блинов А.В. // *Материалы VIII Международной научной интернет-конференции «Физико-химическая биология»*. Ставрополь. Изд-во: СтГМУ, 2020. С. 22–24.

УДК 616.379–008.64:577.11

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА ГИМНЕМЫ ЛЕСНОЙ НА ПОКАЗАТЕЛИ УГЛЕВОДНОГО И ЛИПИДНОГО ОБМЕНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ**К.С. Эльбекьян, А.Б. Муравьёва, Е.В. Маркарова, О.А. Дюдюн***Ставропольский государственный медицинский университет, Ставрополь, Россия*

Вспомогательная терапия при лечении сахарного диабета может увеличить эффективность традиционного лечения. В настоящее время экспериментально обоснованы универсальные терапевтические свойства экстракта Гимнемы лесной (ГЛ) в борьбе со многими заболеваниями [1]. Целью данного исследования явилось изучение влияния экстракта Гимнемы лесной на показатели углеводного и липидного обмена при экспериментальном сахарном диабете.

Эксперименты проводились на крысах-самцах ($n = 60$), которые были разделены на 3 группы (по 20 животных в каждой): первая группа – контроль, вторая – группа животных, получивших аллоксан однократно (в дозе 150 мг/кг) (экспериментальная модель сахарного диабета), третья группа – животные, получавшие экстракт ГЛ в дозе 280 мг/кг, на фоне аллоксан-индуцированного сахарного диабета.

На 15 сутки наблюдений у животных был осуществлён забор крови для определения содержания продуктов углеводного (глюкозы, гликированного гемоглобина) и липидного обмена (триглицеридов (ТГ), липопротеинов низкой плотности (ЛПНП)). Биохимические исследования показали, что у крыс с аллоксан-индуцированным сахарным диабетом содержание глюкозы и гликированного гемоглобина в крови увеличилось на 11 % и 16 % соответственно ($p \leq 0,05$) по сравнению с показателями контрольной группы.

У животных с аллоксановым диабетом наблюдались нарушения и липидного обмена, которые проявлялись повышением содержания ТГ и ЛПНП в плазме крови. Через 15 дней их количество достоверно увеличилось на 33 % и 26 % соответственно ($p \leq 0,05$).

Следовательно, введение аллоксана позволило нам воспроизвести состояние близкое по значениям к диабету 1 типа, характеризующееся гипогликемией и нарушением липидного обмена.

При регулярном введении животным экстракта ГЛ (15 дней, 280 мг/кг), на фоне аллоксанового диабета, были получены следующие результаты: уровень глюкозы достоверно снижался в крови животных в 1,2 раза, а содержание гликированного гемоглобина в 1,4 раза (в сравнении группой аллоксан-индуцированных животных). Вероятно, что гипогликемическое действие экстракта ГЛ связано с усилением секреции инсулина β -клетками островков Лангерганса [2]. Отмечались также, значительные гиполипидемические эффекты, проявляющиеся снижением уровня ТГ на 23 % и ЛПНП на 20 % в сравнении с аллоксан-индуцированными животными.

Таким образом, ГЛ способствует улучшению состояния животных больных сахарным диабетом, выражающееся антигипергликемическим эффектом, нормализацией липидного обмена.

Литература

Triterpenoids from *Gymnema Sylvestre* and their pharmacological activities /G.D. Ffabio, V. Romanucci, A. De Marco, A. Zarrelli // *Molecules*. – 2014. – Vol. 19, № 8. – P. 10956–10981

Влияние комбинированного растительного препарата на углеводный обмен у крыс при аллоксановом диабете / А.Б. Муравьёва, Е.В. Маркарова, О.А. Дюдюн // *Здоровье человека в XXI веке. Качество жизни. XIII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием: Сборник научных статей. Казань, 19–20 марта 2021 г. Казань. С. 236–238.*

ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ ДЛЯ БИОМЕДИЦИНЫ

С.Н. Тиморшина, Е.А. Ганецкая, А.А. Осмоловский

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики, Москва, Россия

С каждым годом увеличивается востребованность протеолитических ферментов в биомедицине и биофармацевтике в связи с разработкой новых методов их применения. Вследствие этого растет и дефицит протеаз направленного действия с искомыми физико-химическими и биохимическими свойствами. Одними из наиболее актуальных направлений развития современной биофармацевтики являются поиск и изучение ферментов и ферментных препаратов, эффективных в терапии ран и инфекций, вызываемых бактериями, способными к биопленкообразованию (Fleming and Rumbaugh, 2017; Suresh et al., 2019). При лечении обширных ран и ожогов оказывается важным этап очистки области поражения от некротизирующих тканей, богатых фибриллярными белками, такими как коллаген, фибрин, кератин, которые могут служить питательным субстратом для патогенных и условнопатогенных микроорганизмов. Хирургический подход, наиболее распространенный в настоящее время, приводит к повреждению здоровых тканей и увеличению времени заживления и реабилитации, тогда как удаление продуктов распада клеток и деградациии тканевой жидкости за счет ферментов позволяет снизить негативное воздействие на здоровые ткани. Более того, при ожоговых повреждениях наблюдается иммуносупрессия, благодаря чему инфекции развиваются почти беспрепятственно. Наиболее распространенный представитель микробиоты ожоговых ран – *Pseudomonas aeruginosa* – бактерия, способная к активному биопленкообразованию, что снижает эффективность стандартной антибиотической терапии (Андреева и др., 2018; Sevgi et al., 2014). Полное разрушение матрикса биопленок, богатого полисахаридами, приводит к переходу клеток инфекционного агента в планктонную форму и их распространению по организму человека (Mann et al., 2012). В связи с этим нами предложена схема комбинированной терапии, заключающейся в обработке биопленок *Pseudomonas aeruginosa* смесью протеаз и антибиотиков для частичного разрушения матрикса и проникновения бактерицидных агентов в толщу биопленок с предотвращением появления планктонных форм патогена и его распространения по организму.

Бактерии и микроскопические грибы – наиболее широко используемые в промышленности продуценты ферментов, в том числе протеаз. Однако более экологичные и рентабельные методы культивирования, применяемые именно при выращивании микромицетов, а также большее разнообразие ферментов, синтезируемых одним организмом, делает мицелиальные грибы наиболее перспективными продуцентами согласно современным тенденциям экономики (de Souza et al., 2015). Вследствие этого нами был проведен скрининг среди препаратов внеклеточных белков микромицетов-продуцентов протеолитических ферментов для поиска препаратов с востребованными для биомедицины и биофармацевтики свойствами.

Скрининг проводили среди ферментных препаратов 12 штаммов микроскопических грибов рода *Aspergillus* из коллекции кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Также сравнивали свойства изучаемых образцов с коммерческими препаратами: кислой протеазой *Aspergillus saitoi*, террилитином (протеазы *Aspergillus terricola*, применяемые в ожоговой терапии) и трипсином. Комплексные препараты внеклеточных белков микромицетов получали путем культивирования продуцентов в глубинных условиях на ранее подобранных средах, высаливания белков сульфатом аммония из культуральной жидкости, а также последующих диализа и лиофильного высушивания. Хранение препаратов осуществляли при -20 °С. Для изучения специфичности протеолитической активности ферментов проводили реакции с суспензиями окрашенных белковых субстратов: 0.2 % азоказеина, 0.2 % азоколлагена, 10.0 % кератин-азура, 0.2 % эластин-конго красного (ЭКК) и 2.0 % Hide Powder Azure (HPA). Все суспензии готовили на 0.05 М Трис-НCl буфере (рН 8.2). Количество продуктов реакции измеряли спектрофотометрически. За единицу активности принимали количество фермента, которое вызывало изменение оптической плотности на 0.01 ед. в условиях проведения реакции (рН 8.2, 37 °С, при перемешивании).

Результаты скрининга ферментных препаратов с различными окрашенными белковыми субстратами представлены в таблице 1. Как видно из полученных данных, большинство изучаемых ферментных препаратов обладают общей протеолитической активностью, сопоставимой с коммерческими препаратами, на что указывает активность с азоказеином и HPA.

Низкая эластолитическая активность позволяет сделать предположение о низком уровне патогенности микроскопических грибов (Kothary et al., 1984; Tamura et al., 1992; Khosravi et al., 2012), что является необходимым свойством для внедрения продуцентов в промышленность. А внеклеточные протеазы микромицетов *A. alliaceus*, *A. giganteus*, *A. raperi* и *A. sclerotiorum* показали большую эффективность при гидролизе азоколлагена и кератин-азура, чем коммерческие препараты, что может говорить о их перспективности в терапии ожоговых ран.

Таблица 1. Протеолитическая активность ферментных препаратов микромицетов рода *Aspergillus*

Культура	Протеолитическая активность с окрашенными субстратами, Е				
	Азоказеин	Азоколлаген	Кератин-азур	ЭКК	НРА
<i>A. alliaceus</i>	78.7	20.5	13.9	1.2	94.6
<i>A. candidus</i>	55.5	3.2	6.1	1.2	81.8
<i>A. flavipes</i>	2.5	1.6	2.4	0.2	55.6
<i>A. flavus</i>	100.2	3.9	6.5	0.2	97.5
<i>A. fumigatus</i>	92.6	8.3	1.0	0.5	73.8
<i>A. giganteus</i>	95.4	15.3	12.0	2.0	74.7
<i>A. ochraceus</i>	88.9	10.8	9.0	1.7	85.6
<i>A. raperi</i>	88.9	25.4	7.7	0.1	86.0
<i>A. sclerotiorum</i>	82.2	17.8	13.1	0.3	78.9
<i>A. sydowii</i>	101.9	5.5	2.8	0.5	86.5
<i>A. terreus</i>	92.6	8.4	4.0	0.9	71.0
<i>A. ustus</i>	95.3	10.5	4.5	0.7	88.1
<i>A. saitoi</i> _{коммерц.}	2.3	0.7	7.5	0.2	4.8
Террилитин	100.0	10.5	10.1	0.0	96.8
Трипсин	77.2	10.2	0.0	0.2	94.6

*A. saitoi*_{коммерц.} – коммерческий препарат кислой протеазы *A. saitoi*

Также было изучено действие некоторых ферментных препаратов на биопленки *Pseudomonas aeruginosa*. Культивирование биопленок проводили в 12-луночных планшетах в течение 48 часов при 37 °С. Затем в лунки добавляли 50 мкл раствора ферментного препарата, раствора антибиотика (10 мг/л) или их комбинацию (10 и 40 мкл), воду (50 мкл) использовали для контрольных образцов. Инкубирование проводили в течение 4 часов. Далее жидкость с планктонными формами удаляли, количество метаболически активных клеток в биопленках определяли спектрофотометрически с помощью МТТ.

Наибольший эффект наблюдали при использовании ферментного препарата микромицета *A. fumigatus*. При добавлении антибиотика изменения количества метаболически активных клеток по сравнению с контролем не происходило, комплексный препарат внеклеточных белков *A. fumigatus* снизил это значение на 31 %, их комбинация на 35 %. Таким образом, микромицет *Aspergillus fumigatus* может быть рассмотрен в качестве источника ферментов для терапии инфекций, связанных с развитием биопленок *Pseudomonas aeruginosa*.

Результаты данного исследования указывают на высокий потенциал грибных протеолитических ферментов в терапии ожоговых ран, а также на перспективность поисковых работ в области ферментов направленного действия микромицетного происхождения.

Литература

- Андреева С.В. и др.. Чувствительность к антисептикам биоплёночных форм *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных из ожоговых ран // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2018. № 3. С. 249–256
- de Souza P.M., Bittencourt M.L., Caprara C.C. A biotechnology perspective of fungal proteases // Brazilian Journal of Microbiology. 2015. V. 46. № 2. P. 337–346.
- Fleming D., Rumbaugh K.P. Approaches to Dispersing Medical Biofilms // Microorganisms. 2017. V. 5. № 2. P. 15.
- Khosravi A.R., Mahdavi Omran S., Shokri H., Lotfi A., Moosavi Z. Importance of elastase production in development of invasive aspergillosis // Journal de mycologie medicale. 2012. V. 22. № 2. P. 167–172.
- Kothary M.H., Chase T. Jr., Macmillan J.D. Correlation of elastase production by some strains of *Aspergillus fumigatus* with ability to cause pulmonary invasive aspergillosis in mice // Infection and Immunity. 1984. V. 43. № 1. P. 320–325.
- Mann E.E., Wozniak D.J. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology // FEMS microbiology reviews. 2012. V. 36. № 4. P. 893–916.
- Sevgi M., Toklu A., Vecchio D., Hamblin M.R. Topical Antimicrobials for Burn Infections – An Update // Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov. 2014. V. 8. № 3. P. 161–197.
- Suresh M.K., Biswas R., Biswas L. An update on recent developments in the prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms // International journal of medical microbiology. 2019. V. 309. № 1. P. 1–12.
- Tamura Y., Suzuki S., Sawada T. Role of elastase as a virulence factor in experimental *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice // Microbial pathogenesis. 1992. V. 12. № 3. P. 237–244.

**ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОДЛИННОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КР-СПЕКТРОСКОПИИ**

А.Ю. Хрущев, Кис И.В., С.В. Антонова, В.Б. Муравьева, О.А. Махлис, Н.И. Соболева

*Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов,
Москва, Россия*

КР-спектроскопия является эффективным современным методом для определения подлинности (аутентичности) лекарственных препаратов. Данный метод позволяет получать результат исследований в максимально сжатые сроки, при этом рутинный анализ выполняется без использования стандартных образцов, реактивов и расходных материалов. КР-спектроскопия позволяет оценивать не только изменения количественного состава действующих веществ, но также регистрировать изменения содержания вспомогательных компонентов, нарушение технологии производства готовых лекарственных форм (фракционный состав суспензий, чистота использованных субстанций, цветность и мутность растворов, изменения состава или качества упаковочных материалов и т. д.). Это предоставляет исследователю универсальный инструмент для контроля качества лекарственного препарата по множеству не связанных показателей. В отличие от БИК-спектроскопии вода практически не искажает КР-спектр, что делает метод более универсальным [1,2]. Целью данной работы является оценка возможности использования КР-спектроскопии в качестве рутинного метода для контроля качества жидких форм лекарственных препаратов.

В рамках выполнения данной работы была создана электронная библиотека, включающая КР-спектры 81 лекарственного препарата для ветеринарного применения различных фармакологических групп: антибактериальные, антипаразитарные и нестероидные противовоспалительные препараты в форме растворов и суспензий. Для оценки аутентичности препарата использован метод дискриминантного анализа. Качество каждого препарата, перед внесением его спектра в библиотеку, было проверено согласно требованиям нормативного документа. В данной работе был использован спектрометр комбинационного рассеяния Renishaw inVia Basis. Время проведения анализа при использовании лазера ближнего инфракрасного диапазона ($\lambda=785$ нм) составило менее 1 мин. Для всех препаратов была разработана универсальная процедура анализа, которая значительно упрощает работу оператора.

Ограниченное применение КР-спектроскопии в качестве рутинного метода анализа связано со сложностью получения воспроизводимых спектров. Одной из причин этого является нарушение соосности оптических элементов прибора и флуктуации мощности лазера. Для решения данной проблемы нами предложена процедура предварительного контроля и корректировки энергии лазерного излучения посредством использования кремниевого эталона (пик 520 см^{-1}), с последующей математической обработкой данных для коррекции длины оптического пути. Важным этапом данной работы являлся учет допустимой дисперсии концентрации действующих веществ препаратов. Было установлено, что в математическую модель необходимо включать спектры не менее 3 – 5 серий лекарственного препарата, произведенных в разное время. Разработанная методика показала свою эффективность в тестах с использованием реальных образцов лекарственных препаратов и может быть рекомендована для использования в лабораториях по контролю качества лекарственных средств.

Литература

Крашенинина М.П., Медведевских М.Ю., Галеева Е.В., Галеев Р.Р. Применение спектрометрии комбинационного рассеяния света с целью контроля качества лекарственных средств, находящихся в инъекционной форме. Эталоны. Стандартные образцы. 2019; 15(1):39–53.

Galeev R., Ma B., Saveliev A., Ilishat A. Quantitative analysis of injectable drug products using non-invasive wideband Raman Technology // American Pharmaceutical review. 2015. Vol. 18. № 6.

УДК 577.112.6 577.336

ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ БЕЛКОВ-ОНКОМАРКЕРОВ МІА И СУРВИВИН БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМ МИКРОАНАЛИЗОМ

Е.Е. Баишмакова, А.Н. Кудрявцев, Н.С. Панамарев, Л.А. Франк

Институт биофизики СО РАН, Красноярск, Россия

Белок с меланома-ингибирующей активностью МІА (Melanoma Inhibitory Activity protein, мол. масса 12 кДа) представляет собой биомаркер меланомы, указывающий на наличие заболевания и связанные с ним клинические проявления. Выступает в роли раннего индикатора терапевтического ответа для оценки эффективности новых меланома-ингибирующих препаратов [1].

Сурвивин – мультифункциональный белок (мол. масса 16,5 кДа), способный ингибировать апоптоз, регулировать деление клеток и способствовать ангиогенезу. В настоящее время его рассматривают как диагностический онкомаркер, а также как белок имеющий определенный терапевтический потенциал [2]. Целью настоящей работы являлось создание биолюминесцентного твердофазного микроанализа конкурентного типа для определения белков-онкомаркеров МІА и сурвивина. Отсутствие сертифицированных для клинического применения тест-систем этих белков определяет актуальность данного исследования.

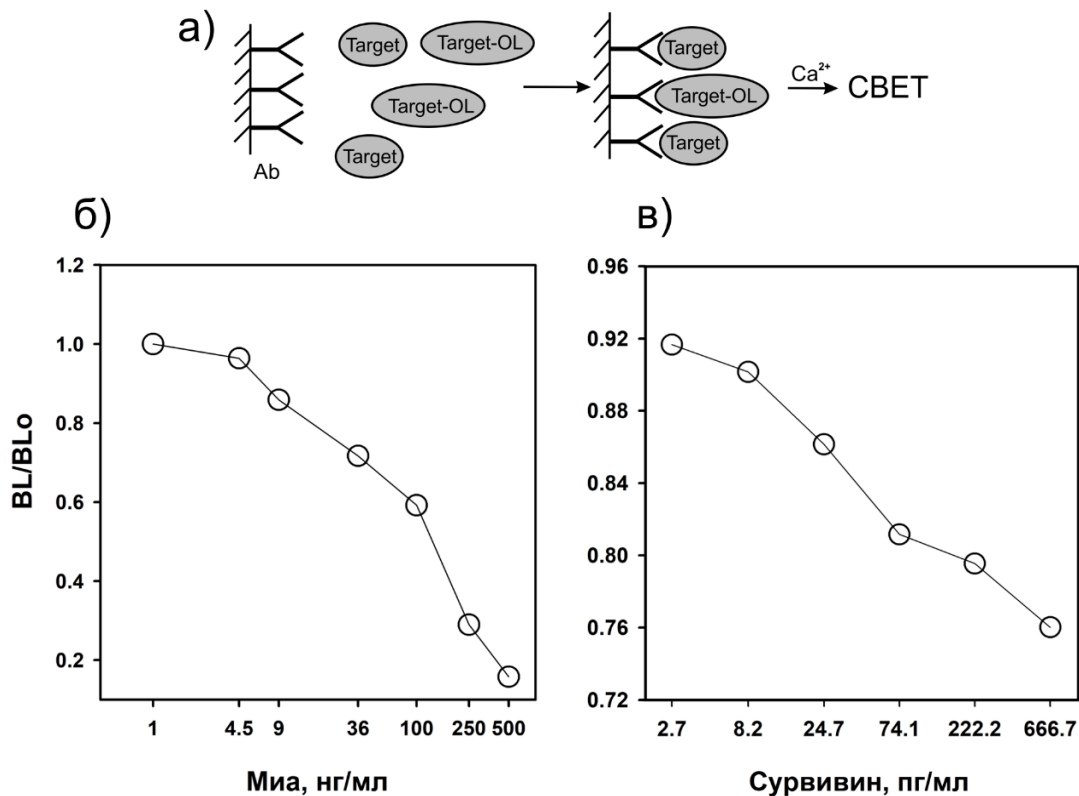


Рис. 1 (а) Схема биолюминесцентного микроанализа конкурентного типа для выявления сурвивина и МІА. Target – рекомбинантный белок МІА или сурвивин, target-OL – гибридный белок МІА, либо сурвивин с обелином, Ab – антитела специфичные к соответствующим искомым белкам; (б) Результаты модельного микроанализа МІА, (v). Результаты модельного микроанализа сурвивина. BL/BL₀ – отношение биолюминесцентного сигнала от данного образца к сигналу от образца, не содержащего сурвивин, либо МІА. Каждая точка – среднее от двух независимых измерений.

В качестве репортерных молекул для детекции мишени особо интересны светоизлучающие (биолюминесцентные) белки – люциферазы. При разработке дизайна иммуноанализа МІА и сурвивина конкурентного типа в качестве молекул-конкурентов за связывание с соответствующими антителами были сконструированы, получены и охарактеризованы гибридные белки, в состав которых, помимо домена онкомаркера входил домен Ca²⁺ регулируемого фотопротейна обелина, в качестве сигнального

фрагмента. Этот белок представляет собой стабильный нековалентный комплекс полипептида, и предокисленного субстрата (2-гидропероксицелентеразина) [3]. Присоединение ионов Ca^{2+} сопровождается мгновенным светоизлучением в виде короткой яркой вспышки. Благодаря низкому уровню фонового свечения и высокому квантовому выходу реакции обелин выявляют в аттомолярных количествах. Величина сигнала не зависит от наличия субстрата или каких-либо кофакторов и при избытке Ca^{2+} линейно связана с концентрацией белка.

Схема разработанного конкурентного варианта твердофазного иммуноанализа приведена на Рис. 1а вверху. Лунки планшета активировали специфичными к соответствующему онкобелку антителами, за связывание с которыми конкурируют молекулы сурвивина или МІА и их гибриды с обелином. При этом наблюдается обратная зависимость биолуминесцентного сигнала от концентрации искомого белка. Такой формат анализа, в отличие от сэндвич-формата, позволяет использовать только одно антитело, что удобно, учитывая малые размеры молекулы-мишени (молекулярный вес сурвивина и МІА 16,5 и 12 кДа, соответственно) с одной стороны, и удешевляет анализ с другой.

В активированные антителами лунки непрозрачного микропланшета вносили растворы содержащие одинаковую концентрацию соответствующего гибридного белка и разные концентрации рекомбинантных сурвивина или МІА в буферном растворе. После инкубирования и промывок выявляли сформировавшиеся на поверхности комплексы по биолуминесценции обелина при добавлении раствора CaCl_2 . В модельных экспериментах по выявлению онкомаркера МІА предложенным анализом показана зависимость биолуминесцентного сигнала от концентрации МІА в диапазоне от 9 до 500 нг/мл (рис 1б). Обратную зависимость биолуминесцентного сигнала от содержания свободного сурвивина наблюдали в диапазоне концентраций последнего от 2,7 до 700 пг/мл (рис 1в).

Данные диапазоны относятся к диагностически значимым при выявлении сурвивина [4, 5] и МІА [6] в биологических образцах, что определяет перспективность адаптации предложенного способа для клинического применения.

Работа по созданию биолуминесцентного анализа белка МІА выполнена при финансовой поддержке гранта президента РФ для молодых ученых – кандидатов наук МК-772.2020.4

Работа по созданию биолуминесцентного анализа белка сурвивина выполнена при финансовой поддержке гранта «Разработка и валидация молекулярно-генетических методов диагностики и стратификации риска рецидивирования немышечно инвазивного рака мочевого пузыря (НМИРМП) (код заявки 2021012006966)» Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности.

Литература

1. Weinstein D., Leininger J., Hamby C., Safai B. Diagnostic and prognostic biomarkers in melanoma. J Clin. Aesthet. Dermatol, 2014, 7(6), 13–24.
2. Слепов Е.В., Башмакова Е.Е., Панамарев Н.С., Франк Л.А., Зуков Р.А. Белок сурвивин как перспективный маркер диагностики и лечения злокачественных новообразований. Эффективная фармакотерапия. 2021, 17 (2), 58–63.
3. Высоцкий Е.С., Маркова С.В., Франк Л.А. Кальций-регулируемые фотопротейны морских кишечнополостных. Молекулярная биология, 2006, 40, 404–417.
4. Gunaldi M., Isiksacan N., Kocoglu H., Okuturlar Y., Gunaldi O., Topcu T., Karabulut M. The value of serum survivin level in early diagnosis of cancer. J Cancer Res Ther, 2018, 14(3), 570–573.
5. Srivastava A.K., Singh P.K., Srivastava K., Singh D., Dalela D., Rath S.K., Goel M.M., Brahma Bhatt M.L. Diagnostic role of survivin in urinary bladder cancer. Asian Pac J Cancer Prev. 2013, 14(1), 81–85.
6. Sandru A., Panaitescu E., Voinea S., Bolovan M., Stanciu A., Cincea S., Blidaru A. Prognostic value of melanoma inhibitory activity protein in localized cutaneous malignant melanoma. J Skin Cancer. 2014; 2014: 843214.

УДК 571.27

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БЛОКИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ БУФЕРОВ
ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ТИТРА АНТИТЕЛ К ВИРУСУ SARS-COV-2
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ МЫШЕЙ****А.Д. Бидина, В.Ю. Кан, П.М. Петрова, Д.Е. Зрелкин, Д.В. Воронина***НИЦЭМ имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва,
Россия*

Пандемия, вызванная вирусом SARS-CoV-2, является чрезвычайной ситуацией в области общественного здравоохранения. Эффективные диагностические инструменты пользуются большим спросом, поскольку быстрое и крупномасштабное тестирование играет ключевую роль в оценке эпидемиологической ситуации, индивидуальном мониторинге пациентов, а также проверке иммуногенности новых вакцин.

Иммуногенность вакцин оценивается на животных, в частности на мышах, с последующим определением титра антител в иммуноферментном анализе (ИФА). Поэтому для получения достоверных результатов требуется оптимизация условий проведения ИФА с сывороткой опытных животных. Ключевую роль в снижении неспецифического и фонового сигнала играет выбор блокирующего буфера. Блокирующий буфер представляет собой раствор смеси белков, которые адсорбируются на поверхности лунки планшета, тем самым устраняя гидрофобное связывание иммуноглобулинов с иммуносорбентом, а также неспецифические белок-белковые взаимодействия.

Целью данного исследования являлось определение оптимального состава блокирующего буфера для количественной оценки титра антител к вирусу SARS-CoV-2 в сыворотке крови иммунизированных мышей.

В качестве блокирующих агентов использовали бычий сывороточный альбумин (BSA), казеин, обезжиренное сухое молоко в различных концентрациях (1–5 %). Твердофазный сэндвич-ИФА проводили, иммобилизуя рецептор-связывающий домен S-белка вируса SARS-CoV-2 на поверхности полистиролового 96-луночного планшета. Для промывания планшетов, а также для разведения блокирующих агентов использовали фосфатно-солевой буфер с добавлением 0,05 % Твин-20. Опытная сыворотка была получена путем внутримышечной иммунизации мышей линии Balb/c аденовирусным вектором, кодирующим последовательность S-белка SARS-CoV-2. Отрицательным контролем являлась сыворотка интактных животных. Блокирующую способность буферов оценивали по уровню снижения неспецифического сигнала.

В результате, при использовании обезжиренного молока, независимо от концентрации, несмотря на низкие фоновые значения, уровень специфического сигнала был в два раза ниже, чем при использовании казеина или BSA. Титр антител в иммунной сыворотке определялся как 1:1600. BSA в качестве блокирующего агента показал превышение фонового сигнала во всех концентрациях (1–5 %) в 5 раз по сравнению с двумя другими буферами. Это может объясняться большим молекулярным весом фрагментов BSA, что оставляет некоторые участки пластиковой поверхности планшета незаблокированными, с которыми могут связываться компоненты системы на следующих стадиях анализа. Титр антител составил 1:800. Оптимальные значения как специфического, так и фонового сигнала регистрировались с казеиновым буфером в диапазоне концентраций 2–5 %. При использовании данного блокирующего агента количество антител в исследуемой сыворотке соответствовало титру 1:6400. Высокую блокирующую способность казеина объясняют небольшим размером белковых частиц, эффективно связывающихся с вакантными сайтами иммуносорбента. Таким образом, нами было показано, что блокирующий буфер, содержащий 2 % казеина, является наиболее эффективным и целесообразен в использовании с экономической точки зрения.

Литература

Safiabadi Tali SH, LeBlanc JJ, Sadiq Z, et al. 2021. Tools and techniques for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 detection. Clin Microbiol Rev 34: e00228–20.

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ФЛАГЕЛЛИНА *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

А.П. Жеребцов, А.А. Калошин, Н.А. Михайлова

Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

Синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) – грамотрицательная бактерия, обладающая многочисленными факторами патогенности и вызывающая до 20 % внутрибольничных инфекционных заболеваний у пациентов с ослабленным иммунитетом. Большинство штаммов *P. aeruginosa*, циркулирующих в клинике, обладают высокой резистентностью по отношению к широкому спектру антибиотиков, что повышает актуальность разработки антисинегнойных вакцин.

В последнее время возрос интерес исследователей к семейству белков флагеллинов, которые являются главным компонентом жгутиков, участвующих в проявлении вирулентности возбудителя и в формировании реакций организма хозяина на внедрение патогена за счет активации факторов врожденного и адаптивного иммунного ответа. Известно, что флагеллин является лигандом для рецептора врожденной иммунной системы TLR5 (toll-like receptor 5). Образование комплекса флагеллин – TLR5 стимулирует развитие защитных реакций организма.

Целью исследования явилось получение рекомбинантной формы консервативного флагеллина-С *P. aeruginosa*, формирующего базальное тело жгутика бактерии. Полноразмерную последовательность гена *FlicC* синтезировали в результате ПЦР на основе матричной ДНК штамма PA¹⁰³ *P. aeruginosa*. Дизайн праймеров осуществляли с использованием полноразмерной последовательности ДНК штамма PA¹⁰³ *P. aeruginosa*, опубликованной в базе данных GenBank. Прямой праймер (5' – GGA TCC GCC TTG ACC GTC AAC ACC AAC ATC G) имел дополнительный сайт рестрикции *Bam*HI, а обратный праймер (5' – AAG CTT AGC GCA GCA GGC TCA GAA CCG AC) – дополнительный сайт рестрикции *Hind*III, что было необходимо для встраивания в бактериальный экспрессирующийся плазмидный вектор QE-30 (Qiagen).

На первом этапе, амплифицированный ген *FlicC* клонировали с помощью коммерческого набора InsT/Aclone PCR Product Cloning Kit (Fermentas). В результате ген *FlicC* был встроен в плазмиду pTZ57R. После анализа результатов секвенирования отобрали рекомбинантную конструкцию pTZ57R-FlicC, несущую искомую последовательность клонированного гена, не содержащую мутаций, которые могут возникать при ПЦР с ТАQ-полимеразой. Далее клонированный ген *FlicC* встроили по сайтам рестрикции *Bam*HI и *Hind*III в плазмиду pQE-30, предназначенную для регулируемой экспрессии в клетках штамма *Escherichia coli* M15. В результате получили рекомбинантную конструкцию pQE-30-FlicC. Синтез рекомбинантного белка происходил при культивировании клеток *E. coli* M15, трансформированных конструкцией pQE-30-FlicC. Для индукции экспрессии добавляли изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид.

В результате электрофоретического анализа белковых продуктов, полученных после культивирования с экспрессией, в полиакриламидном геле по методу Лэммли идентифицировали рекомбинантный белок с размером около 40 кДа, что соответствовало расчетным данным (40,7 кДа). Синтезированный рекомбинантный белок образовывал тельца-включения, которые после их выделения использовали для аффинной хроматографической очистки целевого рекомбинантного продукта в денатурирующих условиях в колонке с Ni-сефарозой.

Полученный рекомбинантный флагеллин-С будет использован для дальнейшего иммунобиологического тестирования.

УДК 546.22/24; 57.083.13

**БИОЦИДНЫЕ СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ СУЛЬФИДА КАДМИЯ, ПОЛУЧЕННЫХ
МИКРОБНЫМ СИНТЕЗОМ****О.А. Журавлева^{1,2}, В.С. Кулигин^{1,2}, Т.А. Воейкова^{1,2}, В.Г. Дебабов^{1,2}**¹ НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия² НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, Москва, Россия

Широкое использование антибиотиков привело к появлению мультирезистентных штаммов микроорганизмов, устойчивых ко многим лекарственным препаратам, что представляет опасность для здоровья человека и требует разработки новых высокоэффективных антибактериальных средств защиты. Доказанная способность наночастиц сульфида кадмия (NPsCdS) подавлять рост большого спектра бактерий представляет практический интерес для получения нанокристаллов различными методами и создания на их основе противомикробных агентов направленного действия. Существенное развитие получили исследования микробного синтеза NPsCdS с применением различных видов бактериальных культур, отвечающих за восстановление и стабилизацию наночастиц биоконпонентами, выделяемыми бактериями в процессе формирования биогенных наноструктур [1].

С целью определения биоцидных свойств биогенных наночастиц были синтезированы NPsCdS с использованием бактерии *Bacillus subtilis* 168 и исследованы в качестве ингибиторов роста микроорганизмов различных таксономических групп – грамположительных *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* 168, *Rhodococcus rhodochrous* и грамотрицательных *Escherichia coli* K-12, *Pseudomonas putida*, *Shewanella oneidensis* MR-1.

По разработанной и оптимизированной нами методике [2] были получены NPsCdS/*B. subtilis* 168 сферической формы, имеющие кристаллическую структуру, и размер 5 ± 1 нм. Поверхность биогенных NPsCdS содержит слой белковых молекул, сформированный бактерией *B. subtilis* 168, и имеет отрицательный заряд; гидродинамический диаметр наночастиц варьируется от 200 до 550 нм, величина ζ -потенциала составляет от -20 до -27 мВ.

Антибактериальную активность NPsCdS/*B. subtilis* 168 оценивали методом диффузии в агар по диаметру зоны ингибирования роста исследуемых тест-культур. В толще 0,8 %-агаризованных LBA и ISP сред, содержащих соответствующие тест-штаммы, делали лунки диаметром 8 мм и вносили по 50 мкл водной суспензии NPsCdS (3 мг/мл) и стерильной деионизированной воды в качестве контроля (50 мкл). Чашки Петри с тест-культурами и наночастицами инкубировали при оптимальной температуре жизнедеятельности бактерий (28–37 °C) в течение 24–48 ч.

Была выявлена высокая биоцидная активность NPsCdS/*B. subtilis* 168 в отношении всех заявленных грам (+) бактерий: *B. licheniformis* (28 мм), *B. subtilis* 168 (18 мм), *R. rhodochrous* (16 мм), тогда как среди грам (–) тест-культур восприимчивость к NPsCdS проявил только штамм *P. putida* (16 мм). Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о возможности применения NPsCdS, синтезированных биологическим методом, в качестве антибактериальных агентов нового типа.

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19–04–00088. Бактериальные штаммы предоставлены НБЦ ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.

Литература

Grasso G., Zane D. et al. Microbial Nanotechnology: Challenges and Prospects for Green Biocatalytic Synthesis of Nanoscale Materials for Sensoristic and Biomedical Applications // *Nanomaterials*. 2020. 10(1). P. 1–20. DOI 10.3390/nano10010011

Воейкова Т.А., Кожухова Е.И. и др. Микробный синтез наночастиц сульфида кадмия. Влияние бактерий различных видов на характеристики биогенных наночастиц // *Российские нанотехнологии*. 2020. Т. 15. № 2. С. 194–204. DOI 10.1134/S199272232002020X

ЗАЩИТНЫЕ СВОЙСТВА ГИБРИДНЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ OPRF-АТОХ И OPRF-АТОХ-OPRI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДОЗ ВВЕДЕНИЯ И СООТНОШЕНИЯ С АДЬЮВАНТОМ

Н.А. Михайлова, А.А. Калошин, Е.М. Ганковская

ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

В ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова проводятся исследования с целью создания рекомбинантных вакцин для иммунопрофилактики острых и хронических инфекционных заболеваний человека, вызываемых условно-патогенным микроорганизмом *Pseudomonas aeruginosa*. В результате были разработаны эффективные рекомбинантные препараты, в частности: комплекс рекомбинантного белка F наружной мембраны (OprF) и делеционной атоксической рекомбинантной формы экзотоксина А (aTox), а также гибридные рекомбинантные белки OprF-aTox и OprF-aTox-OprI. Первый гибридный белок состоял из слитых последовательностей OprF и aTox, а второй включал еще последовательность рекомбинантного белка I наружной мембраны (OprI). Известно, что рекомбинантные антигены обладают слабо выраженными иммуногенными свойствами. Поэтому для усиления их защитных свойств используют различные адъюванты, в частности, гель гидроокиси алюминия, который является сорбентом и обеспечивает продолжительность презентации антигенов для клеток иммунной системы.

При исследовании протективных свойств испытаны разные дозы введения (25, 50 и 100 мкг) рекомбинантных белковых препаратов, сорбированных на геле гидроокиси алюминия в соотношениях 1:1, 1:2 и 1:3. При схеме двукратной внутрибрюшинной иммунизации мышей наиболее эффективным оказалось использование дозы 50 мкг рекомбинантного белка, сорбированного на геле гидроокиси алюминия в соотношении 1:1. Эффективность оптимального соотношения рекомбинантных белков и гидроокиси алюминия подтверждена исследованиями по оценке уровня экспрессии генов ключевых факторов развития врожденного иммунного ответа – TLR4, mBD2, NLRC4, ASC и CASP1. На 2-е сутки после заражения наблюдали существенное увеличение их экспрессии макрофагами мышей, иммунизированных гибридным рекомбинантным белком OprF-aTox-OprI. При этом происходило достоверное увеличение экспрессии TLR4, mBD2, ASC и CASP1 у мышей, иммунизированных рекомбинантным белком, сорбированным на геле гидроокиси алюминия в соотношении 1:1, в сравнении с вариантом при сорбции с соотношением белка и адъюванта 1:2.

В результате проведенных исследований определена наиболее эффективная иммунизирующая доза для рекомбинантных гибридных белков OprF-aTox и OprF-aTox-OprI и оптимальное их соотношение с адъювантом, подтвержденное изучением экспрессии генов ключевых факторов развития врожденного иммунного ответа.

УДК 582.594+606

БИОТЕХНОЛОГИЯ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ *LUDISIA DISCOLOR* (KER GAWL.) A. RICH

**В.В. Назаров¹, Е.Ю. Семёнова¹, В.О. Климентова¹, Л.А. Хасанова², Р.З. Нуриманов³,
З.М. Хасанова²**

¹ Крымский федеральный государственный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Россия

² Академия наук Республики Башкортостан, Уфа, Россия

³ Башкирский государственный педагогический университет имени М. Акмуллы, Уфа, Россия

Наземное орхидное *Ludisia discolor* (Ker Gawl.) A. Rich., как и подавляющее большинство других представителей этого семейства, находится под угрозой исчезновения в тропических лесах Юго-Восточной Азии и Индонезии. Одновременно две причины способствуют уничтожению природных популяций. Уникальные особенности окраски, текстуры и неповторимой мозаичности рисунка листьев у *L. discolor* делают эти растения из категории так называемых «драгоценных орхидей» самыми популярными среди коллекционеров. Помимо этого, *L. discolor* интенсивно собирают на родине в качестве ценного лекарственного сырья для традиционной медицины [1].

Ситуацию может улучшить только разработка эффективной методики массового размножения *Ludisia discolor* при помощи современной технологии клонального микроразмножения *in vitro*. Она поможет сделать сбор этих орхидных из природных популяций нерентабельным и сохранить все разнообразие их генофонда. В этой связи исследовались технологии культивирования трех вариаций *L. discolor* в условиях *in vitro* (рис. 1).

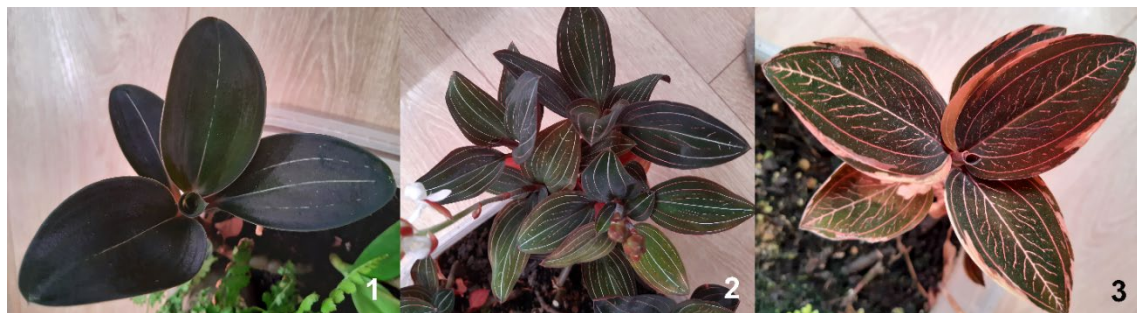


Рис. 1. Изменчивость изученных форм Лудисии двуцветной по окраске, текстуре и мозаичности рисунка листьев: 1 – *Ludisia discolor* var. *nigrescens*, 2 – *Ludisia discolor* var. *dawsoniana*, 3 – *Ludisia discolor* var. *dawsoniana* f. *variegata*.

В течение двух лет проводили эксперименты по введению в культуру *in vitro* трех вариаций *Ludisia discolor* при помощи различных эксплантов: выводковых почек, апикальных побеговых меристем и семян. В качестве среды использовали половинное количество компонентов среды Мурасиге и Скуга с концентрацией сахарозы 15 г./л и различным сочетанием фитогормонов [2]. В результате сравнительных исследований было установлено, что традиционные методы введения в культуру *in vitro* этого орхидного при помощи выводковых почек и апикальных меристем были значительно менее эффективны для массового размножения, чем при помощи семян. В частности, подтверждены ранее полученные данные о том, что индукция развития выводковых почек у *L. discolor* в условиях *in vitro* протекает не всегда успешно и зависит от оптимальной концентрации фитогормонов в питательной среде [3]. Введение в культуру *in vitro* выводковых почек, которые располагаются у *L. discolor* обычно под поверхностью субстрата, часто сопровождалось развитием грибной и бактериальной посторонней микрофлоры несмотря на жесткую обработку эксплантов различными стерилизантами (например, 15 % раствором гипохлорита натрия и перекиси водорода). Использование апикальных побеговых меристем в качестве эксплантов позволяло не только значительно уменьшить вероятность контаминации культуры, но и приводило к длительной стагнации в развитии целого вегетативного побега (включая боковые выводковые почки), с которого срезался эксплант.

Для получения семян мы проводили гейтеногамное опыление между цветками в пределах одного соцветия. Полное созревание плодов у всех изученных вариаций *Ludisia discolor* в условиях оранжереи наступало примерно одновременно – на 30–35 день. Зрелые семена *L. discolor* имели микроскопические размеры.

Поэтому для их посева на питательную среду использовалась специально разработанная технология стерилизации и посадки. В ее основе лежал способ, который был разработан Е.В. Андроновой для стерилизации зрелых микроскопических семян орхидных химическим раствором при помощи шприца и специальной улавливающей мелкой металлической сетки (персональное сообщение). Мы не использовали металлическую сетку для улавливания семян. Семена *L. discolor* помещались в фильтр-пакеты (бумажные пакетики из кофейного фильтра). Пакетики предварительно формовались внутри пустого шприца того же диаметра. Это обеспечивало плотное прилегание пакетика к стенкам шприца при стерилизации. Внутри такого пакетика засыпалась порция сухих зрелых семян и они накрывались круглым бумажным кружком с номером. Диаметр кружка был чуть меньше диаметра поршня шприца. Плотное прилегание и наличие бумажного кружка по размеру поршня способствовали хорошему перемешиванию содержимого пакетика со стерилизующей жидкостью при движении поршня. Готовый пакетик завязывался белыми нитками и помещался в шприц. На дно шприца предварительно укладывался небольшой пластиковый цилиндр, сделанный из колпачка от шприца. Он препятствовал закупорке выпускного отверстия шприца пакетиком при резком выдавливании стерилизующей жидкости.

В качестве стерилизанта использовалась смесь дистиллированной воды и 10 % раствора гипохлорита натрия в пропорции 1:1. Стерилизация продолжалась 20 минут. При этом каждые 5 минут проводилась интенсивная прокачка шприца стерилизантом в течение 1 минуты. В результате такой стерилизации окраска у интины семян полностью исчезала. Процедура отмывки семян от стерилизанта проходила аналогичным образом в дистиллированной воде 2 раза по 10 минут. Затем пакетик со стерильными семенами помещался в стерильную сухую чашку Петри.

Стерильными ножницами у пакетика отрезали хвостовую часть вместе с нитками, а его головная часть полностью разворачивалась и переносилась в чашку Петри с питательной средой. Применялось несколько методик перенесения семян с поверхности пакетика на поверхность среды: развернутый пакетик переворачивали семенами к среде и оставляли на ней; развернутый пакетик поочередно приклеивался семенами к разным участкам среды; развернутый пакетик прикладывали семенами к среде и осторожно перемещали волоком по поверхности среды до полной адгезии к ней всех семян из пакетика.

Посадка *Ludisia discolor* зрелыми семенами из уже раскрывшихся коробочек оказалась технически трудоемкой операцией. Поэтому мы испытали технологию посадки этого орхидного на стерильную питательную среду при помощи незрелых семян из еще нераскрывшихся коробочек. Стерилизация коробочек и способ посадки незрелых семян на питательную среду проводили согласно методике Р.И. Kauth et al. [4].

На первом этапе от *Ludisia discolor* var. *dawsoniana* были взяты разновозрастные коробочки, чтобы определить оптимальную для посадки стадию в развитии семян. В этих исследованиях использовались 15, 20 и 25-дневные коробочки с момента стартового опыления. Все коробочки высаживали на среду из одной колбы. Чашки Петри с высаженными семенами содержали первые 60 дней в темном термостате при 18–20° С. Наилучшую всхожесть показали семена из 25-дневных коробочек (рис. 2.1). Вначале зародыши семян набухали и приобретали бело-молочную окраску. Примерно через месяц после посадки протокормы массово разрывали семенную оболочку у семян и в базальной части у них образовывались первые корневые волоски (рис. 2.2). Через 2 месяца у протокормов образовывался апикальный валик будущего первого листа. Базальная часть к этому времени была уже покрыта несколькими рядами корневых волосков (рис. 2.3).

По истечении 60-и дней с момента посадки протокормы переносились в климатическую камеру с 8-часовым периодом освещения и температурой 25° С. Спустя 5 дней наблюдалось массовое позеленение протокормов (рис. 3.1). Еще через 5 дней из апикального валика начинала формироваться листовая пластинка первого листа (рис. 3.2). Примерно через месяц содержания посевов на свету у проростков наблюдалось развитие 2–3 стеблевых метамеров с корневыми волосками (рис. 3.3).

Семена из 20-дневных коробочек прорастали значительно хуже. В темновом термостате на 20-й день после посева только около 20 % из высеванных семян набухли или образовали протокормы. По размеру протокормы были мельче протокормов от 25-дневных семян. Относительная задержка в развитии сеянцев сохранялась и при содержании в климатической камере. Семена от 15-дневных коробочек не проявили признаков прорастания за весь период наблюдений в темновом термостате и климатической камере.

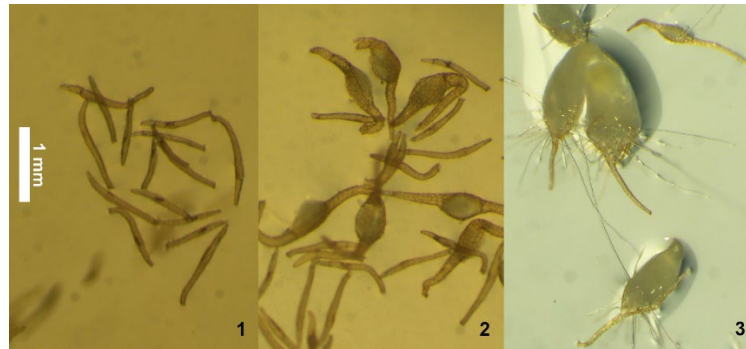


Рис. 2. Прорастание семян и гемморизогенез протокормов у *Ludisia discolor* var. *dawsoniana* в темновой фазе: 1 – незрелые 25-дневные семена после высадки на питательную среду; 2 – массовое прорастание семян и выход протокормов из тесты, 40 дней; 3 – базальная часть протокормов покрыта несколькими рядами корневых волосков, в апикальной части закладывается валик будущего первого листа, 60 дней. Количество дней указано с момента посадки семян на питательную среду.

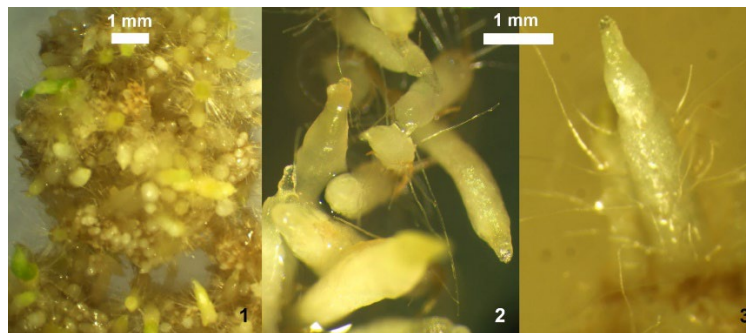


Рис. 3. Гемморизогенез у проростков *Ludisia discolor* var. *dawsoniana* в климатической камере при 8-часовом периоде освещения: 1 – позеленение протокормов и проростков, 65 дней; 2 – начало формирования листовой пластинки, 70 дней; 3 – метамеризация побега у проростков, 90 дней. Количество дней указано с момента посадки семян на питательную среду.

У остальных изученных вариаций *Ludisia* на посадку брались семена только от 25-дневных коробочек. Прорастание семян в темновой фазе и гемморизогенез в климатической камере происходили у них аналогично первой вариации.

В результате этих исследований установлена оптимальная стадия в развитии незрелых семян для посадки их на стерильную среду в условиях *in vitro*. Семена из 25-дневных коробочек показали массовую всхожесть у всех трех изученных вариаций.

Возможно, что семена из 27–29-дневных коробочек имеют еще более высокую всхожесть и лучшее развитие у протокормов, но на этой стадии развития створки коробочек соединены уже между собой слабо, и поэтому в них может попадать стерилизующая жидкость во время обработки перед эксплантацией на среду. Таким образом, успех методики посадки незрелыми семенами зависит от точной даты созревания коробочки, которая известна только при выполнении стартового опыления. При использовании коробочек, полученных в результате естественного опыления, необходимо проводить дополнительное исследование стадии развития семян в общем урожае, используя модельные коробочки с каждого отдельного соцветия. Если это невозможно, то лучше использовать для стерилизации полностью созревшие семена и технологию посева с применением фильтр-пакетов.

Литература

1. Ranjetta, P. Autofluorescence study and selected cyanidin quantification in the Jewel orchids *Anoetochilus* sp. and *Ludisia discolor* / P. Ranjetta, Z. Rahmad, M. Vikneswaran, S. Sreeramanan // PLoS One. – 2018. – Vol. 13, – P. 1–19.
2. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol Plant. – 1962. – Vol. 15, № 3. – P. 473–497.
3. Ying L. Effects of different factors on adventitious bud induction from stem explants of *Ludisia discolor* / L. Ying, L. Xiaohao, Ch. Jingye, X. Yingbin and Yinling Z. // E3S Web of Conferences. – 2021. – Vol 245, N. 03024. – P. 1–4.
4. Kauth P.J. A classroom exercise in hand pollination and in vitro asymbiotic orchid seed germination / P.J. Kauth, T.R. Johnson, S.L. Stewart // Plant Cell Tissue and Organ Culture. – 2008. – Vol. 93, N. 2. – P. 223–230.

ДОЗАЗАВИСИМЫЕ ЭФФЕКТЫ ДИХЛОРДИФЕНИЛТРИХЛОРЭТАНА НА ЭКСПРЕССИЮ ЙОДНЫХ КАНАЛОВ В КЛЕТКАХ

С.С. Обернихин, Н.В. Яглова, С.В. Назимова, В.В. Яглов

НИИ морфологии человека, Москва, Россия

Формирование и функционирование каналов, транспортирующих йодиды в клетки, является основой нормальной деятельности щитовидной железы и синтеза ее гормонов. В настоящее время происходит неуклонный рост числа тиреоидных заболеваний, что, по мнению ведущих специалистов, связано с воздействием эндокринных дисрапторов [5, 7]. Эндокринные дисрапторы – вещества антропогенного происхождения, оказывающие гормоноподобное действие или нарушающие синтез гормонов и их взаимодействие с рецепторами. Одним из наиболее распространенных дисрапторов на планете является дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ) [5]. Особенности развития щитовидной железы в условиях непрерывного воздействия различных нетоксических доз эндокринных дисрапторов мало изучены. Немаловажным аспектом проблемы является влияние эндокринных дисрапторов на йодаккумулирующую функцию щитовидной железы. Деятельность щитовидной железы реализуется посредством ионных каналов, в частности, работой натрий-йодного симпортера (НИС), гликопротеина, встроенного в мембрану тироцита, который и обеспечивает йодаккумулирующую функцию [3, 4]. По имеющимся данным, низкодозовое воздействие ДДТ, которому подвергается все население планеты, способен оказывать дисрапторное действие на щитовидную железу, а механизмы такого влияния требуют более тщательного изучения [1, 2, 6].

Цель настоящей работы – исследовать влияние различных доз и сроков воздействия эндокринного дисраптора ДДТ на продукцию НИС крыс.

Материалы и методы. Исследования выполнены на самцах крыс Вистар. Две экспериментальные группы (n=40) составили животные, которые потребляли вместо питьевой воды раствор о, п-ДДТ (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 20 мгк/л и 80 мгк/л. Таким образом, среднесуточное потребление ДДТ составило $1,87 \pm 0,86$ мгк/кг и $7,77 \pm 0,17$ мгк/кг, соответственно. Контрольной группой (n=20) служили животные потреблявшие водопроводную воду. Животных выводили из эксперимента через 6 и 10 нед. от начала воздействия ДДТ. Эксперимент выполнен с разрешения этической комиссии НИИ морфологии человека с соблюдением норм действующего законодательства.

Концентрацию НИС в сыворотке определяли методом иммуноферментного анализа с использованием набора реактивов (Cusabio, Китай). Доли щитовидной железы фиксировали в растворе Буэна, после стандартной гистологической проводки получали парафиновые срезы и окрашивали гематоксилином и эозином, проводили ШИК-реакцию. Диаметр фолликулов устанавливали при помощи компьютерной морфометрии с использованием программы ImageScope (Leica Microsystems, Германия).

Статистическую обработку проводили с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 7.0 ("Statsoft Inc.", США). Сравнение независимых групп по количественному признаку проводили с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Через 6 недель в обеих группах крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ наблюдалось значительное снижение концентрации НИС в сыворотке по сравнению с контролем, причем у крыс потреблявших ДДТ в дозе $1,87 \pm 0,86$ мгк/кг/сут это снижение было более выраженным, чем у крыс второй опытной группы, потреблявшей ДДТ в дозе $7,77 \pm 0,17$ мгк/кг /сут (рис. 1).

Через 10 недель потребления ДДТ у крыс первой опытной группы концентрация НИС возросла и превысила значения в контрольной группе. У крыс второй опытной группы, потреблявших ДДТ в более высокой концентрации, продукция НИС увеличилась по сравнению с предыдущим сроком исследования, но не превысила контрольных значений и была ниже значений группы, потреблявшей меньшую дозу ДДТ (рис. 1).

При гистологическом исследовании щитовидной железы крыс через 6 недель потребления раствора ДДТ выявлено увеличение размеров фолликулов, а через 10 недель выявлены структурные изменения, заключающиеся в уменьшении размеров фолликулов щитовидной железы в обеих экспериментальных группах, появлении множественных микрофолликулов (рис. 2).

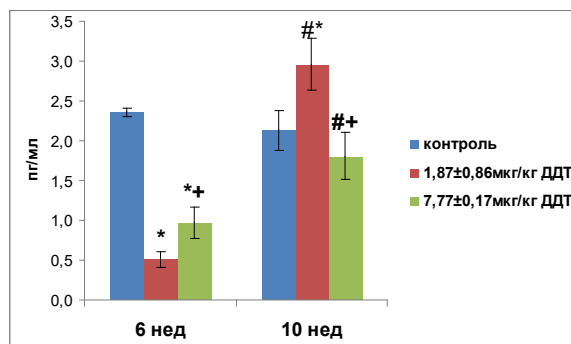


Рис. 1. Изменение концентрации НИС в сыворотке крови крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ (M±SD).

Примечания. $p < 0,05$ при сравнении с контролем (*), предыдущим сроком исследования (#) и с группой, получавшей меньшую дозу ДДТ (+).

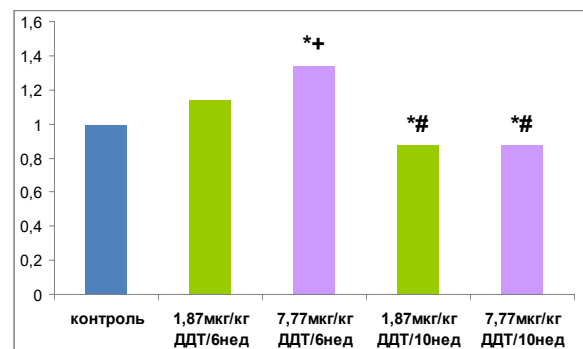


Рис. 2. Относительные изменения размеров фолликулов щитовидной железы крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ.

Примечания. Значения контрольных групп для 6 и 10-недельного сроков приняты за единицу; $p < 0,05$ при сравнении с контролем (*), предыдущим сроком исследования (#) и с группой, получавшей меньшую дозу ДДТ (+).

Обсуждение

Результаты исследования показывают, что воздействие низких доз ДДТ подавляет продукцию НИС. Через 6 недель степень снижения концентрации НИС в сыворотке крови не демонстрировала зависимости от потреблённой дозы, хотя структурные изменения свидетельствовали о дозозависимом снижении активности секреторных процессов. Через 10 недель у крыс, подвергшихся воздействию эндокринного дисраптора, в более низких дозах происходило компенсаторное увеличение НИС, что связано с уменьшением размеров фолликулов щитовидной железы, то есть увеличением числа клеток-продуцентов, что указывает на необратимость ингибирующего действия дисраптора. Однако при потреблении ДДТ в более высоких концентрациях данного компенсаторного механизма оказалось недостаточно, что подтверждает выраженное дозозависимое действие эндокринного дисраптора на мембранные ионные каналы.

Выводы

Эндокринный дисраптор ДДТ ингибирует продукцию натрий-йодного симпортера и демонстрирует дозозависимый эффект на его экспрессию. Увеличение экспрессии йодных каналов достигается за счёт пролиферации клеток-продуцентов, что указывает на невозможность активации экспрессии НИС в клетках, находящихся под воздействием ДДТ.

Литература

- Яглова Н.В., Яглов В.В. Изменения тиреоидного статуса крыс при длительном воздействии низких доз дихлордифенилтрихлорэтана. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2013. Т.156. № 12. С. 720–722.
- Яглова Н.В. Нарушения секреторного цикла фолликулярных тироцитов и их коррекция тиреотропным гормоном при экспериментальном синдроме нетиреоидных заболеваний. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2011. Т.152. № 8. С. 215–219.
- Carrasco N. Iodide transport in the thyroid gland. Biochim. Biophys. Acta Rev. Biomembr. 1993. Vol. 1154. P. 65–82. DOI: 10.1016/0304-4157(93)90017-I
- Darrouzet E., Lindenthal S., Marcellin D., Pellequer J.L., Pourcher T. The sodium/iodide symporter: state of the art of its molecular characterization. Biochim. Biophys. Acta. 2014. Vol. 1838. P. 244–253. DOI: 10.1016/j.bbame.2013.08.013
- Leemans M., Couderq S., Demeneix B., Fini J. – B. Pesticides With Potential Thyroid Hormone-Disrupting Effects: A Review of Recent Data. Front. Endocrinol. 2019. Vol. 10. Art. 743. DOI: 10.3389/fendo.2019.00743
- Liu C., Shi Y., Li H., Wang Y., Yang K. p, p'-DDE disturbs the homeostasis of thyroid hormones via thyroid hormone receptors, transthyretin, and hepatic enzymes. Horm Metab Res. 2011. Vol. 43. P. 391–396. DOI: 10.1055/s-0031-1277135
- Zoeller R.T., et al.. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: A statement of principles from The Endocrine Society. Endocrinology. 2012. Vol. 153. No. 9. P. 4097–4110. DOI: 10.1210/en.2012-1422

ПОЛУЧЕНИЕ ЛИНИЙ ГРИБА *CLAVICEPS PURPUREA* (FRIES) TULASNE СО СПОСОБНОСТЬЮ К БИОСИНТЕЗУ ЭРГОТАМИНА В САПРОФИТНОЙ КУЛЬТУРЕ МЕТОДОМ УФ-МУТАГЕНЕЗА

П.С. Савин ¹, Р.И. Бобылева ²

ФГБНУ ВИЛАР, Москва, Россия

Эрготамин – принадлежит к эргопептиновой группе эргоалкалоидов (ЭА), производным лизергиновой кислоты (рисунок).

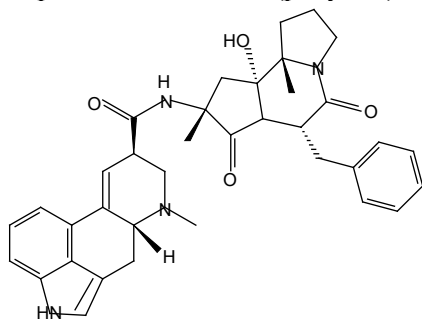


Рисунок. Структурная формула эрготамина

Эрготамин обладает альфа-адреноблоктрующим действием и используется в качестве фармацевтической субстанции для создания лекарственных средств (Эрготал, Эргометрина малеат, Эрготамин тартрат, Эрготамин гидротартрат, Беллатаминал, Кофетамин и др.) для медицинской практики.

Лекарственным сырьем для получения эрготамин являются склероции штамма *Claviceps purpurea* (Fries) Tulasne BKM-F-2641D, получаемые в паразитарной культуре.

В настоящее время получение ЭА в сапрофитной культуре как более перспективной, является актуальной задачей позволяющей создать экологически чистое безотходное производство, получать стандартное сырье независимо от времени года, снизить производственные затраты и так далее. Поэтому культивирование сапрофитных штаммов гриба спорыньи в погруженной культуре на питательных средах, содержащих в своем составе необходимые для их биогенеза компоненты питательных сред, выходят на первый план.

Целью настоящей работы является получение линий гриба *Claviceps purpurea* (Fries) Tulasne с помощью ступенчатого УФ-мутагенеза с последующей селекцией изолятов способных синтезировать эрготамин в сапрофитной культуре.

Объектом исследования служил мицелий гриба *Claviceps purpurea* (Fries) Tulasne, полученный из склероциев промышленного селекционного штамма BKM-F – 2641D, находящегося в коллекции ФГБНУ ВИЛАР.

В качестве мутагенного фактора использовали УФ облучение, которое проводили с использованием лампы БУВ 15 с длиной волны 254 нм. Мутагенез проводили путем обработки конидий.

Тестирование отобранных изолятов, на способность к биосинтезу ЭА, осуществляли в условиях глубинного культивирования по схеме: изолят на среде T2 > культура в среде Tg > культура в среде T 25.

Результаты и их обсуждение. Установили, что при воздействии на конидии гриба спорыньи в течение 10 минут, наблюдали самую высокую морфологическую изменчивость (20 %), выживаемость у данного варианта составила 0,1 %.

Было отобрано и протестировано 50 моноспоровых колоний, морфологически отличных от колоний, получаемых без воздействия УФ-лучей, из которых одна линия (07-Т) синтезировала сумму производных индола в воздушно-сухом мицелии от 0,20 % до 0,26 % по массе при определении по модифицированному методу Румпеля.

Анализ ТСХ показал, что на хроматограмме присутствовали пятна, соответствующие по Rf и флуоресценции стандарту эрготамин, эрготаминина и алкалоидов эргоксиновой группы.

УФ-спектр экстрактивного извлечения из мицелия сапрофитной линии имел максимум поглощения при $\lambda=313\pm 2$ нм и минимум около $\lambda=280\pm 4$ нм, что соответствует минимумам и максимумам поглощения, характерным для лизергиновой кислоты и ее производных – пептидных ЭА.

Таким образом, в результате мутагенеза индуцированного УФ-лучами с длиной волны 254 нм, получена линия *C. purpurea* 07-Т, обладающая способностью синтезировать эрготамин в погруженной культуре.

Секция 3. Экология, биоэнергетика и биогeотeхнология

СОВРЕМЕННЫЕ СТРАТЕГИИ РАЗРАБОТКИ БИОЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ СИСТЕМ

О.Н. Понаморева, В.А. Алферов

Тульский государственный университет, Тула, Россия

Биоэлектрохимическими системами (bioelectrochemical systems, BESs, БЭС) принято называть биоэлектрохимические устройства или технологии, в которых поток электронов в системе генерируется в результате биохимических реакций микроорганизмов, и используются для биотехнологических приложений, включая производство электроэнергии в микробных топливных элементах (microbial fuel cell, MFC, МТЭ) или ценных продуктов в микробных электролизных элементах (microbial electrolytic cell, MEC) [1]. Однако, в общем смысле, к биоэлектрохимическим системам можно отнести также биотопливные элементы (biofuel cell, BFC, БТЭ) на основе ферментов [2], так как принцип их функционирования основан на прямом или опосредованном переносе электронов между биологическим объектом и электродом. Электрохимические и микробные биосенсоры, в которых регистрируется генерируемый при участии биологического материала электрический ток, тоже можно отнести к БЭС. Несмотря на многочисленные исследования последних лет, которые фокусируются на разработке и характеристике биоэлектрохимических систем (согласно информации Web of Science, за последние 5 лет представлено около 2400 публикаций с термином «bioelectrochemical systems», из них 137 обзоров, что сопоставимо с числом публикаций по МТЭ и в два раза больше, чем публикаций с результатами исследований ферментных БТЭ), широкому практическому применению этих систем препятствует целый ряд нерешенных проблем фундаментального характера, связанных с эффективностью их функционирования, стабильностью, технологичностью. Кроме того, конструкция и принципы эксплуатации БЭС сложны и интересны с научной точки зрения, поэтому результаты исследований таких систем могут стать отправной точкой для новых идей будущего в области разработки природоподобных технологий. По каждому из направлений исследований в этой области существуют оригинальные инновационные решения. В этом небольшом обзоре авторы хотели бы остановиться только на некоторых из них, касающихся интересов научного коллектива и их ближайших коллег.

Ферментные биотопливные элементы и биосенсоры. Одним из критических условий успешного функционирования ферментных биосенсоров и БТЭ является эффективность переноса электронов между ферментом и поверхностью электрода. Для улучшения характеристик биоэлектрохимических устройств на основе ферментов (чувствительности биосенсоров или выходной мощности БТЭ) разрабатываются три наиболее важных стратегии: применение методов белковой инженерии для направленной модификации ферментов, получение полимеров с особыми свойствами (дизайнерских полимеров) для иммобилизации ферментов и применение наноматериалов [3]. Направленное конструирование ферментов позволяет настроить их стабильность, активность и специфичность. Если прямой перенос электронов от фермента на электрод неблагоприятен, в систему можно ввести полимеры, которые опосредуют перенос электронов на поверхность электрода или от нее. Наконец, встраивание наночастиц в материал электрода или на его поверхности обеспечивает формирование каркасов для иммобилизации биокаталитических элементов или направленной ориентации активных центров белков посредством адсорбции или химической реакции с функциональными группами. В научном коллективе авторов доклада разрабатываются некоторые методические подходы по всем трем вышеперечисленным направлениям. В дополнение к этим стратегиям следует отметить такие важные инновационные разработки, как биосенсоры с автономным питанием и самозарядные биосуперконденсаторы, на что необходимо обратить внимание в будущем.

При разработке миниатюрных БТЭ безмедиаторного типа на биоанодах предложено использовать пирролохинолинхинон (PQQ) – зависимые ферменты, прежде всего глюкозодегидрогеназу [4]. В БТЭ, работающих на метаноле, применили ферментативный каскад, включающий НАД-зависимую метанолдегидрогеназу (МДГ) [5]. Кофактор дегидрогеназ PQQ, в отличие от НАД⁺, прочно связан с активным центром фермента, поэтому PQQ-МДГ является перспективным ферментом для разработки метанольных биосенсоров и биоанодов. Продуцентами нативного фермента [6] и рекомбинантного фермента, полученного методом гомогенной экспрессии (данные не опубликованы), являются метилотрофные бактерии.

Для ориентированной адсорбции PQQ-МДГ использовали гидроксиапатит, способный к образованию координационной связи с коферментом [7]. В обоих случаях наблюдался опосредованный медиаторами эффективный перенос электронов. При получении рекомбинантного белка экспрессировали только одну субъединицу, но получили функционально активную МДГ, содержащую полигистидиновую метку (His)₆ для быстрого выделения целевого белка. Результаты этих исследований представлены на конференции (Карасевой Т.А., ТулГУ.).

В катодном отделении БТЭ кислород – наиболее распространенный и легко доступный акцептор электронов. Однако высокое перенапряжение реакции электрохимического восстановления кислорода затрудняет использование таких катодов в БТЭ. При разработке миниатюрных БТЭ безмедиаторного типа на биокатодах предложено использовать лакказы. Лакказа – фермент, способный восстанавливать кислород до воды с использованием как органических восстановителей, так и за счет прямого переноса электронов от электрода. Различные типы лакказ могут быть использованы в БТЭ, однако нам не удалось найти прямых рекомендаций о применении какого-то определенного типа лакказ в биокатодах, хотя при выборе некоторые характеристики этих ферментов следует учитывать, например потенциал Т1-центра [8]. В сотрудничестве с коллегами Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина проводятся исследования по применению различных лакказ в биокатализе и биоэлектрохимических системах: грибных лакказ [9], которые традиционно используются в БТЭ, и термостабильных бактериальных лакказ с направленной мутацией по активному центру фермента [10]; разрабатываются биосенсоры и биокатоды на их основе. Некоторые недавно полученные результаты представлены на конференции (Алферов С.В., ТулГУ.).

Прогресс в создании нано/био интерфейсов с переносом заряда достигнут путем применения углеродных наноматериалов, в том числе углеродных нанотрубок (одностенных и многостенных, немодифицированных и карбоксилированных), для сопряжения с электродом ферментов (глюкозооксидазы [11–12], алкогольоксидазы и лактатоксидазы [13]) и ферментных систем (мембранных фракций уксуснокислых бактерий [14]), как и 2D углеродных материалов (например, терморасширенного графита и графена [15]) и полиароматических углеводородов (например, коронена (рис. 1), последние могут взаимодействовать с активными центрами лакказ как аналоги субстратов.

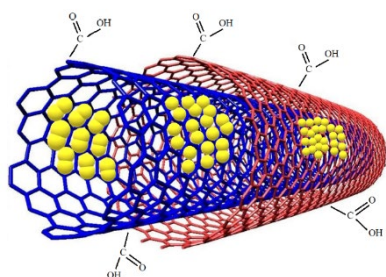


Рисунок 1. Схематическое взаимодействие карбоксилированных многостенных нанотрубок и коронена

Хотя прямой перенос электронов при участии наноматериалов осуществим для многих ферментов, в некоторых случаях он неэффективен. Если расстояние между каталитическим центром и электродом слишком велико, становится трудно установить быстрый прямой перенос электронов. Один из способов преодолеть такое большое расстояние туннелирования электронов – использовать окислительно-восстановительные медиаторы, которые перемещают электроны от окислительно-восстановительного центра фермента к поверхности электрода (медиаторный электронный транспорт, МЭТ). После иммобилизации фермента на поверхности электрода в раствор электролита можно добавлять свободно диффундирующие окислительно-восстановительные медиаторы. Однако этот подход непрактичен, поскольку он загрязняет систему медиатором. Более эффективная стратегия – интегрировать окислительно-восстановительный медиатор в макромолекулу, обычно в

полимер. Редокс-соединения связаны с полимерной структурой как часть ее основной цепи или встроены в нее как дополнительные компоненты. Кроме того, в конструкции биоэлектродов можно использовать несколько классов полимеров, включая окислительно-восстановительные полимеры, собственно проводящие полимеры, непроводящие полимеры с добавлением медиаторов и наноматериалов. При разработке биоанодов и биосенсоров на основе ферментов, целых клеток микроорганизмов и субклеточных структур для одновременной иммобилизации биоматериала и организации пути переноса электронов использовали гидрогели различной природы и состава. Иммобилизация в высокопроводящий полимер поли (3,4 – этилендиокситиофен (ПЭДОТ, PEDOT) мембранных фракций уксуснокислых бактерий, для которых характерна мембранная локализация многих дегидрогеназ, позволила осуществить прямое биоэлектрокаталитическое окисление глюкозы в исследуемой системе [16].

Редокс-активные полимеры на основе хитозана и бычьего сывороточного альбумина (БСА) были синтезированы путем ковалентной модификации медиаторами ферроценом, метиленовым синим или тионином. При последующем встраивании глюкозооксидазы и углеродных нанотрубок в сетку зацепления полимерного гидрогеля регистрировали биоэлектрохимическое окисление глюкозы [11]. Эти редокс-гидрогели показали свою эффективность в сочетании с целыми клетками бактерий [17–19], что в будущем предполагает возможность разработки искусственных биопленок с переносом заряда для микробных топливных элементов. В процессе золь-гель синтеза силикагеля, который является диэлектрическим материалом, в присутствии углеродных нанотрубок и глюкозооксидазы удалось получить электропроводящий гибридный материал для создания биоэлектродов [20]. В отличие от окислительно-восстановительных полимеров, проводящие полимеры позволяют электронам проходить через основную цепь полимера. Полипиррол, полианилин (ПАНИ) и политиофен используются в биоэлектрохимии, их синтезируют путем электрополимеризации. Регулируя заряд, подаваемый в процессе полимеризации, можно регулировать толщину полимерной пленки. Кроме того, проводящие полимеры не только поддерживают перенос заряда, но также могут составлять иммобилизационную матрицу для захвата биоматериала на поверхности электрода. Проводящие полимеры объединяют с наночастицами и медиаторами с образованием проводящих нанокомпозитов. Результаты по этому направлению представлены на конференции (Арляпов В.А., ТулГУ). Описанные гибридные редокс-гидрогели и матрицы с электропроводящими свойствами являются перспективными материалами для разработки биоэлектрохимических систем как на основе оксидоредуктаз, так и на основе целых клеток.

Микробные электрохимические системы. В отличие от ферментных электрохимических систем, восстановительные эквиваленты микроорганизмов генерируются в результате внутриклеточного энергетического метаболизма. Поскольку клеточная мембрана изолирована, необходимым предварительным условием для протекания электрохимических реакций является то, что электроны могут беспрепятственно перемещаться через мембрану. Существует три основных механизма внеклеточного транспорта в БЭС на основе микроорганизмов [21]: электроны перемещаются по нанопроводам (проводящим пиллам), посредством особого белкового мембранного комплекса и / или опосредуются эндогенными или экзогенными электронными медиаторами (рис. 2).

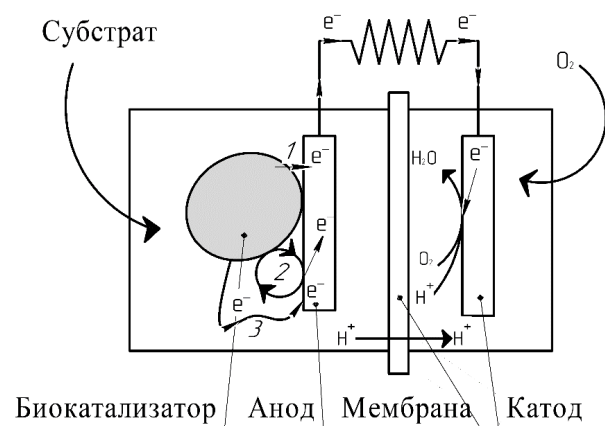


Рисунок 2. Схема работы двухкамерного микробного топливного элемента. Пути переноса электронов: 1 – прямой перенос электронов, 2 – через медиатор, 3 – по нанопроводам

Для электрохимически активных штаммов бактерий характерны разные механизмы проводимости. Так, *Shewanella* имеет полный набор внеклеточных цепей переноса электронов: белковые каналы, образованные цитохромами внешней мембраны; синтез и высвобождение рибофлавина способствует трансмембранному переносу электронов. Другие модельные бактерии, *Geobacter*, способны синтезировать проводящие пилы (нанопроволоки) и имеют цитохромы во внешней мембране. Типичный МТЭ состоит из анаэробной анодной и аэробной катодной камер, соединенных протон-проводящей мембраной. На аноде микроорганизмы окисляют органические субстраты, генерируемые восстановительные эквиваленты по одному из описанных выше механизмов окисляются на электроде, поток электронов направляется по внешней цепи на катод.

Кислород восстанавливается на катоде и связывается с протонами, которые поступают в катодное пространство через мембрану. Наличие биопленки обеспечивает прямой перенос электронов на большие расстояния, высокую каталитическую скорость и высокую выходную мощность [2].

Электрохимически неактивные бактерии не имеют полностью функциональной внеклеточной системы переноса электронов, и почти ни один из штаммов не способен секретировать природные медиаторы.

Для таких микроорганизмов необходимо присутствие искусственных акцепторов электронов. В этом направлении в нашем научном коллективе получены значительные результаты, опубликованные в высокорейтинговых изданиях и составивших основу нескольких диссертаций. Некоторые аспекты продолжающихся исследований по этому направлению изложены выше и формируют основу для дальнейшей разработки биоанодов с искусственной биопленкой микроорганизмов.

Хотя бактерии разделяют на электроактивные и неактивные, до конца граница так и не ясна. Например, после инкубации микроорганизмов в электрохимических системах потребовался пусковой период в виде постоянного напряжения на электроде, чтобы активировать процесс образования биопленки и выработки электроэнергии. В коллективе получены первые результаты таких исследований, однако для эффективного функционирования сформированной на электроде биопленки пока еще необходимо добавление медиатора.

Еще одним направлением исследований биоэлектрохимических систем является выяснение возможностей использования ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов, применяемых в биогидрометаллургии при добыче металлов из сульфидных руд, в технологии биотопливных элементов [22, 23]. Некоторые виды микроорганизмов этой группы способны при определенных условиях генерировать электроэнергию. Использование экстремофилов в микробных топливных элементах представляет особый интерес, поскольку эти микроорганизмы могут служить биоэлектрокатализаторами при экстремальных значениях pH, солености и температуры, в то время как подавляющее большинство микроорганизмов в подобных условиях работать не способно.

Для всех типов биоэлектрохимических систем эффективность преобразования энергии является ключевым фактором, определяющим производительность биоэлектрохимических систем, особенно этап преобразования энергии, перенос электронов играет важную роль на этом этапе. Понимание механизма переноса электронов в биоэлектрохимических расширит будущее применение биоэлектрохимических систем и позволит создавать эффективные природоподобные технологии.

Благодарим за интересное и плодотворное сотрудничество коллег: Решетилова А.Н. и сотрудников лаборатории биосенсоров; Трубицыну Л.И. и Трубицына И.В.; Коломыцеву М.П. и сотрудников лаборатории энзиматической деградации органических соединений (Институт биохимии и физиологии им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пуццино); Абдулатипова А.В. (Институт фундаментальных проблем биологии РАН, г. Пуццино); Стома Д.Э. и коллег из Иркутского государственного университета.

Исследования выполнены в рамках выполнения государственного задания Минобрнауки РФ (No. FEWG-2020–0008).

Литература

- Sleutels TH, Ter Heijne A, Buisman CJ, Hamelers HV. Bioelectrochemical systems: an outlook for practical applications. // ChemSusChem. 2012. V 5(6). P.1012–1020.
- Zheng, T., Li, J., Ji, Y., Zhang, W., Fang, Y., Xin, F., Dong, W., Wei, P., Ma, J. and Jiang, M. Progress and prospects of bioelectrochemical systems: Electron transfer and its applications in the microbial metabolism. // Front Bioeng Biotechnol. 2020. V. 8(10). P. 1–10.
- Pinyou, P., Blay, V., Muresan, L.M. and Noguera, T. (2019) Enzyme-modified electrodes for biosensors and biofuel cells. // Materials Horizons. 2019. V. 6(7). P. 1336–1358.
- Bollella, P., Lee, I., Blaauw, D. and Katz, E. (2020) A microelectronic sensor device powered by a small implantable biofuel cell. // Chemphyschem. 2020. V. 21(1). P.120–128.
- Wu, G., Gao, Y., Zhao, D., Ling, P. and Gao, F. Methanol/Oxygen Enzymatic Biofuel Cell Using Laccase and NAD[±]-Dependent Dehydrogenase Cascades as Biocatalysts on Carbon Nanodots Electrodes. // ACS Appl Mater Interfaces. 2017. V. 9(46). P. 40978–40986.
- Кузнецова Т.А., Бесчастный А.П., Понаморева О.Н., and Троценко Ю.А. Очистка и характеристика метанолдегидрогеназы ризосферного фитосимбионта *Methylobacterium nodulans*. // Прикладная биохимия и микробиология. 2012. Т. 48(6). С. 606–611.
- Кузнецова Т.А., Бесчастный А.П., Алфёров С.В., Троценко Ю.А. Свойства модифицированных амперометрических биосенсоров на основе метанолдегидрогеназы и клеток *Methylobacterium nodulans*. // Прикладная биохимия и микробиология. 2013. Т. 4(6). С. 613–618.
- Голикова В.И., Гордеева Т.А., Алфёров С.В. Биокатоды на основе лакказ в биотопливных элементах. Мини-обзор. // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. 2020. № 2. С. 3–11.

Shebanova, A.D., Chernykh, A.M., Baskunov, B.P., Gaidina, A.S., Myasoedova, N.M., Renfeld, Z.V., Ponamoreva, O.N. and Kolomytseva, M.P. (2021) Novel biocatalyst from *Microthielavia ovispora* VKM F-1735 for industrial dye decolorization in the absence of mediators. // *Process Biochemistry*. 2021. V. 109. P. 186–197.

Trubitsina, L.I., Abdullatypov, A.V., Larionova, A.P., Trubitsin, I.V., Alferov, S.V., Ponamoreva, O.N. and Leontievsky, A.A. Expression of thermophilic two-domain laccase from *Catenuloplanes japonicus* in *Escherichia coli* and its activity against triarylmethane and azo dyes. // *Peerj*. 2021. V. 9. P. e11646.

Арляпов В.А., Харьковская А.С., Абрамова Т.Н., Кузнецова Л.С., Илюхина А.С., Зайцев М.Г., Мачулин А.В., Решетилов А.Н. гибридный редокс-активный полимер на основе бычьего сывороточного альбумина, ферроцена, карбоксилированных углеродных нанотрубок и глюкозооксидазы. // *Журнал аналитической химии*. 2020. Т. 75(9). С. 820–833

Илюхина А.С., Харьковская А.С., Арляпов В.А. Использование углеродных нанотрубок как основы ферментного биосенсора для определения глюкозы. // *Известия Тульского государственного университета. Естественные науки*. 2018. № 3. С. 19–25.

Арляпов В.А., Каманина О.А., Каманин С.С., Решетилов А.Н., Швецов В.И. Контроль биотехнологических процессов ферментными электродами, модифицированными нанотрубками. // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2019. Т. 55(3). С. 303–312

Паславская В.О., Алферов С.В. Эффективность биоанодов на основе иммобилизованного биокатализатора в макете биотопливного элемента. // *Актуальная биотехнология*. 2018. № 3 (26). С. 254–256.

Решетилов А.Н., Плеханова Ю.В., Тарасов С.Е., Быков А.Г., Гуторов М.А., Алферов С.В., Тенчурин Т.Х., Чвалун С.Н., Орехов А.С., Шепелев А.Д., Готовцев П.М., Васильев Р.Г. Оценка свойств биоэлектродов на основе углеродных высокодисперсных материалов, содержащих микроорганизмы *Gluconobacter*. // *Российские нанотехнологии*. 2017. Т. 12(1–2). С. 83–89.

Kitova A., Tarasov S., Plekhanova Y., Bykov A., Reshetilov A. Direct bioelectrocatalytic oxidation of glucose by *Gluconobacter oxydans* membrane fractions in PEDOT:PSS/TEG-modified biosensors. // *Biosensors*. 2021. V. 11 (5).

Arlyapov, V.A., Kharkova, A.S., Kurbanaliyeva, S.K., Kuznetsova, L.S., Machulin, A.V., Tarasov, S.E., Melnikov, P.V., Ponamoreva, O.N., Alferov, V.A. and Reshetilov, A.N. Use of biocompatible redox-active polymers based on carbon nanotubes and modified organic matrices for development of a highly sensitive BOD biosensor. // *Enzyme Microb Technol*. 2021. V. 143.

Арляпов В.А., Харьковская А.С., Курбаналиева С.К., Кузнецова Л.С. Использование биосовместимых редокс-активных полимеров на основе унт и модифицированных органических матриц для создания высокочувствительного БПК-биосенсора. // *Актуальная биотехнология*. 2020. № 3 (34). С. 478–481.

Курбаналиева С.К., Харьковская А.С., Арляпов В.А. Разработка биосенсора на основе бактерий *Parasoccus ucei*, иммобилизованных в электропроводящий гель БСА с нейтральным красным. // *Известия Тульского государственного университета. Естественные науки*. 2019. № 1. С. 11–21.

Kamanina O.A., Kharkova A.S., Arlyapov V.A., Kamanin S.S. Glucose biosensor based on screen-printed electrode modified with silicone sol–gel conducting matrix containing carbon nanotubes. // *3 Biotech*. 2019. V. 9(7). P. 290.

Nawaz A, Hafeez A, Abbas SZ, Ul Haq I, Mukhtar H, Rafatullah M. A state of the art review on electron transfer mechanisms, characteristics, applications and recent advancements in microbial fuel cells technology. // *Green Chemistry Letters and Reviews*. 2020. V.13(4). P.101–117.

Stom DI, Zhdanova GO, Kalashnikova OB, Bulaev AG, Kashevskii AV, Kupchinsky AB, et al. Acidophilic Microorganisms *Leptospirillum* sp., *Acidithiobacillus* sp., *Ferroplasma* sp. as a cathodic bioagents in a MFC. // *Geomicrobiology Journal*. 2021. V.38(4). P.340–346.

Калашникова О.Б., Кашевский А.В., Варданян Н.С., Эрдэнэчимэг Д., Жданова Г.О., Топчий И.А., Понаморева О.Н., Вятчина О.Ф., Д.И. Стом. Ацидофильные хемолитотрофные микроорганизмы: перспективы применения в биогидрометаллургии и микробных топливных элементах. // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021. Т. 11(1). С. 34–52.

УДК 577.152.1

**ОСОБЕННОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ОКСИДОРЕДУКТАЗ В ПРОЦЕССАХ
ОБЕЗВРЕЖИВАНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ****Б.Б. Тихонов, П.Ю. Стадольникова, А.И. Сидоров, М.Г. Сульман***Тверской государственный технический университет, Тверь, Россия*

Ферменты, благодаря своему сложному строению и механизмам действия, обладают уникальными свойствами, отличающими их от традиционных катализаторов. Среди ферментов особое место занимают оксидоредуктазы (К.Ф. – 1), такие как пероксидаза (К.Ф. – 1.11.1.7), тирозиназа (К.Ф. – 1.14.18.1), глюкозооксидаза (К.Ф. 1.1.3.4) и лакказы (1.10.3.2), отличительной особенностью которых является высокая активность, специфичность и стабильность в катализируемых реакциях, а также относительная легкость извлечения из природных источников [1]. Они широко используются в процессах очистки сточных вод от органических загрязнителей и других технологических процессах, успешно заменяя классические каталитические системы [2]. Несмотря на многочисленные достоинства, использование свободных форм оксидоредуктаз в промышленных процессах нецелесообразно, прежде всего, из-за невозможности многократного использования биокатализатора, высокой стоимости очищенных препаратов ферментов и их низкой устойчивости к ингибирующим факторам [3]. Более технологично, экономически и экологически обосновано использование ферментов, иммобилизованных на поверхности нерастворимой твердой фазы, что, во-первых, значительно упрощает отделение биокатализатора от реакционной среды, во-вторых, позволяет четко регулировать параметры катализируемой реакции, в-третьих, стабилизировать сами ферменты с сохранением их активности и субстратной специфичности [4]. Целью данной работы был анализ основных особенностей и закономерностей применения оксидоредуктаз для обезвреживания органических загрязнителей.

Оксидоредуктазы (К.Ф. – 1) – класс ферментов, катализирующих реакции, лежащие в основе биологического окисления, сопровождающиеся переносом электронов с одной молекулы (восстановителя – акцептора протонов или донора электронов) на другую (окислитель – донор протонов или акцептор электронов). Реакции, катализируемые оксидоредуктазами, в общем виде выглядят следующим образом: $A- + B \rightarrow A + B-$, где А – восстановитель (донор электронов), а В – окислитель (акцептор электронов) [5]. Наиболее важными представителями этого класса ферментов, используемыми в процессах обезвреживания органических загрязнителей, являются пероксидаза, тирозиназа и лакказа. Пероксидаза (К.Ф. – 1.11.1.7) – гликопротеин с молекулярным весом около 40 кДа, содержащий феррипорфирин IX в качестве простетической группы гема, катализирующий окисление ароматических доноров перекисью водорода [6]. Тирозиназа (К.Ф. – 1.14.18.1) – медьсодержащий фермент (около 0,2 % меди), который катализирует окисление тирозина и других органических соединений кислородом и широко распространен в бактериях, фруктах, морепродуктах и животных [7]. Лакказы (1.10.3.2) – неспецифичный медьсодержащий гликопротеид, содержит в составе 10–45 % полисахаридов и чаще всего 4 атома меди на одну молекулу, окисляющий органические субстраты с помощью молекулярного кислорода [8].

Пероксидаза хрена широко применяется для окисления и удаления органических компонентов из водных ресурсов, в том числе – с получением полезных целевых продуктов. При этом наиболее распространенными носителями для иммобилизации пероксидазы являются магнитные частицы или модифицированные различными способами биополимеры (хитозан и альгинаты) [9]. В работе Quintanilla и др. пероксидаза из корней репы была модифицирована метоксиполиэтиленгликолем и иммобилизована на альгинатных микросферах, при этом и проверена активность в окислительной полимеризации раствора фенола, при этом за 17 циклов окисления раствора фенола (10 мМ) было утилизировано более 65 % фенола [10]. Karim и др. иммобилизовали пероксидазу хрена на матрице β-циклодекстрин-хитозан для окисления азокрасителей из текстильных стоков [11]. Janovic и др. исследовали эффективность в процессах удаления красителей (антрахинон, трифенилметан, акридин и т. д.) биокатализаторы на основе иммобилизованной пероксидазы хрена, полученные ковалентной иммобилизацией на альгинате и хитозане, адсорбцией и ковалентной сшивкой на неорганических носителях (оксид алюминия), инкапсулированием в альгинат-кальциевые микросферы с помощью полиэтиленгликоля, при этом наиболее эффективными оказались системы «хитозан-пероксидаза» и «альгинат-пероксидаза», полученные ковалентной сшивкой, сохранявшие 78 и 67 % начальной активности после 7 циклов работы, соответственно [12].

В статье Ху и др. разработан метод иммобилизации тирозиназы грибов для ферментативной обработки фенольных сточных вод – получение поперечно сшитых агрегатов фермента (CLEA), в присутствии которых фенол, п-крезол, п-хлорфенол и бисфенол А в концентрациях до 2,5 мМ, могут быть эффективно утилизированы с полной конверсией в течение 0,5–3 ч, при этом активность фермента схожа с активностью свободного фермента, а при многократном использовании CLEA сохраняют около 80 % начальной активности к десятому циклу [13]. Liu и др. иммобилизовали лакказы на мезопористом магнитном композите для удаления фенола и п-хлорфенола из воды [14]. Jia и др. удаляли 2,4 – дихлорфенол комбинированным фотокаталитическим методом с иммобилизацией лакказы на TiO_2 и стекле с достижением 78 %-ной конверсии [15]. В последние годы широко используется обесцвечивание промышленных красителей лакказами, иммобилизованными на таких носителях, как керамические материалы, монтмориллонит, модифицированный SiO_2 , альгинатные и другие гели, при этом чаще всего обесцвечивающий эффект достигается за счет совмещения ферментативного катализа и адсорбции красителя носителем [16, 17].

Коллективом Тверского государственного технического университета были синтезированы биокатализаторы, на основе иммобилизованной пероксидазы хрена на модифицированных хитозаном, глутаровымдиальдегидом и карбодиимидом ионообменных смолах [18], модифицированном соляной кислотой, 3-аминопропилтриэтоксисиланом, хитозаном и глутаровымдиальдегидом TiO_2 [19], сохраняющие до 75 % активности при 10-кратном использовании в процессах очистки воды от фенольных загрязнений. Иммобилизованная на Al_2O_3 и SiO_2 , обработанных полистиролсульфокислотой, хитозаном и глутаровымдиальдегидом и на магнитных наночастицах Fe_3O_4 пероксидаза хрена сохранила до 65 % исходной активности после 10 циклов использования в процессе синтеза полупродуктов витамина Е из 2,3,6 – триметилфенола [20, 21]. Кроме того, исследована иммобилизация тирозиназы на модифицированных хитозаном, глутаровымдиальдегидом и карбодиимидом ионообменных смолах ионообменных смолах [22]. Биокатализатор обеспечивает более 95 % конверсии пирокатехина в хиноны с потерей не более 30 % активности в 10 циклах использования. Также был разработан эффективный биокатализатор окисления органических соединений на основе иммобилизованной на микросферах из альгината натрия пероксидазы хрена [23]. Для синтеза микросфер могут быть использованы как капельный метод, так и метод внутреннего гелеобразования.

Таким образом, очевидно, что ферменты класса оксидоредуктаз (прежде всего – пероксидаза, тирозиназа, лакказа) могут быть эффективно использованы в процессах обезвреживания органических загрязнителей. При выполнении лабораторных исследований нами были выявлены основные особенности и закономерности данного процесса:

1) Ферментативная обработка загрязненных органическими загрязнителями сточных вод должна использоваться в качестве одного из завершающих этапов очистки, которому должно предшествовать удаление механических примесей и каталитическая обработка сточных вод металлическими катализаторами для получения концентрации загрязнителей в воде не более 20 ммоль/л. При невыполнении этого условия возможно необратимое ингибирование синтезированных биокатализаторов на основе оксидоредуктаз высокими концентрациями субстратов и продуктов реакции, а также повреждение нативной конформации ферментов и их активных центров, что существенно снижает эффективность их использования.

2) Для достижения максимальной эффективности работы ферментативных систем на основе оксидоредуктаз в процессах обезвреживания органических загрязнителей целесообразно использовать иммобилизованные препараты ферментов, причем иммобилизация должна быть ковалентной, с использованием модификаций ферментов и носителей функциональными группами с высокой реакционной способностью, прежде всего – COOH и $-\text{NH}_2$, что, во-первых, увеличивает прочность закрепления фермента на носителе, во-вторых, снижает вероятность попадания фермента в очищенную воду.

3) При использовании в качестве активных компонентов ферментативных систем пероксидазы и тирозиназы продуктами реакции являются хиноновые радикалы, которые далее спонтанно олигомеризуются в реакционной смеси с образованием нерастворимых или слаборастворимых в воде компонентов, которые могут быть отделены от реакционной смеси механическими методами (например, фильтрованием).

Кроме того, продукты реакции могут в значительном количестве адсорбироваться на поверхности и в порах пористых носителей. Таким образом, данные биокатализаторы совмещают в себе 2 функции – каталитическую и адсорбционную, что позволяет существенно повысить эффективность утилизации токсичных загрязнителей водных ресурсов.

4) Благодаря легкости извлечения пероксидазы и тирозиназы из природных источников, а также высокой активности и устойчивости к ингибирующим воздействиям получаемых ферментативных экстрактов, на основе них могут быть созданы достаточно дешевые и доступные биокатализаторы, синтез которых не требует использования дорогостоящих стадий и реагентов. Все стадии синтеза биокатализаторов проводятся при комнатной температуре, так как повышение температуры может привести к необратимым изменениям в структуре биополимеров и ферментов, являющихся компонентами биокатализаторов, что отрицательно скажется на активности и стабильности синтезируемых биокатализаторов.

5) Целесообразно применение в процессах очистки воды от органических загрязнителей экологически безопасных и биodeградируемых материалов и реагентов. В частности, для этой цели в качестве носителей могут использоваться биополимеры (хитозан, альгинаты, целлюлоза, пектины) или природные материалы (глины, органические отходы), в качестве сшивающих реагентов и модификаторов поверхности носителей – такие реагенты как карбодиимиды, N-гидроксисукцинимид, глутатион, цистеин и т. д.

6) Диапазон температур, который является оптимальным для проведения процесса утилизации токсичных органических соединений в лабораторных условиях, обусловлен прежде всего свойствами ферментов класса оксидоредуктаз (пероксидазы хрена, тирозиназы, лакказы). Вследствие белковой природы ферментов, наибольшую активность они проявляют при температурах не выше 40 °С, далее происходят необратимые изменения в структуре белковой молекулы, приводящие к потере каталитической активности. Этот диапазон, согласно проведенным экспериментам, является оптимальным и для иммобилизованных (на ионообменных смолах, диоксиде титана, биополимерах) препаратов оксидоредуктаз, при этом температурная устойчивость всех синтезированных иммобилизованных препаратов к температурам от 30 до 40 °С на 25–30 % выше, чем у растворимого фермента за счет стабилизации структуры фермента и его активного центра на твердых носителях.

7) Диапазон pH, который является оптимальным для проведения процесса утилизации токсичных органических соединений в лабораторных условиях, также обусловлен свойствами оксидоредуктаз. В каталитической активности данного класса ферментов участвуют функциональные группы белка, способные протонироваться или депротонироваться в зависимости от pH в растворе, а реакционноспособной является, как правило, только одна из форм. Ионы H⁺ и OH[–] относятся к числу наиболее общих эффекторов ферментативной активности, поэтому их концентрация оказывает существенное влияние на кинетику действия гетерогенных биокатализаторов. Иммобилизация вызывает некоторое смещение «колоколообразной» зависимости активности фермента от pH. Как показали эксперименты, пероксидаза хрена, тирозиназа и лакказа как в растворимой, так и в иммобилизованной формах имеют оптимум pH 6,0–7,0. Кроме того, выявлено, что диапазон pH, в которых синтезированные иммобилизованные препараты оксидоредуктаз проявляют свою активность, на 15–20 % расширился, по сравнению с растворимыми формами ферментов, что также связано со стабилизацией структуры фермента и его активного центра на твердых носителях.

8) Так как процесс, протекающий при катализе иммобилизованными ферментами, является гетерогенным, то существенное влияние на скорость процесса оказывает массоперенос. Диффузия субстратов и продуктов реакции в процессе может быть сильно затруднена. Для избавления от внешнедиффузионного торможения целесообразно использовать увеличение интенсивности перемешивания, что приводит к уменьшению неперемешиваемого слоя вблизи частиц катализатора и тем самым способствует облегчению диффузии субстрата к активным центрам фермента и продуктов реакции от активных центров. Для уменьшения влияния внутридиффузионного торможения целесообразно постоянно поддерживать насыщение фермента субстратом, так как при достаточно высоких концентрациях субстрата реакция переходит в кинетический режим, что существенно облегчает регулирование процесса и увеличивает эффективность биокатализаторов. Однако следует учитывать, что при значительном увеличении концентрации субстрата может происходить ингибирование активных центров фермента как избытком субстрата, так и избытком продукта реакции.

Заключение. В статье проведен анализ успешного опыта использования иммобилизованных ферментов класса оксидоредуктаз (пероксидазы, тирозиназы, лакказы) в процессах очистки воды от токсичных органических загрязнителей и выявлены основные особенности и закономерности, которые необходимо учитывать при реализации данных процессов в промышленных масштабах для достижения максимальной эффективности очистки. В целом не вызывает сомнений, что ферменты класса оксидоредуктаз могут быть эффективно использованы в процессах обезвреживания органических загрязнителей, что подтверждается множеством публикаций в ведущих международных рецензируемых научных изданиях. Так как на ферментативные процессы влияет целый ряд факторов, то при разработке процессов должны быть выявлены наиболее значимые из них и оценено их влияние на стабильность достижения запланированных показателей эффективности процессов.

Литература

- Martínez A.T., Ruiz-Dueñas F.J., Camarero S., Serrano A., Linde D., Lund H., Vind J., Tovborg M., Herold-Majumdar O.M., Hoffrichter M., Liersch, Ullrich R., Scheibner K., Sannia G., Piscitelli A., Pezzella C., Sener M.E., Kılıç S., Alcalde M. Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations // *Biotechnology Advances*. 2017. Vol. 35, Iss. 6, pp. 815–831.
- Guzik U., Hupert-Kocurek K., Wojcieszynska D. Immobilization as a strategy for improving enzyme properties – Application to oxidoreductases // *Molecules*. 2014. Vol. 19. pp. 8995–9018.
- Schmidt A., Dordick J.S., Hauer B., Kiener A., Wubbolts M., Witholt B. Industrial biocatalysis today and tomorrow // *Nature*. 2001. Vol. 409. pp. 258–268.
- Hanefeld U., Gardossi L., Magner E. Understanding Enzyme Immobilisation // *Chem. Soc. Rev.* 2009. Vol. 38. pp. 453–468.
- Price N.C. Fundamentals of enzymology: the cell and molecular biology of catalytic proteins. – 3rd ed. – Oxford: Oxford University Press, 1999. – 478 p.
- Veitch N.C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme // *Phytochem.* 2004. Vol. 65. pp. 249–259.
- Solano O., Solano F. New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins // *Pigm. Cell Melanoma Res.* 2009. Vol. 27. P. 750–760.
- Durán N., Rosa M.A., D'Annibale A., Gianfreda L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review // *Enzyme and Microbial Technology*. 2002. Vol. 31. P. 907–931.
- Тихонов Б.Б., Сульман Э.М., Стадольникова П.Ю., Сульман А.М., Голикова Е.П., Сидоров А.И., Матвеева В.Г. Иммобилизованные ферменты класса оксидоредуктаз в технологических процессах: обзор // *Катализ в промышленности*. 2019. № 19(1). стр. 59–72.
- Quintanilla-Guerrero F., Duarte-Vazquez M.A., Tinoco R., Gomez-Suarez M., Garcia-Almendarez B.E., Vazquez-Duhalt R., Regalado C. Chemical Modification of Turnip Peroxidase with Methoxypolyethylene Glycol Enhances Activity and Stability for Phenol Removal Using the Immobilized Enzyme // *J. Agric. Food Chem.* 2008. Vol. 56. P. 8058–8065.
- Karim Z., et al. β -cyclodextrin-chitosan complex as the immobilization matrix for horseradish peroxidase and its application for the removal of azo dyes from textile effluent // *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2012. Vol. 72. P. 10–17.
- Janović B.S., Micić-Vičovac M.L., Vujčić Z.M., Vujčić M.T. Tailor-made biocatalysts based on scarcely studied acid horseradish peroxidase for biodegradation of reactive dyes // *Environmental Science and Pollution Research*. 2017. Vol. 24. Iss. 4, pp. 3923–3933.
- Xu D. – Y., Yang Z. Cross-linked tyrosinase aggregates for elimination of phenolic compounds from wastewater // *Chemosphere*. 2013. Vol. 92. P. 391–398.
- Liu Y., Zeng Z., Zeng G.; Tang L., Pang Y., Li Z., Liu C., Lei X., Wu M., Ren P. Immobilization of laccase on magnetic bimodal mesoporous carbon and the application in the removal of phenolic compounds // *Bioresour. Technol.* 2012, Vol. 115. P. 21–26.
- Jia J., Zhang S., Wang P., Wang H. Degradation of high concentration 2,4-dichlorophenol by simultaneous photocatalytic-enzymatic process using TiO_2/UV and laccase // *Journal of Hazardous Materials* 205 – 206 (2012) 150–155.
- Jořenek M., Zajoncová L. Immobilization of Laccase on Magnetic Carriers and Its Use in Decolorization of Dyes // *Chem. Biochem. Eng. Q.* 2015. Vol. 29 (3). P. 457–466.
- Chao C., Guan H., Zhang J., Liu Y., Zhao Y., Zhang B. Immobilization of laccase onto porous polyvinyl alcohol/halloysite hybrid beads for dye removal // *Water Sci. Technol.* 2018. Vol. 77(3). P. 809–818.
- Тихонов Б.Б., Сидоров А.И., Сульман Э.М. Биокатализатор для очистки сточных вод от фенолов на основе иммобилизованной пероксидазы хрена // *Катализ в промышленности*. 2007. № 3. С. 48–50.
- Тихонов Б.Б., Стадольникова П.Ю., Сидоров А.И., Сульман Э.М. Физико-химические исследования биокатализатора на основе иммобилизованной на модифицированном диоксиде титана пероксидазы хрена // *Бюллетень науки и практики*. 2017. № 12 (25). С. 98–104.
- Матвеева О.В., Лакина Н.В., Долуда В.Ю., Шкилева И.П., Матвеева В.Г., Сульман Э.М. Влияние способа иммобилизации пероксидазы на активность биокатализатора в процессе окисления триметилфенола // *Катализ в промышленности*. 2015. № 1. С. 70–78.
- Matveeva O., et al. Biocatalytic Oxidation of 2,3,6-Trimethylphenol Over Immobilized Horseradish Peroxidase in Nonaqueous Media // *Topics in Catalysis*, 2011, Vol. 54, pp. 1309–1317.
- Сидоров А.И., Тихонов Б.Б., Стадольникова П.Ю., Сульман Э.М. Перспективы использования оксидоредуктаз для обезвреживания фенольных загрязнений // *Актуальная биотехнология*. 2017. № 2 (21). С. 104–108.
- Тихонов, Б.Б., Матвеева, В.Г., Стадольникова, П.Ю., Сидоров, А.И. «Утилизация фенола и его производных с использованием иммобилизованной на природных полимерах пероксидазы хрена», *Химическая безопасность*, 2019, № 3(2), с. 194–203.

УДК 581.192

РОЛЬ НАКОПЛЕНИЯ ПРОЛИНА И МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА В ОТВЕТ НА ТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ZNO-НАНО У HORDEUM SATIVUM DISTICHUM**М.С. Волошина, Е.М. Вечканов, Т.М. Минкина, А.А. Плотников, С.С. Манджиева,***Южный федеральный университет, г. Ростов-на-Дону, Россия*

Введение. В оптимальных условиях роста активные формы кислорода (АФК), включая перекись водорода (H_2O_2), супероксид (O_2) и гидроксильный радикал (ОН), постоянно производятся на низких уровнях, главным образом, в хлоропластах, пероксисомах и митохондриях растительных клеток. Баланс между выделением и удалением АФК строго контролируется антиоксидантными системами (Apeel and Hirt, 2004). Однако в условиях экологического стресса происходит окислительное повреждение биологических важных соединений клетки, таких как, хлорофилл, мембранные липиды, белки и ДНК, что в конечном итоге приведет к гибели клеток (Bowler et al., 1992; Dat et al., 2000; Molassiotis et al., 2006). Одной из общих реакций многих видов растений, подвергающихся различным абиотическим стрессам, является накопление ферментов, таких как пролин, глицин, бетаин, холин и О – сульфат (Rhodes and Hanson, 1993; Serraj and Sinclair, 2002). Пролин – это аминокислота, которая хорошо растворима, нетоксична и имеет низкий молекулярный вес (Ashraf and Fooland, 2007). Она защищает растения, действуя как клеточный осмотический регулятор между цитоплазмой и вакуолью. Пролин действует путём детоксикации АФК, таким образом, защищая целостность мембраны и стабилизируя антиоксидантные ферменты (Sharp et al., 1990; Bandurska, 1993; Bohnert and Jensen, 1996). Механизм накопления пролина в растениях или его частях, подвергшихся стрессу, до сих пор полностью не изучен. Предполагается, что это происходит из-за снижения активности системы транспорта электронов (Venekamp, 1989; Sawhney et al., 1990; Alia et al., 1993), что приводит к накоплению $NaDH$ и H^+ . Накопление пролина, предположительно за счет синтеза из глутаминовой кислоты, может быть адаптивным механизмом для снижения уровня накопленного НАДН и кислотности ($2НАДН + 2H^+$).

Накопление продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), в том числе и малонового диальдегида (МДА), являются следствием разрушения мембранных структур. Продукты ПОЛ могут вызывать денатурацию белков и нуклеиновых кислот (Gill, Tuteja, 2010). Вследствие этого накапливаются токсичные для клетки продукты окисления, такие, как оксипирины и окисленные пептиды (Chmielowska-Bak et al., 2015). По некоторым предположениям, накопление МДА наряду с усиленной генерацией пероксида водорода является одним из важных механизмов процесса старения у растений (Sung, Jeng, 1994). Содержание МДА отражает выраженность протекания окислительного стресса (Dhindsa et al., 1981).

Ионы цинка (Zn^{2+}) оказывают положительное, так и токсическое действие на клетки растений. Zn^{2+} активируют многие ферменты, такие как РНК-полимераза, супероксиддисмутаза, алкогольдегидрогеназа и карбоангидраза; также они участвуют в белковом синтезе и метаболизме углеводов, липидов и нуклеиновых кислот. Ионы цинка также являются частью факторов транскрипции, известных как «цинковые пальцы», которые контролируют пролиферацию и дифференцировку клеток (Palmer and Guerinot, 2009). Помимо этих функций, цинк играет важную роль в функционировании хлоропластов и некоторых их функций, таких как процесс восстановления фотосистемы II путем «рециклирования» белка D1, поврежденного световым излучением или активностью пептидазы SPP (Hansch R, Mendel R.R., 2009).

Принцип токсичности избыточных ионов цинка для растений основан на том факте, что эти ионы в клетках «конкурируют» за сайты связывания, предназначенные для других биологически активных ионов (Hansch., 2009). Одни из типичных симптомов избытка Zn, является хлороз молодых листьев, а также снижение биомассы растений и ингибирование роста корней (Broadley M.R., 2007).

Наиболее распространённым соединением Zn является его оксид (ZnO). Его обычно добавляют в пластик, стекло, керамику, цемент и резину, а также в пигменты, краски, пищевые добавки, батареи и негорючие материалы. По оценкам, ежегодно около 550 тонн наноформы ZnO производится во всем мире (Piccinno., 2012). Однако несмотря на объёмы производства, исследований, связанных с изучением токсического действия ZnO -нано на растения, всё ещё ограниченное количество.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовались семена *H.sativum districum* сорта Травник, широко культивируемого на территории Ростовкой Области. Семена, визуально проверенные на отсутствие морфологических повреждений, в количестве 25 штук, размещали на равном расстоянии на фильтровальной бумаге в чашках Петри. В дальнейшем семена проращивали при 28 градусах при добавлении 5 мл дистиллированной воды на чашку Петри. После успешного прорастания проростки переносили в пластиковые сосуды (размер) в количестве 10 штук и добавляли 50 мл. раствора нано-ZnO из расчета 300 мг/кг и 2000 мг/кг (1 и 2 группа). Образцы ячменя выращивали в течение 9 дней в условиях гидропоники при постоянном перемешивании. Проводился отбор корней и листьев, которые промывали дистиллированной водой и хранили при температуре -70 °C

Определение содержания малонового диальдегида производилось с использованием тиобарбитуровой кислоты. 500 мг каллусной ткани растирали с 1,5 мл 20 % трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Полученный супернатант использовался для определения МДА при длине волны 535 нм и 600 нм.

Содержание пролина определяли модифицированным методом Bates et al. (1973). 100мг каллусной ткани растерли с 4 мл дистиллированной воды. Полученный супернатант использовали для определения пролина с помощью нингидриновой реакции, в ходе которой образуется сине-фиолетовой окраски пурпура Рузмана. Количество пролина определяется по интенсивности окраски раствора на спектрофотометре, при длине волны 520 нм.

Результаты и обсуждения. Было отмечено подавление роста корней, возможно связанное с закупоркой корневых волосков нано-ZnO в первой группе на 26,7 % и 43,1 % в сравнении с контролем.

Концентрация МДА была значительно снижены в листьях с более высоким содержанием пролина (на 7,2 % ZnO-нано во 2 группе (при концентрации 2000 мг/кг) и на 2 % в 1 группе (при концентрации 300мг/кг) в растворе относительно контроля (рис. 1). Это может быть вызвано с увеличением количества низкомолекулярных антиоксидантов и антиоксидантных ферментов, таких как пероксидаза, супероксиддисмутаза (SOD) или каталаза (CAT), что снижает количество малонового диальдегида в растениях (Слепцов, 2016). Также данная тенденция связана с действием пролина на ферментную активность растений. По литературным источникам, снижение МДА указывает на отсутствие окислительного стресса в частях корня и побегов *H. sativum distichum* под действием разных концентраций ZnO-нано. Таким образом, понижение содержание МДА в корнях и побегах опытных растений в исследовании, вероятно, связано с повышением концентрации пролина, что является способом адаптации растения к неблагоприятным условиям произрастания.

В 1 и 2 группе растений было отмечено увеличение пролина в листьях на 49,5 % относительно контроля в 1 группе и 9 % относительно контроля во 2 группе. В корнях наблюдалась обратная тенденция при этом количество пролина в первой группе уменьшалось на 39,4 %, а во второй группе на 46,6 % относительно контроля (рис. 2). Возможно, это связано с тем, что высокая концентрация ZnO-нано истощила запасы пролина, израсходованного на нейтрализацию активных форм кислорода.

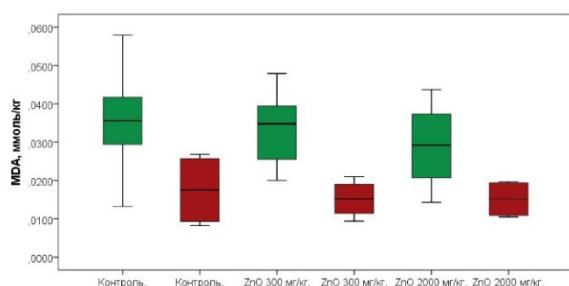


Рис. 1. Зависимость изменения малонового диальдегида в листьях и корнях ячменя от концентрации ZnO нано в растворе, ммоль/кг.

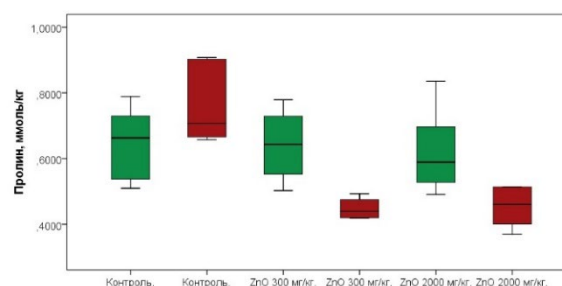


Рис. 2. Зависимость изменения эндогенного пролина в листьях и корнях ячменя от концентрации ZnO-нано в растворе ммоль/кг.

Закключение. Модельный эксперимент продемонстрировал, что наночастицы ZnO могут воздействовать на маркеры солевого стресса, тем самым нивелируя воздействие окислительного стресса. Обработка образцов ZnO-нано вызывала увеличение эндогенного пролина в растениях *H. Sativum distichum*, но снизило концентрацию малонового диальдегида.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания в сфере научной деятельности № 0852–2020–0029

Литература

- Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Ann. Rev. Plant Biol.* 55, 373–399.
- Asada, K., 1992. Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant* 85, 235–241.
- Ashraf, M., Fooland, M.R., 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Bot.* 59, 206–216.
- Bandurska, H., 1993. In vitro and in vivo effect of proline on nitrate reductase activity under osmotic stress in barley. *Acta Physiol. Plant* 15, 83–88.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil.* 39, 205–207.
- Bohnert, H.J., Jensen, R.G., 1996. Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends Biotechnol.* 14, 89–97.
- Bowler, C.M., Van Montagu, M., Inze, D., 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 83–116.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brait JF (2002) Metal ion activated oxidative stress and its control. In: Inze D, Montagu MV (eds) *Oxidative stress in plants*. Taylor and Francis, New York, pp 171–189
- Broadley M.R., White P.J., Hammond J.P., I. Zelko, A. Lux, Zinc in plants, *New Phytol.*, 173 (2007) 677–702
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D., Van Breusegem, F., 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol. Life Sci.* 57, 779–795.
- Dhindsa, R.S., Plumb-Dhindsa, P., Thorpe, T.A., 1981. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J. Exp. Bot.* 32, 93–101.
- Ehsanpour, A.A., Fatahian, N., 2003. Effects of salt and proline on *Medicago sativa* callus. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 73, 53–56.
- Garcia-Gomez C., et al., Comparative effect of ZnO NPs, ZnO bulk and ZnSO₄ in the antioxidant defences of two plant species growing in two agricultural soils under greenhouse conditions, *Sci. Total Environ.*, 589 (2017) 11–24.
- Hansch R, Mendel R.R., Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 12 (2009) 259–266.
- Hideg, E., 1997. Free radical production in photosynthesis under stress conditions. In: Pessarakli, M. (Ed.), *Handbook of Photosynthesis*. Marcel Decker, New York, pp. 911–930.
- Latef A., Abu Alhmad M.F., Abdelfattah K.E., The Possible Roles of Priming with ZnO Nanoparticles in Mitigation of Salinity Stress in Lupine (*Lupinus termis*) Plants, *J. Plant Growth Regul.*, 36 (2017) 60–70.
- Lin, J.N., Kao, C.H., 1998. Effect of oxidative stress caused by hydrogen peroxide on senescence of rice leaves. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 39, 161–165.
- Loreto, F., Velikova, V., 2001. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiol.* 127, 1781–1787.
- Matysik, J., Bhalu, A.B., Mohanty, P., 2002. Molecular mechanism of quenching of reactive oxygen species by proline under water stress in plants. *Curr. Sci.* 82, 525–532.
- Molassiotis, A., Sotiropoulos, T., Tanou, G., Diamantidis, G., Therios, I., 2006. Boron-induced oxidative damage, antioxidant and nucleolytic responses in shoot tips culture of the apple rootstock EM9 (*Malus domestica* Borkh). *Environ. Exp. Bot.* 56, 54–62.
- Palmer C.M., Guerinet M.L., Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants, *Nat. Chem. Biol.*, 5 (2009) 333–340.
- Piccinno F., Gottschalk F., Seeger S., Nowack B., Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world, *J. Nanopart. Res.*, 14 (2012) 1–11.
- Rhodes, D., Hanson, A.D., 1993. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher-plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44, 357–384.
- Serraj, R., Sinclair, T.R., 2002. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? *Plant Cell Environ.* 25, 333–341.
- Sharp, R.E., Hsiao, T.C., Silk, W.K., 1990. Growth of maize primary root at low water potential's. *Plant Physiol.* 93, 1337–1346.
- Stohs SJ, Bagchi D (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biol Med* 18:321–336
- Subbaiah L.V., Prasad T., Krishna T.G., Sudhakar P., Reddy B.R., Pradeep T., Novel Effects of Nanoparticulate Delivery of Zinc on Growth, Productivity, and Zinc Biofortification in Maize (*Zea mays* L.), *J. Agric. Food Chem.*, 64 (2016) 3778–3788.
- Woodward, A.J., Bennett, Ian. J., 2005. The effect of salt stress and abscisic on proline production, chlorophyll content and growth of in vitro propagated shoots of *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 82, 189–200.
- Wu, J.T., 1998. Role of proline accumulation in response to toxic copper in *Chlorella* sp. (chlorophyceae) cells. *J. Phycol.* 34, 113–117.
- Zhu, Z., Wei, G., Li, J., Qian, Q., Yu, J., 2004. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Sci.* 167, 527–533.
- Слепцов И.В., Журавская А.Н. Динамика накопления флавоноидов в листьях *Amaranthus retroflexus*, *Agastache rugosa* и *Thlaspi arvense*, собранных в Центральной Якутии // *Химия растительного сырья*. – 2016. – № 3. – С. 67–72.

РАЗРАБОТКА БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА

В.А. Алферов¹, В.А. Арлянов¹, А.Н. Решетилов^{1,2}

¹ Тульский государственный университет, Тула, Россия

² Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушкино, Россия

Биохимическое потребление кислорода (БПК) – один из наиболее широко используемых критериев для оценки качества воды. Это мера того органического загрязнения, которое может разлагаться биологически. Для этого теста был выбран традиционный пятидневный период еще в 1908 году, потому что это, предположительно, наибольшее время, которое требуется речной воде, чтобы пройти от источника до устья в Великобритании. Этот параметр определяется как количество кислорода в литре системы, поглощаемое за счет дыхательной активности микроорганизмов, использующих для своей жизнедеятельности присутствующие в образце органические соединения во время инкубации при определенной температуре (обычно 20 °С) в течение фиксированного периода. Традиционный метод определения БПК основан на инкубировании насыщенной кислородом пробы в течение 5 суток (БПК₅) и определении содержания кислорода до и после инкубации, что снижает оперативность анализа. Кроме того, результаты могут варьироваться в зависимости от лаборатории (20 %), в первую очередь из-за колебаний микробного разнообразия используемого посевного материала.

Показатель БПК₅ имеет три основных применения: во-первых, это показатель сброса сточных вод; во-вторых, на очистных сооружениях соотношение между БПК₅ и ХПК (химическое потребление кислорода) указывает на биоразлагаемую фракцию сточных вод; в-третьих, соотношение ХПК / БПК₅ является показателем размера проектируемой станции очистки сточных вод, которая необходима для конкретного объекта загрязнения. Таким образом, БПК является важнейшим критерием мониторинга и очистки сточных вод. Исследования в течение двух последних десятилетий привели к созданию нескольких технологий, которые требуют меньше времени и более надежны. Наряду с модификациями стандартного метода для упрощения аналитических измерений, принципиально новыми подходами стали аналитические биотехнологии с применением: биосенсоров на основе иммобилизованных микроорганизмов с использованием кислородного электрода; биосенсоров на основе редокс-медиаторов; биореакторов; биотопливных элементов (БТЭ), прежде всего, микробных топливных элементов (МТЭ) [1]. В научном коллективе НОЦ «Экобиотехнология» (Тульский государственный университет и Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН) более десяти лет проводятся исследования по разработке микробных биосенсоров и БТЭ для определения этого важнейшего для экологического мониторинга показателя загрязнения водных объектов [2, 3].

К преимуществам микробных БПК-биосенсоров на основе иммобилизованных микроорганизмов можно отнести: короткое время ответа, портативность, удобство в работе, а также отсутствие специальных требований к приготовлению исследуемого образца. Биосенсор на основе дрожжей *Debaryomyces hansenii* ВКМ Y-2482, иммобилизованных в поливиниловый спирт-N-винилпирролидон, продемонстрировал высокую чувствительность, стабильность и высокую степень корреляцию со стандартным методом [4]. Тульским государственным университетом совместно с ООО «Эконикс–Эксперт» разработан и изготовлен экспериментальный образец амперометрического биосенсорного анализатора для экспресс – определения БПК на основе микроорганизмов иммобилизованных в гидрогель химически модифицированного поливинилового спирта (БПК-термооксиметр «Эксперт-009») (рис 1).

Важно отметить, что в России аналогичные анализаторы до настоящего времени промышленно не выпускались, и отсутствовала аттестованная методика экспресс-определения БПК. Несмотря на выпуск экспериментального образца анализатора, работа по улучшению потребительских характеристик биосенсора продолжается. Применение золь-гель технологий иммобилизации микроорганизмов в органомодифицированные силикагели позволило разработать стабильный биорецепторный элемент для БПК-биосенсора, который сохранял свою активность после УФ-облучения [5]. Высокой чувствительности определения БПК с помощью биосенсора при исследовании чистых водных объектов удалось достичь путем применения искусственной ассоциации микроорганизмов в рецепторном элементе сенсора [6, 7]. Пространственное разделение микроорганизмов в геле позволило добиться более высокой стабильности в работе биосенсора [8] (рис 2).

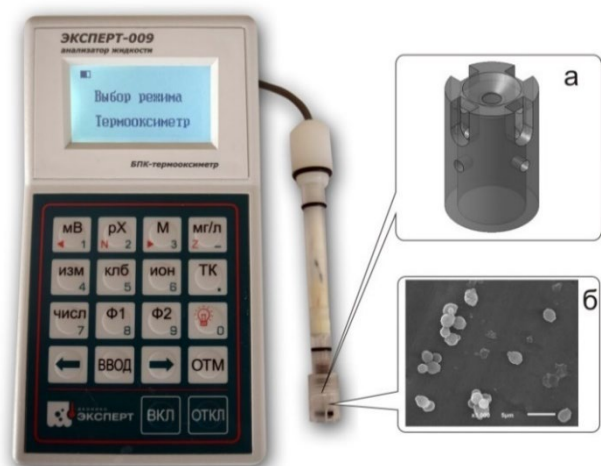
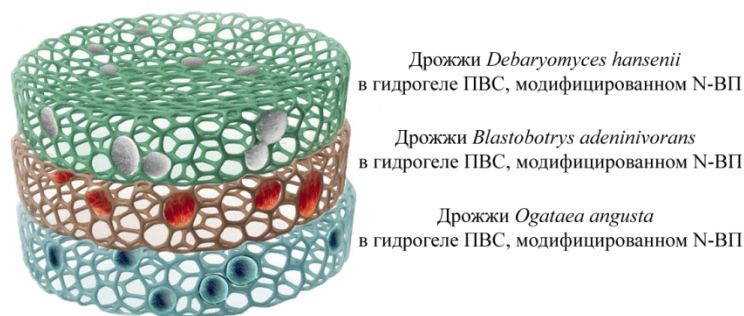


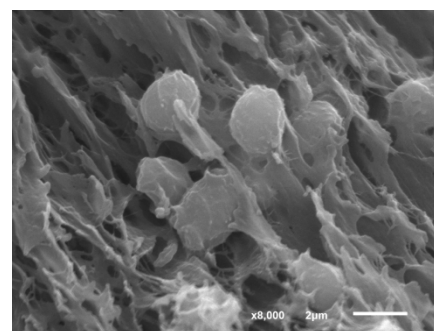
Рисунок 1. Внешний вид БПК-термооксиметра «Эксперт-009» с амперометрическим датчиком; а – фиксатор биорецепторного элемента, б – микрофотография дрожжевых клеток *Debaryomyces hansenii* ВКМ У-2482, используемых в биорецепторном элементе

Недостатком биосенсоров, основанных на регистрации клеточного дыхания, является невозможность их применения в условиях недостатка кислорода, например, для контроля качества анаэробной очистки. Альтернативой являются медиаторные биосенсоры. К системе «субстрат-микроорганизм» добавляется редокс-соединение – медиатор электронного транспорта, способный восстанавливаться под действием микроорганизмов, заменяя собой естественный акцептор электронов – кислород. При этом, количество восстановленного клетками медиатора пропорционально метаболической активности биоматериала. В нашем научном коллективе разрабатываются БПК-биосенсоры с внеклеточной передачей заряда от микроорганизмов на электрод посредством редокс-соединений на основе отдельных штаммов микроорганизмов и активного ила, в том числе с использованием двух медиаторной системы, редокс-полимеров и наноматериалов [9].

Медиаторы – ферроцен, 1,1'-диметилферроцен, ферроценкарбоксальдегид, ферроценацетонитрил, нейтральный красный, 2,6 – дихлорфенолиндифенол, тионин, метиленовый синий и феррицианид калия в сочетании с иммобилизованными дрожжами *Debaryomyces hansenii* использовали в составе рецептора биосенсора [10].



А



Б

Рисунок 2. А – схема послойной иммобилизации дрожжевых микроорганизмов *Ogataea angusta*, *Blastobotrys adeninivorans*, *Debaryomyces hansenii* в гель ПВС, модифицированного N-винилпирролидоном; Б – СЭМ фотография рецепторного элемента на основе модифицированного ПВС с иммобилизованными микроорганизмами после набухания в буферном растворе (показан слой с дрожжами *D. hansenii*).

Три бактериальных штамма SPB1, SPB2 и SPB3, выделенные из активного ила очистных сооружений, наиболее эффективно по сравнению с остальными штаммами окисляли модельный раствор на основе глюкозы и глутаминовой кислоты в присутствии медиатора ферроцена. Изучена возможность использования выделенных штаммов в качестве основы медиаторного амперометрического БПК-биосенсора. Анализ генов 16S рРНК показал, что штаммы SPB1, SPB2 и SPB3 на 99.79–100 % близки к штаммам *Paracoccus yeii* BAA-599T, *Pseudomonas veronii* DSM 11331T и *Bacillus proteolyticus* TD42T, соответственно. Анализ десяти проб сточной воды (до и после очистки) и рек Тульской области показал, что использование ферроцена и клеток штамма *P. yeii* SPB1 позволило получать данные, имеющие высокую корреляцию ($R = 0.9934$) с результатами стандартного метода [11].

Для повышения эффективности переноса электрона использовали двухмедиаторные системы на основе комбинаций медиаторов, потенциально способных к переносу электронов, и дрожжей *Debaryomyces hansenii*. Разработанные двухмедиаторные биосенсоры по своим характеристикам превосходили свои одномедиаторные аналоги [12]. В другом исследовании расширили спектр микроорганизмов, способных участвовать в медиаторном переносе электронов [13]. Использование окислительно-восстановительных полимеров на основе бычьего сывороточного альбумина и хитозана, ковалентно связанных с медиаторами и содержащих углеродные нанотрубки, для иммобилизации бактерий *Paracoccus yeai* ВКМ В-3302 позволило сконструировать БПК-биосенсор с высокой чувствительностью (рис 3). Результаты биосенсорного анализа поверхностных вод коррелировали с результатами стандартного метода ($R = 0,9916$) [9].

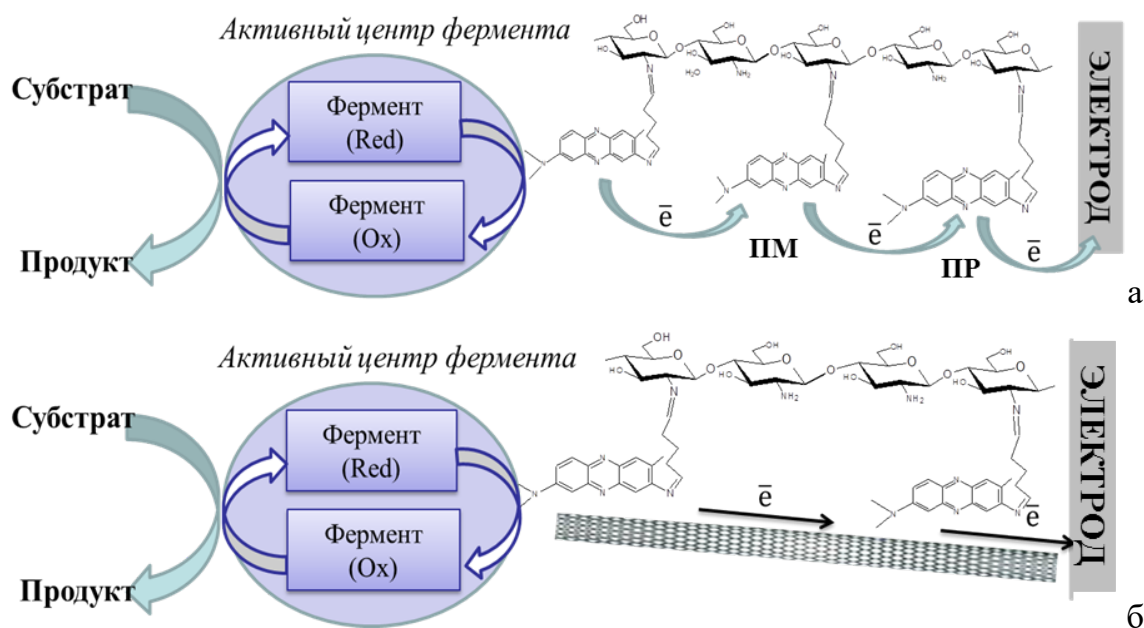


Рисунок 3. Перенос электронов на электрод в редокс-активном полимере на основе хитозана и нейтрального красного а) – в отсутствие углеродных нанотрубок; б) – в присутствии углеродных нанотрубок. (ПР – поверхностная реакция на электроде, ПМ – прыжковый механизм переноса электронов)

Следует отметить, что в последнее время основное внимание ученых направлено на разработку микробных топливных элементов, которые способны не только вырабатывать электроэнергию из органических соединений в сточных водах, но и регистрировать БПК, о чем свидетельствуют последние обзоры в этой области [14–16]. Для детекции индекса биохимического потребления кислорода применили анод микробного топливного элемента, который формировали, используя активированный графитовый электрод, модифицированный поливиниловым спиртом, содержащим N-винилпирролидон и иммобилизованные бактерии *Gluconobacter oxydans*. Применение этой матрицы позволило получить микробный топливный элемент с высокой чувствительностью и минимальным временем единичного измерения индекса БПК₅, составляющими 8.3 мВ дм³/мг O₂ и 30 мин соответственно. При этом нижняя граница определяемых значений биохимического потребления кислорода была 0.34 мг O₂/дм³. Полученные результаты БПК₅ сточных вод коррелировали с данными стандартного метода (коэффициент корреляции составлял 0.99). Параметры предложенной модели биосенсора превосходили описанные аналоги по таким характеристикам, как нижний предел детекции и минимальное время одиночного измерения [17].

Исследования выполнены в рамках выполнения государственного задания Минобрнауки РФ (No. FEWG-2020-0008).

Литература

- Jouanneau S., Recoules L., Durand M.J., Boukabache A., Picot V., Primault Y., Lakel A., Sengelin M., Barillon B., Thouand G. Methods for assessing biochemical oxygen demand (BOD): A review. // *Water Res.* 2014. V.49. P. 62–82.
- Понаморева О.Н., Арляпов В.А., Алферов В.А., Решетилов А.Н. Микробные биосенсоры для определения биологического потребления кислорода (обзор). // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2011. Т.47(1). С. 5–15.
- Арляпов В.А., Алферов В.А. Понаморева О.Н. Амперометрические биосенсоры. Применение для экологического мониторинга и контроля биотехнологических процессов, LAP LAMBER Academic Publishing. 2013. 245 с.
- Арляпов В.А., Юдина Н.Ю., Алферов С.В., Асулян Л.Д., Алферов В.А., Решетилов А.Н. Биосенсорный электрод на основе композиции поливиниловый спирт – N-винилпирролидон для экспресс-определения биохимического потребления кислорода. // *Сенсорные системы.* 2012. Т. 26. № 3. С. 246–255.
- Kamanina O, Arlyapov V, Rybochkin P, Lavrova D, Podsevalova E, Ponamareva O. Application of organosilicate matrix based on methyltriethoxysilane, PVA and bacteria *Paracoccus yeei* to create a highly sensitive BOD. 3 *Biotech.* 2021; 11(7):331.
- Arlyapov V, Kamanin S, Ponamareva O, Reshetilov A. Biosensor analyzer for BOD index express control on the basis of the yeast microorganisms *Candida maltosa*, *Candida blankii*, and *Debaryomyces hansenii*. *Enzyme and microbial technology.* 2012; 50(4–5):215–20.
- Yudina N, Arlyapov V, Chepuranova M, Alferov S, Reshetilov A. A yeast co-culture-based biosensor for determination of waste water contamination levels. *Enzyme and microbial technology.* 2015; 78:46–53.
- Arlyapov V, Yudina N, Machulin A, Alferov V, Ponamareva O, Reshetilov A. A Biosensor based microorganisms immobilized in layer-by-layer films for the determination of biochemical oxygen demand. // *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2021. V.7(1). P.133–41.
- Arlyapov VA, Kharkova AS, Kurbanaliyeva SK, Kuznetsova LS, Machulin AV, Tarasov SE, et al. Use of biocompatible redox-active polymers based on carbon nanotubes and modified organic matrices for development of a highly sensitive BOD biosensor. // *Enzyme and microbial technology.* 2021. V.143. P.109706.
- Зайцева А.С., Арляпов В.А., Юдина Н.Ю., Носова Н.М., Алферов В.А., Решетилов А.Н. Медиаторный БПК-биосенсор на основе ферроцена и дрожжевых клеток *Debaryomyces hansenii* // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2017. Т. 53. № 3. С. 341–348.
- Харькова А.С., Арляпов В.А., Туровкая А.Д., Автух А.Н., Стародумова И.П., Решетилов, А.Н. Медиаторный БПК-биосенсор на основе клеток микроорганизмов, выделенных из активного ила. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2019. Т.55. С. 119–209.
- Zaitseva A, Arlyapov V, Yudina N, Alferov S, Reshetilov A. Use of one – and two-mediator systems for developing a BOD biosensor based on the yeast *Debaryomyces hansenii*. // *Enzyme and microbial technology.* 2017. V.98. P.43–51
- Kharkova A, Arlyapov V, Ilyukhina A, Ponamareva O, Alferov V, Reshetilov A. A kinetic approach to the formation of two-mediator systems for developing microbial biosensors as exemplified by a rapid biochemical oxygen demand assay. // 3 *Biotech.* 2021 V.11(5).
- Hao, S., Sun, X.X., Zhang, H., Zhai, J.F. and Dong, S.J. Recent development of biofuel cell based self-powered biosensors. // *Journal of Materials Chemistry.* 2020. V. B 8(16). P. 3393–3407.
- Do M, Ngo H, Guo W, Chang S, Nguyen D, Liu Y, et al. Microbial fuel cell-based biosensor for online monitoring wastewater quality: A critical review. *Science of the Total Environment.* 2020 V.712. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.135612.
- ElMekawy A, Hegab H, Pant D, Saint C. Bio-analytical applications of microbial fuel cell-based biosensors for onsite water quality monitoring. // *Journal of Applied Microbiology.* 2018. V.124(1). P.302–13.
- Alferov S, Arlyapov V, Alferov V, Reshetilov A. Biofuel Cell Based on Bacteria of the Genus *Gluconobacter* as a Sensor for Express Analysis of Biochemical Oxygen Demand. // *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2018. V.54(6). P.689–94.

ВЛИЯНИЕ БИОЧАРА ИЗ ОТХОДОВ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА НА ИЗМЕНЕНИЕ pH ПОЧВЫ ПРИ ПОГЛОЩЕНИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

М.В. Бурачевская¹, Т.М. Минкина¹, Т.В. Бауэр², И.П. Лобзенко¹, В.И. Северина¹

¹ Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

² Федеральный исследовательский центр Южный научный центр РАН, Ростов-на-Дону, Россия

Введение. Как антропогенные, так и природные процессы приводят к распространению химического загрязнения почв. Одной из серьёзнейших проблем становится загрязнение почв тяжёлыми металлами (ТМ), которые не только снижают урожайность сельскохозяйственных культур, но и негативно влияют на здоровье человека и животных. Главная опасность ТМ – накопление в почве до токсических уровней и слабая деградация с течением времени. Из всех предложенных методов ремедиации химически загрязнённых почв особое внимание заслуживает применение сорбентов. Особенностью их действия является регулирование воздействия поллютантов путём снижения подвижности (Koptsik, 2014). Помимо этого, сорбенты могут являться дополнительными источниками питательных веществ для растений, а также позволяют удерживать больше влаги в доступной для растений форме (Zimmerman et al., 2011). Одними из наиболее эффективных и экологически безопасных сорбентов является биоуголь (биочар). Кроме того, стремление современного общества снизить зависимость от ископаемого топлива, а также снизить выбросы парниковых газов привело к активизации деятельности по поиску и разработке технологий для получения большего количества энергии из возобновляемых ресурсов. Помимо иммобилизации ТМ внесение биочара оказывает положительное влияние на химические свойства почвы, такие как изменения pH, ёмкости катионного обмена (ЕКО), содержании элементов питания (Amonette and Joseph 2009; Zimmerman et al., 2011).

Почва представляет собой мощную буферную систему, способствующую сохранению реакции среды. Адсорбция металлов снижает возможности данной системы противостоять изменению pH почвы. Механизм адсорбции ТМ, ее количественные закономерности во многом определяются значениями pH. Цель работы – изучить влияние внесения биочара на pH в черноземе обыкновенном при модельном загрязнении Cu и Zn.

Объекты и методы. Для эксперимента использован верхний слой (0–20 см) чернозема обыкновенного карбонатного тяжелосуглинистого на лёссовидном суглинке, отобранном в Октябрьском районе Ростовской области (ООПТ «Персиановская заповедная степь»). Почва характеризуется следующими физическими и химическими свойствами: Сорг – 3,7 %; pH – 7,3; обменные катионы ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$) – 36,0 смоль(экв)/кг; ЕКО – 37,1 смоль(экв)/кг; CaCO_3 – 0,1 %; содержание физической глины – 53,1 %, ила – 32,4 %, Cu – 44,3 мг/кг; Zn – 83,4 мг/кг.

В почву был добавлен биочар из шелухи риса, полученный на кафедре почвоведения и оценки земельных ресурсов Южного федерального университета, г. Ростов-на-Дону. Биочар получали путём ступенчатого пиролиза, включающего стадии просушки сырья, предварительной термической обработки и непосредственно пиролиза. Конечная температура обработки составила 700 °С, время выдержки – 45 минут. Выход биочара из шелухи риса – 34 %. К образцам почвы был добавлен биочар, в дозе 2,5 масс %.

В работе использован метод неизменных навесок (5 г) и переменных концентраций (от 0,05 до 1,0 мМ/л). Исследуемые растворы металлов приготовлены из солей $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ квалификации «химически чистые». Значения pH были определены потенциометрическим методом в исходных растворах солей металлов разных концентраций. При достижении равновесного состояния после добавления почвы с биочаром в растворы солей и взбалтывания в течение часа и суточного отстаивания в суспензии была измерена pH. Чтобы оценить различия в поглощении Cu(II), Zn(II) почвой с внесенным биочаром из шелухи риса и выявить возможные механизмы взаимодействия металлов с ними, в ходе эксперимента были измерены значения pH равновесных и соответствующих им исходных растворов ТМ.

Результаты и дискуссия. При растворении солей $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ происходит изменение pH исходных растворов за счет процессов гидролиза (табл.). Величина pH исходных растворов $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ постепенно уменьшается от 6,2 до 3,9, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ – от 6,4 до 5,9 по мере увеличения их концентрации.

Таблица – Значения рН исходных (рН_и) и равновесных растворов (рН_р) нитратных солей ТМ в зависимости от их концентрации в растворе

С исх, ммоль·л ⁻¹	Cu(II)			Zn(II)		
	рН _р	рН _и	ΔрН	рН _р	рН _и	ΔрН
0,05	7,4	6,2	1,2	7,5	6,4	1,1
0,08	7,4	5,8	1,6	7,4	6,3	1,1
0,1	7,3	5,4	1,9	7,3	6,2	1,1
0,3	7,2	5,0	2,2	7,3	6,1	1,2
0,5	7,0	4,7	2,3	7,3	6,0	1,3
0,8	6,7	4,3	2,4	7,1	6,0	1,1
1,0	6,6	3,9	2,7	7,1	5,9	1,2

концентрационном интервале. Причем значения последних во всем диапазоне концентраций выше величин рН исходных растворов, что обусловлено высокой буферностью твердой фазы адсорбента. Доминирующим процессом, очевидно, является общее повышение рН суспензий за счет связывания протонов поверхностью твердой фазы по ионообменному механизму. В этом же направлении работает растворение присутствующего в почве в небольших количествах CaCO₃. По разности между максимальными и минимальными значениями рН равновесных растворов ТМ располагаются в порядке: Cu (0,8) > Zn (0,4). Таким образом, при поступлении в почву солей Cu(II) произошло большее снижение рН равновесного раствора, чем при внесении солей Zn(II) (табл.) в связи с его меньшей способностью к комплексообразованию. Цинк также менее склонен к образованию гидроксокомплексов и, вероятно, это обуславливает меньший выход в раствор дополнительных ионов Н⁺. Положительная связь между образованием специфической сорбции и гидроксокомплексов ТМ и уменьшением рН в системе почва-раствор отмечена в работах (Горбатов и Зырин, 1988; Ладонин, 2000).

Во всем диапазоне внесённых концентраций ТМ различия в значениях рН равновесных и исходных растворов нитратов Zn(II) были ниже, чем таковых для Cu(II). Так, при высоком содержании поглощённых катионов Cu(II) разница (ΔрН) между значениями рН исходных и конечных растворов нитратов металла достигает 2,7 единиц (табл.). В случае с нитратом Zn(II) максимальные различия в уровне рН исходных и равновесных растворов составляет 1,2 единиц. Следовательно, среди рассматриваемых металлов исследуемая почва с внесённым биочаром проявляет большую буферность при загрязнении ее азотнокислыми солями Cu(II).

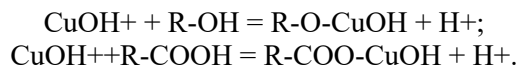
Контакт исходных растворов с почвами приводит к двум эффектам: (1) скачкообразному изменению рН, благодаря буферной способности почв, составом углеродистого сорбента и приливаемого раствора металла, свойствами поглощаемого катиона, и (2) последующему постепенному снижению рН равновесных растворов при увеличении количества поглощенных катионов ТМ. Характер зависимости рН от количества поглощенного металла определяется, главным образом, составом твердой фазы: присутствием в ней карбонатов и водорода, способного к обмену с катионами ТМ (Пинский и др., 2014). Аналогичные причины изменения рН растворов в результате сорбционных процессов в почвах выявлены в исследованиях М.Е. Mesquita and J.M. Vieira e Silva (2002). Определенное влияние могут также оказывать процессы, протекающие в жидкой фазе при изменении ее состава в результате адсорбции катионов ТМ и переходу в раствор катионов другого вида. При количестве поглощенных ТМ, близких к их максимальной адсорбции, разница между значениями рН исходных и конечных растворов может достигать 2,5–3,0 единиц и устойчиво сохраняться длительное время (Davis and Leckie, 1978).

Вытеснение обменного водорода при поглощении катионов ТМ, по-видимому, играет важную роль в подкислении равновесных растворов. Его наличие в почвах связано, прежде всего, с присутствием в твердых фазах обменных центров слабокислотной природы (Пинский и др., 2018). В результате протонирования эти центры меняют знак заряда. Например, изоэлектрическая точка (ИЭТ) аморфного Al₂O₃ находится в области рН 7,5–8,0, α-AlOOH (бемит) – в области рН 6,5–9,4, природный магнетит (Fe₃O₄) – в области рН 6,3–6,7, а аморфный оксид железа (Fe₂O₃) – в области рН 7,0–8,6 (Пинский, 1997). Это значит, что в обычных условиях почвообразования значительная часть поверхности этих компонентов насыщена ионами Н⁺ (Понизовский и др., 1999). Другой возможной причиной снижения значений рН может быть взаимодействие гидроксокомплексов ТМ с частицами почвенных минералов, приводящее к достраиванию октаэдрического слоя и выделению в раствор ионов водорода (Ладонин, 1997).

Внесение легкорастворимых солей ТМ в виде нитратов в исследуемые образцы снижает рН равновесных растворов в пределах от 7,4 до 6,6 (Cu) и от 7,5 до 7,1 (Zn) (табл.). По влиянию на кислотно-основное равновесие металлы образуют следующий убывающий ряд: Cu(II) > Zn(II). В целом, для каждого вида катионов характер зависимости рН от количества поглощенных катионов различен и обусловлен как их индивидуальными свойствами, так составом и свойствами адсорбента.

Относительно равномерное уменьшение рН равновесных растворов происходит во всем

Вследствие адсорбции MeOH^+ или Me^{2+} органическим веществом также происходит вытеснение в раствор протонов из молекул гуминовых кислот. Так, в результате специфического взаимодействия CuOH^+ с поверхностно-функциональными группами (гидроксильными ($\text{R}-\text{OH}$) и карбоксильными (COOH)) органического вещества происходит вытеснение в раствор ионов водорода (Agbenin and Olojo, 2004):



Внесение биочара всегда сопровождается более или менее существенным повышением pH почвы, что обусловлено несколькими причинами. Во-первых, биочар сам по себе имеет щелочную реакцию (pH 9,4). Также, существенное значение имеет температура пиролиза. На примере биочаров из остатков конокарпуса (*Conocarpus*) было показано, что при возрастании температуры пиролиза резко повышается pH получаемого биочара – от 6,69 при 200 °C до 9,67 при 400 °C и 12,38 при 800 °C. Это повышение было напрямую связано с возрастанием зольности получаемых биочаров (Al-Wabel, 2013).

Во-вторых, биочар имеет большое количество отрицательно-заряженных функциональных групп, которые также могут связывать ионы водорода, приводя к сдвигу pH в щелочную сторону (Brewer, Brown, 2012). Так, показано (Igalavithana et al., 2017), что в загрязненных свинцом почвах повышение pH, связанное с внесением биочара приводило к уменьшению биодоступности металла и положительному влиянию на микробиологические процессы. Сходные данные по снижению биодоступности ТМ, связанному с увеличением pH при внесении биочара были получены и для Cu(II) , Zn(II) и Cd(II) (Lu et al., 2017).

Таким образом, поглощение Cu(II) , Zn(II) черноземом обыкновенным, в который внесен биочар, сопровождается уменьшением pH равновесных растворов: более заметно при адсорбции Cu(II) . Степень подкисления зависит от концентрации и свойств катиона металла и свойств адсорбента (буферными свойствами почвы, щелочной реакцией среды биочара и наличия на его поверхности большого количества функциональных групп).

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента РФ № МК-2244.2020.5 и РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-60041.

Литература

- Горбатов В.С., Зырин Н.Г. Адсорбция Zn , Pb , Cd почвой и кислотно-основное равновесие // Вестник Московского университета. Серия 17: Почвоведение. – 1988 – № 3. – С. 21–25.
- Ладонин Д.В. Особенности специфической сорбции меди и цинка некоторыми почвенными минералами // Почвоведение. – 1997. – № 12. – С. 1478–1485.
- Ладонин Д.В. Конкурентные взаимоотношения ионов при загрязнении почвы тяжелыми металлами // Почвоведение. – 2000. – № 10. – С. 1285–1293.
- Пинский Д.Л. Ионобменные процессы в почвах. – П.: Изд-во ОНТИ ПНЦ РАН, 1997. – 166 с.
- Пинский Д.Л., Минкина Т.М., Бауэр Т.В., Невидомская Д.Г., Манджиева С.С., Бурачевская М.В. Поглощение меди черноземными почвами и почвообразующими породами юга России // Геохимия. – 2018. – № 3. – С. 280–289.
- Пинский Д.Л., и др. Особенности поглощения Cu(II) , Pb(II) и Zn(II) черноземом обыкновенным из растворов нитратов, хлоридов, ацетатов и сульфатов // Почвоведение. – 2014. – № 1. – С. 22–29.
- Понизовский А.А., Студеникина Т.А., Мироненко Е.В. Поглощение ионов меди (II) почвой и влияние на него органических компонентов почвенных растворов // Почвоведение. – 1999. – № 7. – С. 850–859.
- Agbenin J.O., Olojo L.A. Competitive adsorption of copper and zinc by a Bt horizon of a savanna Alfisol as affected by pH and selective removal of hydrous oxides and organic matter // Geoderma. – 2004. – Vol. 119(1–2). – P. 85–95.
- Al-Wabel M.I., Al-Omran A., El-Naggar A.H., Nadeem M., Usman A.R. Pyrolysis temperature induced changes in characteristics and chemical composition of biochar produced from conocarpus wastes // Bioresource technology. – 2013. – Vol. 131. – P. 374–379.
- Amonette J.E., Joseph S. Characteristics of Biochar: Microchemical Properties. In: Lehmann J., Joseph S. (eds.): Biochar for Environmental Management Science and Technology. – Earthscan: London, 2009. – P. 33–43.
- Brewer C.E., Brown R.C. Biochar A. Sayigh (Ed.). Comprehensive Renewable Energy // Elsevier, Oxford, 2012. – P. 357–384.
- Davis J.A., Leckie J.O. Effect of adsorbed complexing ligands on trace metals uptake by hydrous oxides // Environmental Science and Technology. – 1978. – Vol. 12(12). – P. 1309–1315.
- Igalavithana A.D., et al. Heavy metal immobilization and microbial community abundance by vegetable waste and pine cone biochar of agricultural soils // Chemosphere. – 2017. – Vol. 174. – P. 593–603.
- Koptsik G.N. Problems and prospects concerning the phytoremediation of heavy metal polluted soils: A review // Eurasian Soil Science. – 2014. – № 47 (9). – P. 923–939.
- Luo X., Lin Y., Wang C., Yin X., Mosa A., Lv J., Sun H., Sorption of vanadium(V) onto natural soil colloids under various solution pH and ionic strength conditions // Chemosphere. – 2017. – Vol. 169. – P. 609–617.
- Mesquita M.E., Vieira e Silva J.M. Preliminary study of pH effect in the application of Langmuir and Freundlich isotherms to Cu – Zn competitive adsorption // Geoderma. – 2002. – Vol. 106. – P. 219–234.
- Zimmerman A.R., Gao B., Ahn M.Y. Positive and negative carbon mineralization priming effects among a variety of biochar-amended soils // Soil Biology and Biochemistry. – 2011. – Vol. 43. – P. 1169–1179.

УДК 543.9:663:3664

**РАЗРАБОТКА БПК-БИОСЕНСОРА НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК
SACCHAROMYCES CEREVISIE, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ В ЗОЛЬ-ГЕЛЬ МАТРИЦУ
ДЛЯ АНАЛИЗА СТЕПЕНИ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ**

О.А. Каманина, Е.А. Ланцова, М.С. Тимошина

Тульский государственный университет, г. Тула, Россия

Материалы, полученные за счет взаимодействия химически различных компонентов, чаще всего органических и неорганических, формирующих определенную пространственную структуру, называют функциональными гибридными материалами. Использование живых клеток микроорганизмов в сочетании с такими материалами позволяет получить гибридные биоматериалы. Наиболее часто такие материалы получают с помощью золь-гель метода. Разработка биосовместимых матриц для иммобилизации клеток очень важна для улучшения характеристик функциональных гибридных материалов. В последние два десятилетия стремительно развивается новая область материаловедения, связанная с разработкой органо-неорганических матриц для иммобилизации биокомпонента [1].

В работе синтез биогибридных материалов на основе золь-гель матриц с различным соотношением силановых прекурсоров проводили в условиях основного катализа, поскольку процесс протекает в мягких условиях для микроорганизмов и достаточно быстро. В качестве силановых прекурсоров использовали тетраэтоксисилан (ТЭОС) и метилтриэтоксисилан (МТЭС). Использование МТЭС в различном соотношении с ТЭОС позволит получать материал с различными свойствами за счет введения органической группы в конечный материал. При встраивании структуроуправляющего агента поливинилового спирта в золь-гель матрицу образуется фрактальная структура, а варьирование соотношения ТЭОС и МТЭС позволяет получать матрицы с различным количеством силоксановых связей. В работе использовали дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* поскольку они хорошо изучены, обладают высокой метаболической активностью и являются модельными для изучения многих биотехнологических процессов.

Таким образом, оценили характеристики биосенсоров, сформированных на основе дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae*, инкапсулированных в органосиликатные матрицы различного состава. Биорецепторный элемент биосенсора с иммобилизованными дрожжами в матрицу с соотношением МТЭС/ТЭОС 75/25 обладает лучшими характеристиками, по сравнению с биорецепторными с другими соотношениями силановых прекурсоров, а именно: коэффициент чувствительности $0,01 \pm 0,01 \text{ мин}^{-1}$, предел обнаружения $1,6 \text{ мг/дм}^3$, относительное стандартное отклонение 0,7 % и долговременная стабильность 45 дней. Иммобилизация дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* в золь-гель матрицу не влияет на профиль окисляемых субстратов. Дрожжи способны эффективно утилизировать широкий спектр органических веществ. Таким образом разработанный гетерогенный биоматериал можно использовать как рецепторный элемент биосенсора для оценки интегральной характеристики степени загрязнения сточных вод БПК (биохимическое потребление кислорода).

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20–33–70078.

Литература

1. Wang H, Wang Z, Liu G, et al (2020) Genetical Surface Display of Silicatein on *Yarrowia lipolytica* Confers Living and Renewable Biosilica-Yeast Hybrid Materials. ACS Omega 5:7555–7566. doi: 10.1021/acsomega.0c00393

АГГЛЮТИНИРУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ КУЛЬТУР АКТИВНОГО ИЛА

С.В. Клементьев, А.В. Кобелев, А.С. Сироткин

Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, Россия

Лектины – гликопротеины и белки, обладающие способностью взаимодействовать с остатками углеводов на поверхности клеток, вызывая их склеивание [1]. Из литературных данных известно, что эти бактериальные агглютинины участвуют в образовании микробных агрегатов, в частности, биоплёнок [1].

Цель работы – Изучение агглютинирующей способности микробных культур, выделенных из сообщества активного ила очистных сооружений г. Зеленодольск.

Объекты исследований: В качестве продуцента внеклеточных лектинов был рассмотрен изолят BS1, по фенотипическим и физиолого-биохимическим свойствам отнесенный к бактериям рода *Bacillus* [2]. Культуры в составе изолятов A1, A2, A3, A4 по фенотипическим признакам были отнесены к роду *Acinetobacter* и выступали в качестве объектов для реакции агглютинации.

Методы исследований: Периодическое культивирование микроорганизмов проводили в аэробных условиях на шейкере инкубаторе Incubator ES-20/60 при температуре 37°C и скорости перемешивания 120 об/мин в течение 18 часов. В качестве питательной среды использовали ГРМ-бульон.

Для оценки активности внеклеточных лектинов культуральную жидкость BS1 центрифугировали при 10000 об/мин 30 минут. Клетки бактерий отмывали в физиологическом растворе при 8000 об/мин в течение 10 минут, затем доводили до 2 % суспензии и использовали в реакции агглютинации. Реакцию проводили в планшете с U-образными лунками. Расчет результатов проводили по формуле $RA=2^{n-1}$, где RA – агглютинирующая активность (титр), n – разведение при котором наблюдается склеивание клеток микроорганизмов [3].

Результаты экспериментальных исследований показали проявление активности нативного раствора BS1 к клеткам исследуемых изолятов (табл. 1).

Таблица 1 – Лектиновая активность нативного раствора BS1

Клетки исследуемых изолятов	Нативный раствор BS1
A1	1 ед.
A2	2 ед.
A3	0 ед.
A4	2 ед.

Согласно полученным данным нативный раствор BS1 проявлял наибольшую активность к культурам изолятов A2 и A4. Выявлена низкая активность к культурам изолята A1. Нулевая активность к бактериям изолята A3, вероятно, связана с отсутствием на клеточной поверхности углеводных детерминантов специфичных к внеклеточным лектинам BS1.

Заключение: Оценена активность внеклеточных лектинов культуры BS1 к изолятам A1, A2, A3, A4. Выявлена наибольшая активность лектинов культуры BS1 к клеткам изолятов A2 (AG = 2 ед.) и A4 (AG= 2 ед.); наименьшая активность – к клеткам изолятов A1 (AG = 1 ед.) и A3 (AG= 0 ед.).

Полученные результаты представляют интерес для дальнейшего исследования биопленок культур в составе полученных изолятов.

Литература

1. Гришин, А.В. Лектины *Pseudomonas aeruginosa* как мишени для новых антибактериальных соединений / А.В. Гришин, М.С. Кривоzubов, А.С. Карягина, А.Л. Гинцбург // Actanaturae (русскаяязычная версия). – 2015. – Том 7. – № 2 (25). – С. 32–45;
2. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology/ William B. Whitman – USA: Springer, 2005. – 1250 p;
3. Луцки М.Д. Лектины / М.Д. Луцкий, Е.Н. Панасюк, А.Д. Луцкий. Львов: Высшая школа. 1981. – 156 с.

УДК 631.416. 8:539.261:620.3

МЕХАНИЗМЫ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ И ТРАНСФОРМАЦИИ НАНО- И МАКРОФОРМ CU В РАСТЕНИЯХ *HORDEUM SATIVUM* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНХРОТРОННЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ**Т.М. Минкина, Д.Г. Невидомская, В.А. Шуваева, В.С. Цицуашвили, М.Н. Бурачевская***Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия*

Наночастицы представляют собой ультратонкодисперсные материалы с размерами, измеряемыми в нанометрах (нм; миллиардные доли метра). В окружающей среде присутствуют природные наночастицы, которые образуются естественным образом. Они представлены минеральной пылью, выдуваемой из почв, вулканической пылью, образующейся при извержении вулканов, частицами морской соли, формирующимися в океане; высокие природные уровни наноминерализации связаны с зонами разгрузки флюидно-гидротермальных горячих источников и др. Техногенные неорганические наночастицы представлены оксидами металлов [1]. По данным [2], мировое потребление техногенных наночастиц к 2019 году должно превысить 584 984 метрических тонн. На сегодняшний день нанотехнология – это относительно новая, одна из самых быстрорастущих и наиболее перспективных технологий в нашем обществе [3].

Почва является основным поглотителем наночастиц, поступающих в окружающую среду в результате производственной деятельности, в связи с чем появляется риск ухудшения экологической ситуации в регионах с повышенной концентрацией наночастиц в почвах [3, 4]. Растения играют ключевую роль в функционировании экосистем, являясь важнейшим трофическим звеном через которое воздействие наночастиц, связанных с растительным сырьем, представляет угрозу потребителям – животным и людям. Являясь важным микроэлементом для растений, Cu при низких концентрациях участвует в фотосинтетическом переносе электронов, митохондриальном дыхании, метаболизме клеточной стенки, переносе белков и мобилизации железа, а также значительно улучшает рост и развитие растений [4]. Однако, высокие концентрации Cu в растениях приводят к нарушению функции белков, хлорозу, некрозу, задержке роста и развития корней [5].

Появление высокоразрешающих методик синхротронного излучения позволяет проводить исследования по выявлению токсичности соединений металлов в макро- и наноформах и их трансформации внутри растительных тканей. В связи с этим целью настоящей работы было провести сравнительный анализ влияния макродисперсных и наноформ соединения CuO при поступлении в ткани растения *Hordeum sativum* в рамках модельного эксперимента.

Для модельного эксперимента был использован верхний гумусово-аккумулятивный горизонт, отобранный с целинного участка (0–20 см), представленного черноземом обыкновенным мощным карбонатным среднегумусным тяжелосуглинистым на лессовидных суглинках учебно-опытного хозяйства «Донское» ДонГАУ (Октябрьский район Ростовской области). Загрязнение исследуемой почвы осуществляли CuO в дозе 2000 мг/кг. Для насыщения почвы использовали эталонные соединения CuO в макродисперсной форме (размер частиц – 3–5 мкм, ЧДА, CuO, двухвалентная окись меди, ГОСТ 16539–79) и CuO в наноформе (размер частиц – менее 30–50 нм, производитель Alfa Aesar). На дно пластиковых сосудов объемом 1 л укладывали 3-х см слой промытого стекла в качестве дренажа. В сосуды вносили 1 кг почвы, просеянной через сито 6 месяцев при естественном освещении. В почве постоянно поддерживали наименьшую полевую влагоемкость. Опыт заложен в трехкратной повторности.

Для анализа полученных растительных образцов, насыщенных соединениями CuO, использовали синхротронные методы спектроскопии рентгеновского поглощения – XAFS (X-ray absorption fine structure). Исследования К-края Cu (8979 эВ) выполнены в Курчатовском центре синхротронного излучения НИЦ «Курчатовский институт» на станции «Структурное материаловедение». Источником синхротронного излучения на канале 1.36 служит поворотный магнит с полем 1.7 Тл накопительного кольца «Сибирь-2».

Валовое содержание Cu в загрязненных образцах на всем протяжении модельного эксперимента оставалось постоянным на уровне внесенной дозы Cu с учетом контрольной (незагрязненной) почвы, поскольку миграция Cu за пределы сосуда не происходила.

Ранее проведенные исследования позволили установить высокую активность Cu в наноформе при воздействии с почвой. Данная форма соединения способствует более полной трансформации CuO при воздействии с компонентами почвы за период инкубации по сравнению с ионной Cu^{2+} формой [6]. Рентгеноструктурная диагностика позволила установить, что при внесении CuO в макроформе в течение периода инкубации происходит неполное растворение экзогенных соединений металла при очень высоком уровне их поступления в почву. Согласно данным рентгеновской спектроскопии XANES трансформация CuO-нано в почве приводит в основном к образованию аморфных соединений Cu с почвенными компонентами [6].

Эффективным инструментом для выявления молекулярно-пространственного положения и локального окружения поглощенного атома Cu образцы корней растений ячменя, выращенных на загрязненной почве были изучены с использованием XANES-спектроскопии, характеризующей прилегающую околопороговую область рентгеновского спектра поглощения. Прилегающая область всех экспериментальных спектров представлена на рисунке 1.

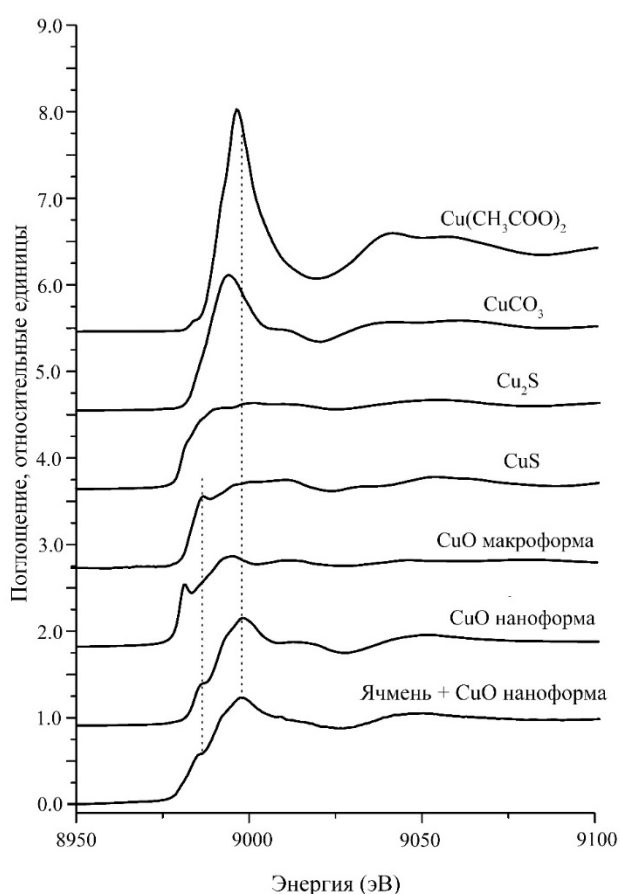


Рисунок 1 – Экспериментальные XANES спектры К-края Cu для растительных образцов ячменя (*Hordeum sativum*), выращенных при загрязнении CuO, и спектры стандартных медьсодержащих соединений

Спектры растительных образцов, выращенных при загрязнении CuO-нано, были аналогичны эталонным спектрам CuO-нано, и отличались от спектров других эталонных соединений. В результате обработки спектров и подгонки линейной комбинации было выявлено, что более 70 % атомов Cu, включенных в растения, имеют локальное окружение, типичное для CuO. Часть атомов соответствовала ближайшему окружению Cu, сходному по составу с соединением Cu_2O . Установлено, что для спектров XANES К-края при загрязнении CuO-нано выражена эффективность по механизмам поглощения Cu и биотрансформация CuO-нано относительно медьсодержащих стандартов (рис. 1). За период инкубации Cu трансформировалась в растениях, имеющих загрязнение CuO-нано по сравнению с растениями, выросшими при загрязнении макроформами CuO. Исследования тканей корней ячменя с использованием электронной микроскопии подтвердили наличие электронно-плотного материала на стенках клеток и в плазмалемме клеточных структур ячменя [7].

Таким образом, с использованием результатов подгонки линейной комбинации синхротронных методов рентгеновской спектроскопии, выявлено, что более 70 % атомов Cu, поступивших в ткани растений ячменя, имеют среду, типичную для CuO. Механизм действия оксидов и наноксидов Cu проявляется на ультраструктурном внутриклеточном уровне и показывает изменения, происходящие в корневых структурах.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ, проект № 21–77–20089.

Литература

1. Funasaka K. Detection of Pb-LIII edge XANES spectra of urban atmospheric particles combined with simple acid extraction / K. Funasaka, T. Tojo, K. Katahira, M. Shinya, T. Miyazaki, T. Kamiura, O. Yamamoto, H. Moriwaki, H. Tanida, M. Takaoka // *Science of the Total Environment*. – 2008. – Vol. 403. – P. 230–234.
2. Anjum N.A. Nanoscale copper in the soil–plant system – toxicity and underlying potential mechanisms / N.A. Anjum, V. Adam, R. Kizek, A.C. Duarte, E. Pereira, M. Iqbal, A.S. Lukatkin, I. Ahmad // *Environmental Research*. – 2015. – Vol. 138. – P. 306–325.
3. Цицуашвили В.С. Воздействие наночастиц меди на растения и почвенные микроорганизмы (обзор литературы) / В.С. Цицуашвили, Т.М. Минкина, Д.Г. Невидомская, В.Д. Раджпут, С.С. Манджиева, С.Н. Сушкова, Т.В. Бауэр, М.В. Бурачевская // *Вестник аграрной науки Дона*. – 2017. – № 3(39). – С. 93–100.
4. Raven J.A. The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂-evolving organisms / J.A. Raven, M.C. Evans, R.E. Korb // *Photosynthesis Research*. – 1999. – Vol. 60. – P. 111–150.
5. Dimkpa C.O. Fate of CuO and ZnO nano – and microparticles in the plant environment. *Environ* / C.O. Dimkpa, D.E. Latta, J.E. McLean, D.W. Britt, M.I. Boyanov, A.J. Anderson // *Environmental Science & Technology*. – 2013. – Vol. 47. – P. 4734–4742.
6. Burachevskaya M. Transformation of copper oxide and copper oxide nanoparticles in the soil and their accumulation by *Hordeum sativum* / M. Burachevskaya, T. Minkina, S. Mandzhieva, T. Bauer, D. Nevidomskaya, V. Shuvaeva, S. Sushkova, R. Kizilkaya, C. Gülserb, V. Rajputa. *Environmental Geochemistry and Health*. – 2021. – <https://doi.org/10.1007/s10653-021-00857-7>.
7. Fedorenko A.G., Minkina T., Chernikova N., Fedorenko G., Mandzhieva S.S., Rajput, V.D., et al. The toxic effect of CuO of different dispersion degrees on the structure and ultrastructure of spring barley cells (*Hordeum sativum distichum*). *Environmental Geochemistry and Health*. – 2020. – <https://doi.org/10.1007/s10653-020-00530-5>.

ЭКОЛОГО-ТРОФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МИКОБИОТЫ ГОРОДОВ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН

М.В. Петрова

Башкирский государственный университет, Стерлитамакский филиал, Стерлитамак, Россия

Степень влияния грибов на общее состояние современных экосистем, изучается недостаточно. С целью определить роль макромицетов в антропогеннонарушенных экосистемах, авторами с 2008 года начаты микологические исследования городов республики Башкортостан (РБ). Важно отметить, что эколого-трофические группы (ЭТГ) грибов – понятие не таксономическое и критерии их выделения не всегда однозначны.

На основе собственных данных и литературных источников нами был проведен анализ ЭТГ городов РБ: Стерлитамак, Салават, Ишимбай и Бирск. Классификация ЭТГ приведена согласно данным М.В. Столярской и А.Е. Коваленко [1].

В период с 2008 по 2020 гг., на территории четырех исследованных городов было выявлено 229 видов грибов-макромицетов, относящихся к двум отделам (*Ascomycota* и *Basidiomycota*), двум подотделам (*Pezizomycotina* и *Agaricomycotina*), трем классам (*Sordariomycetes*, *Leotiomycetes*, *Pezizomycetes* и *Agaricomycetes*), 6 подклассам (*Hypocreomycetidae*, *Leotiomycetidae*, *Pezizomycetidae*, *Agaricomycetidae*, *Auriculariomycetidae*, *Phallomycetidae*), 15 порядкам, 56 семействам и 93 родам.

Для выявленных видов определена приоритетная ЭТГ и проведен анализ (рис. 1). Часть видов являются лабильными в отношении субстрата, и по литературным данным могут относиться к разным ЭТГ. В этом случае, мы ориентировались на собственные данные, полученные при обнаружении и сборе плодовых тел.

Самой многочисленной является группа сапротрофов, использующих для жизнедеятельности различный субстрат (135 видов, 58,95 % от общего числа). На втором месте – группа симбиотрофов, включающая эктотрофных микоризообразователей (90, 39,3 %). Меньше всего выявлено представителей из группы паразитов (4, 1,75 %).

Симбиотрофы. Микоризообразователи (*micorrhiza*, Mr) – образуют экологически-облигатный симбиоз с высшими растениями (в основном семейства Березовые, Сосновые, Буковые). Выявленные виды грибов относятся к группе эктотрофных микоризообразователей, так как их гифы образуют чехол на наружной поверхности корней. Данная группа насчитывает 90 видов (39,3 % от общего числа), из которых 87 видов относятся только к микоризообразователям (*Amanita porphyria*, *A. rubescens*, *A. virosa*, *Astraeus hygrometricus*, *Boletus badius*, *Clitopilus prunulus*, *Collybia butyracea*, *Cortinarius nemorensis*, *C. triumphans*, *C. trivialis*, *Lactarius resimus*, *L. rufus*, *L. scrobiculatus*, *L. torminosus*, *L. trivialis*, *Russula adusta*, *R. claroflava*, *R. consobrina*, *R. cyanoxantha*, *R. delica* и др.). Три вида (*Camarophyllus virgineus*, *Cantharellus cibarius*, *Tricholoma scalpturatum*) в трофическом отношении могут быть как микоризообразователями, так и гумусовыми сапротрофами (Mr, Hu). А вид *Paxillus involutus* – может быть сапротрофом на древесине (Mr, Le).

Самыми богатовидовыми родами являются *Lactarius* (13 видов), *Russula* (16), *Tricholoma* (8), образующие микоризу с различными породами деревьев. Кроме того, в палисадниках, скверах, аллеях и парках часто можно встретить волоконниц (род *Inocybe*).

В целом, высокое разнообразие и активная представленность микоризообразователей характерно для бореальных микобиот Голарктики [2].

Сапротрофы. Используют для питания мертвое органическое вещество и тем самым участвуют в разложении растительных остатков и круговороте элементов в биосфере.

Сапротрофы на опаде (*folia dejecta*, Fd) – филофилы, грибы, произрастающие на листьях или хвое. В районе исследования было выявлено три вида (1,31 %). В г. Стерлитамак на листьях ольхи и дуба были обнаружены *Marasmius bulliardii*, *Marasmius epiphyllus*. А вид *Clitocybe cerussata* может произрастать на гниющей листве и хвое, поэтому его также могут относить к группе сапротрофов (Fd, St).

Сапротрофы на подстилке (*stramentum*, St) растут там, где хорошо выражена подстилка. Грибы могут заселять верхнюю (опад прошлого года), среднюю и нижнюю (деформированные, гниющие листья, остатки веток) её часть. К этой группе относится 16 видов (7,0 %) – *Auriscalpium vulgare*, *Clitocybe gibba*, *Collybia confluens*, *Collybia dryophila*, *Cudonia circinans*, *Cystoderma carcharias*, *Marasmius scorodonius*, *Mycena pura* и др. Кроме того, был выявлен вид *Clavariadelphys junceus*, также тяготеющий к группе филофилов (St, Fd) и виды *Agaricus silvaticus*, *Geastrum fimbriatum*, растущие как на подстилке так и на гумусе (St, Hu).

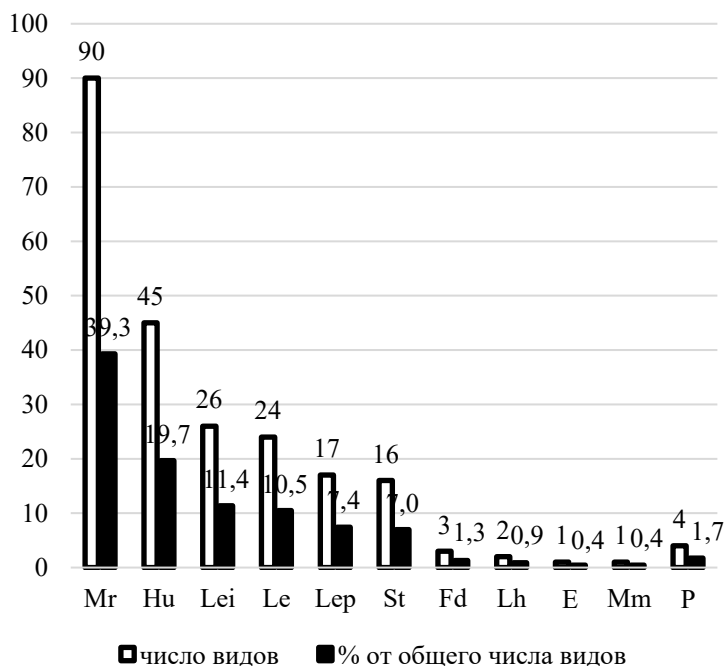


Рис. 1. Эколого-трофические группы урбанизированных территорий РБ (города Стерлитамак, Салават, Ишимбай, Бирск)

Примечание. Mr – микоризообразователи, Hu – гумусовые сапротрофы; Lei – сапротрофы на неразрушенной древесине; Le – сапротрофы на древесине; Lep – сапротрофы на разрушенной древесине; St – сапротрофы на подстилке; Fd – сапротрофы на опаде; Lh – сапротрофы на корнях и погребенной в почву древесине; E – сапротрофы на экскрементах; Mm – сапротрофы на плодовых телах макромицетов; P – факультативные паразиты на деревьях и кустарниках.

Ксилотрофы. Группа, объединяющая ЭТГ сапротрофов на древесине (мертвой или живой), принимающих участие в деструкции. Ксилотрофы представлены 69 видами (30,1 %). В зависимости от встречаемости грибов на древесине различного состояния, выделяются следующие группы ксилотрофных грибов:

Сапротрофы на древесине (lignum epigaeum, Le) являются лабильными в отношении субстрата и развиваются как на мертвой, так и на свежеспавленной древесине, представлены 24 видами (*Agrocybe cylindracea*, *Auricularia mesenterica*, *Bjerkandera adusta*, *Gloeophyllum sepiarium*, *Kuehneromices mutabilis*, *Mycena galericulata*, *Oxyporus populinus*, *Phellinus igniarius*, *Pholiota aurivella*, *Pleurotus eryngii*, *Pluteus pellitus* и др.). Из них вид *Armillaria mellea* также может являться паразитом большого числа деревьев и кустарников (Le, P).

Сапротрофы на неразрушенной древесине (lignum epigaeum integrum, Lei) представлены 26 видами (*Nectria cinnabarina*, *Paxillus atrotomentosus*, *Pholiota squarrosa*, *Piptoporus betulinus*, *Pleurotus pulmonarius*, *Polyporus squamosus*, *Polyporus varius* и др.).

Сапротрофы на разрушенной древесине (lignum epigaeum putridum, Lep) включают 17 видов (*Flammulina velutipes*, *Hypholoma capnoides*, *Hypholoma fasciculare*, *Hypholoma lateritium*, *Mycena haematopus*, *Mycena stipitata*, *Pluteus atricapillus* и др.).

Сапротрофы на гумусе (humus, Hu) – могут расти как в лесу, так и за его пределами, не обладая узкой приуроченностью к субстрату. Непосредственная связь с высшими растениями отсутствует. Микобиота исследованных городов включает 45 (19,7 %) видов макромицетов (*Calvatia utriformis*, *Clitocybe geotropa*, *Coltricia perennis*, *Coprinus atramentarius*, *Lepiota cristata*, *Lycoperdon perlatum*, *Lyophyllum decastes*, *Peziza vesiculosa*, *Ramaria eumorpha*, *Verpa bohemica* и др.). Из них *Gyromitra esculenta* может также образовывать микоризу с *Pinus sylvestris* и *Populus tremula* (Hu, Mr) и *Scleroderma citrinum* может расти на разрушенной древесине (Hu, Lep). Виды *Clitocybe aurantica*, *Entoloma nidorosum*, *Clitocybe nebularis* и *Lepista nuda* могут расти и на подстилке (Hu, St).

Сапротрофы на плодовых телах макромицетов (macrofungi, Mm). Был выявлен только один вид *Hypocrea pulvinata*, на плодовых телах *Fomes fomentarius*.

Сапротрофы на экскрементах (excrementum, E) как правило развиваются на конском или коровьем навозе. Был выявлен также только один вид – *Stropharia semiglobata*, что свидетельствует о незначительном присутствии скота в черте города.

Сапротрофы на корнях и погребенной в почву древесине (*lignum hypogaeum*, Lh) – группа лигнофильных видов, которые развиваются на гнилых пнях, гнилых ветках, погруженных в почву, представлена *Psathyrella lacrymabunda* и *P. pululiformis*.

В основном грибы-ксилотрофы приурочены к лиственным породам деревьев на территории городов.

Паразиты. Факультативные паразиты на деревьях и кустарниках (*parasitus*, P) представлены только 4 видами (1,75 %) – *Inonotus hispidus*, *I. obliquus*, *Irpex lacteus* *Phellinus tremule*.

В целом, видовой состав, обилие и приуроченность к субстрату ксилотрофных и паразитических грибов, может служить индикатором состояния древесных насаждений в черте города. Что в свою очередь, влияет на оценку состояния экологической обстановки. Анализ показал, что на данные группы приходится только треть от всех выявленных видов.

Самой многочисленной является группа сапротрофов, использующих для жизнедеятельности различных субстрат (135 видов, 58,95 % от общего числа). На втором месте – группа симбиотрофов, включающая эктотрофных микоризообразователей (90, 39,3 %). Меньше всего выявлено представителей из группы паразитов (4, 1,75 %).

Подобное распределение ЭТГ является характерным для урбанизированных территорий с невысокой антропогенной нагрузкой.

Значение грибов в антропогеннонарушенных биоценозах очень велико, ведь за счет деятельности микоризообразующих и сапротрофных видов осуществляются миграции биогенных элементов, тем самым они регулируют стабильность и продуктивность фитоценозов.

Кроме того, многие виды имеют широкую экологическую валентность на территории республики. Для комплексной оценки роли макромицетов, необходимо проведение дальнейших исследований микобиоты городов, сравнение и сопоставление полученных результатов.

Литература

1. Макромицеты Нижне-Свирского заповедника (аннотированный список видов) / Под ред. М.В. Столярской. СПб.: ООО «Свое издательство», 2015. 185 с. + 16 с. цв. вкл.
2. Перова, Н.В. Макромицеты юга Западной Сибири / Н.В. Перова, И.А. Горбунова. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2001. 158 с.

УДК 581.14

ДИНАМИКА ТУРГОРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ЛИСТЬЕВ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ КРАТКОВРЕМЕННОЙ ЗАСУХИ**Н.В. Будаговская***Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

В процессе вегетации растения могут неоднократно испытывать водный стресс в условиях кратковременного или более длительного периода засухи. Снижение оводненности тканей растений приводит к нарушению их функционального состояния. В данной работе исследовалось изменение оводненности тканей листьев растений при кратковременной засухе и последующем поливе. Измерение скорости изменения линейных размеров листьев, закончивших рост, позволяло регистрировать динамику тургорных изменений их тканей, зависящих от оттока воды из листа и поступления ее в лист в условиях засухи и при поливе. Скорость изменения линейных размеров листьев растений измеряли с помощью лазерного интерференционного ауксанометра ЛИНА-ЭМЗД (Россия) в непрерывном режиме в течение нескольких часов (время проведения эксперимента). Исследование быстрых ответных реакций растений (мин, ч) на действующий стресс-фактор проводили по разработанной ранее методике [1, 2]. Объектами исследования являлись растения риса сорта «Лидер». Растения выращивали в почве, поливали водопроводной водой. Кратковременная засуха создавалась переносом растений в сухой субстрат (песок) в чашках Петри диаметром 5 см. Во время проведения эксперимента осуществляли полив дистиллированной водой.

На рис. 1 представлен график изменения линейных размеров второго листа растения риса, закончившего рост, при переходе от засухи (2 ч) к нормальному водообеспечению. Засуха вызвала сжатие тканей листа (отрицательная область координат). Менее чем через 1 ч после полива началось растяжение тканей листа (положительная область координат). Процесс растяжения длился около 3-х часов. Скорость этого процесса вначале возрастала до 4 мкм/мин, затем замедлялась и опять увеличивалась, достигнув максимума 8 мкм/мин плавно снижалась до нуля. Данная кривая характеризует динамику поступления воды в лист, т. к. этот лист закончил рост и скорость растяжения его тканей пропорциональна скорости насыщения их водой и повышения тургора. На следующий день растение было полито, т. к. оводненность листа была снижена, о чем свидетельствует расположение графика в отрицательной области координат (Рис. 2).

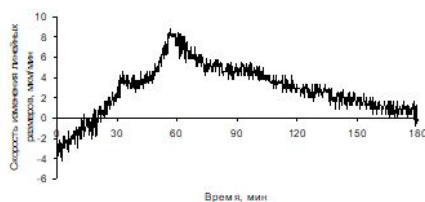


Рис. 1. Влияние полива (10 мл воды) после предшествующего периода 2 ч засухи на скорость изменения линейных размеров 2-го листа 26-дневного растения риса

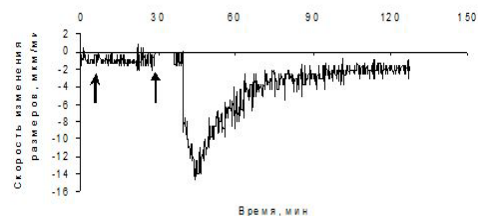


Рис. 2. Влияние засухи на скорость изменения линейных размеров 2-го листа 27-дневного растения риса, ↑ — момент добавления воды (3 мл), ↑ — момент переноса в условия засухи

В дальнейшем растение было помещено в сухой субстрат. Засуха привела к быстрому увеличению скорости сжатия листа после некоторого лаг-периода. После достижения максимальной скорости сжатия (14 мкм/мин) отмечалось плавное снижение ее до 2 мкм/мин. Этот график отражает изменение скорости потери воды листом в условиях засухи. Сжатие с высокой переменной скоростью длилось 20 мин, в дальнейшем скорость этого процесса постепенно уменьшалась. Процесс сжатия тканей листа вследствие оттока воды из него более быстрый (Рис. 2), чем процесс растяжения (Рис. 1). Представленные графики характеризуют динамику тургорных изменений листьев, их водный статус, а также взаимоотношения надземной части растений и корней при изменении влажности субстрата. Метод лазерной интерференционной ауксанометрии может быть использован как для диагностики состояния растений, так и для скрининга устойчивых к засухе генотипов растений.

Литература

Budagovskaya, N.V. Interaction of plant shoots and roots: dynamics and stability // *Biophotonics and Coherent Systems*, Belousov L.V., Voeikov V.L., Martinuk V., (Eds.), Springer. — New-York, — 2007. — P. 213–223.

Budagovskaya N.V. Rapid response reactions of buckwheat plant shoots on changes in sodium chloride concentration at the root zone and blockage of calcium channels // *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*. — 2010. — 4, — P. 128–130.

СОДЕРЖАНИЕ И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ZN В РАСТЕНИЯХ-МАКРОФИТАХ РАЗЛИЧНЫХ СЕМЕЙСТВ НА ТЕРРИТОРИИ УСТЬЕВОЙ ОБЛАСТИ РЕКИ ДОН

В.А. Чаплыгин, Ю.А. Литвинов, Д.Г. Невидомская, Н.П. Черникова, Т.М. Минкина

Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского, Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону

Введение. Многочисленные промышленные предприятия Ростовской области являются постоянными источниками техногенной нагрузки на обширные территории городских, сельскохозяйственных и рекреационных зон (Minkina et al., 2017). Поступающие в атмосферу выбросы предприятий, содержащие в числе прочих поллютантов преимущественно тяжелые металлы, не только создают локальные очаги техногенного загрязнения, но также в целом ухудшают общую экологическую ситуацию в регионе (Minkina et al., 2019).

Аквальные ландшафты, в которых преобладают надводные макрофиты, относятся к числу наиболее продуктивных экосистем (Mitsch, Gosselink, 2015; Owers et al., 2018). Как следствие, растения-макрофиты используются при оценке качества воды и экологическом мониторинге (Vymazal, Březinová, 2016). Сбор зарождающихся макрофитов, таких как *Phragmites australis* (тростник обыкновенный) был предложен в качестве инструмента улучшения и поддержания качества воды в озерах (Eid et al., 2020). *P. australis* – это космополитический эмерджентный макрофит, представленный в широком диапазоне водных сред обитания и широко исследовался в качестве биоаккумулятора Zn, действующего как биофильтр для уменьшения загрязнения воды (Bonanno et al., 2017).

Из всего многообразия присутствующих в выбросах предприятий загрязняющих веществ Zn следует уделить особое внимание. Соединения этого элемента являются одними из самых широко распространенных поллютантов. В почвах повышенное содержание Zn является результатом воздействия выбросов промышленных предприятий и автотранспорта на природные объекты (Kabata-Pendias, 2011; Анисимов и др., 2018). Цинк – необходимый растениям микроэлемент, присутствующий в составе более 200 энзимов, участвующих в метаболизме углеводов и протеинов, также входит в состав хлорофилла (Башкин, Касимов, 2004; Медведев, 2004; Sharma et al., 1990). Поэтому исследования содержания Zn в растениях являются важным аспектом при проведении экологического мониторинга.

Целью текущей работы было изучение аккумуляции и распределения Zn между надземной частью и корнями распространенных на территории устьевой области реки Дон растений-макрофитов.

Материалы и методы. Площадки мониторинга были заложены на побережье Таганрогского залива в 5–6 км от г. Азов (№ 3, № 4 и № 5), а также поселков Павло-Очаково (№ 2) и Чумбур-Коса (№ 1), удаленных от города на 22 и 40 км соответственно (Рис. 1). Все точки располагаются в непосредственной близости от кромки воды на участках.

Почвы площадок мониторинга представлены аллювиально-луговой почвой (площадки № 2, 3, 4, 5) и солончаком соровым (№ 1) (Табл. 1). Образцы почв для анализов отбирались с глубины 0–20 см на площадках мониторинга методом конверта и высушивались до воздушно-сухого состояния. Общее содержание Zn в почвах определяли рентген-флуоресцентным методом с использованием спектрометра Спектроскан МАКС-GV «НПО «Спектрон» (Россия).

В ходе исследований с 5 площадок мониторинга были отобраны образцы почв, а также наиболее распространенных на южном побережье Таганрогского залива видов растений, таких как тростник южный (*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.), пороз узколистный (*Typha angustifolia* L.), клубнекамыш приморский (*Bolboschoenus maritimus* L.).

Отбор проб для химического анализа производился в период второй декады июня – первой декады августа, на который приходится фаза цветения различных видов травянистых растений в соответствии с ГОСТ 27262–87. Высушивание растений проводилось до воздушно-сухого состояния с последующим измельчением и минерализацией по методу сухого озоления согласно ГОСТ 26929–94. В растительных образцах определялась концентрация Zn. Для экстракции металла из золы применялся 20 %-ный раствор HCl. Определение содержания элемента осуществлялось методом атомно-адсорбционной спектрофотометрии на атомно-абсорбционном спектрометре «Квант-2».



Рисунок 1. Карта-схема расположения площадок мониторинга устьевой области реки Дон

Таблица 1. Свойства аллювиально-луговых почв и солончака сорового площадок мониторинга устья реки Дон

Площадка	pH водной суспензии	CaCO ₃ , % по Шейблеру	Гумус %	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	SiO ₂ (%)	<0,001 мм	<0,01 мм
1	7,90	10,7	1,4	8,9	35,9	45,30	20,2	36,1
2	7,80	1,3	0,8	13,6	3,7	52,81	7,6	13,9
3	7,60	3,40	2,90	31,30	4,20	54,75	6,70	14,00
4	7,9	4,1	2,4	28,0	7,6	55,11	7,6	16,4
5	8,1	1,8	3,2	26,5	6,4	56,25	8,1	18,1

Подвижные соединения Zn определены экстракцией 1 н. аммонийно-ацетатного буфера (NH₄ Ac) pH 4.8 с соотношением почва: раствор 1 : 5, при продолжительности экстракции 18 ч (Минкина и др., 2011).

Оценка уровня загрязнения растений осуществлялась путем сравнения содержания ТМ с максимально допустимым уровнем (МДУ) содержания металлов в кормах сельскохозяйственных животных (Временные максимально допустимые..., 1991).

Результаты. Анализ валового содержания ТМ в почвах изучаемой территории устьевой области реки Дон выявил наличие превышения ОДК по Zn (110 мг/кг) в 3,0–4,4 раза и на площадках № 3, № 4 и № 5 (Рис. 2). Содержание обменных форм металла также превышает ПДК по Zn (23 мг/кг) в 2,9–5,3 раза на площадках № 3, № 4 и № 5. Площадка № 4 характеризуется максимальным содержанием как валовых, так и обменных форм изучаемого элемента. Сравнив наиболее удаленные от Азова площадки мониторинга с различными почвами, можно отметить, что солончак соровый, при отсутствии значимых источников загрязнения характеризуется более высоким содержанием Zn по сравнению с аллювиально-луговой почвой (Рис. 2).

Установлено загрязнение Zn растений рогоза узколистного (до 3,4 МДУ) на площадках мониторинга № 4 и № 5 (Табл. 2). Среди рассматриваемых видов растений рогоз накапливает наибольшее количество Zn в надземной части и корнях с максимумом на площадке № 5. Минимальное содержание Zn в надземной части отмечается в растениях тростника, в корнях – клубнекамышы (Табл. 2).

Дискуссия. Полученные результаты показали, что наблюдаются видовые различия аккумуляции Zn в растениях, в то время как авторами (Pérez-Sirvent et al., 2017) в схожих условиях видовая специфика накопления элемента корнями растений не прослеживалась. Накопление металла в растениях одного вида различается по площадкам мониторинга коррелируя с уровнем содержания Zn в почве (Marchand et al., 2014).



Рисунок 2. Общее содержание и обменные формы Zn в солончаке соровом и аллювиально-луговых почвах территории устья реки Дон

Таблица 2. Среднее содержание элементов в различных дикорастущих травянистых растениях устья реки Дон, мг/кг

№ площадки/ почва	Растение	Часть	Zn
1	Клубнекамыш	стебли	32±3,0
		корни	47±5,3
2	Тростник	стебли	26±2,5
		корни	54±6,0
3	Рогоз	стебли	34±3,0
		корни	58±6,4
4	Рогоз	стебли	158±16,7
		корни	231±20,2
5	Рогоз	стебли	168±15,3
		корни	195±18,4
МДУ, мг/кг (1991)			50

Анализ распределения изучаемых элементов по растениям установил, что Zn аккумулируется преимущественно в корнях всех рассматриваемых видов растений-макрофитов. Однако если для тростника южного (сем. Мятликовые (*Poaceae*)) разница между содержанием элемента в надземной части и корнях достигает 2 раз, то у клубнекамыша приморского (сем. Осоковые (*Cyperaceae*)) она составляет 1,5 раза, а у рогоза узколистного (сем. Рогозовые (*Typhaceae*)) колеблется от 1,1 до 1,7 раз (Табл. 2). Это связано с видовой спецификой поглощения элементов растениями, принадлежащими к различным семействам (Whalley et al., 2005; Hinsinger et al., 2009). Значительная разница в распределении Zn между корнями и надземной частью тростника может быть вызвана способностью растения выделять избыточные ионы металлов путем транспирации, тем самым снижая их содержание в надземной части (Burke et al., 2000). Значительная аккумуляция элементов, в том числе Zn в тростнике южном отмечена и в ряде других исследований (Aksoy et al., 2005; Peltier et al., 2003; Rzymiski et al., 2014).

Заключение. Семейство Мятликовые отличается одним из самых низких содержаний Zn в надземной части, что указывает на устойчивость растений данного семейства к загрязнению этими ТМ. Семейство Осоковые обладает высокой устойчивостью к загрязнению Zn, а Рогозовые характеризуются низкой устойчивостью к данному поллютанту. Таким образом, принадлежность растений-макрофитов к определенному семейству обуславливает общую тенденцию распределения в них ТМ. Содержание ТМ в почве прибрежных территорий, превышающее ПДК, является определяющим фактором накопления элементов в растениях.

Работа поддержана грантом РНФ 20–14–00317.

Литература

- Анисимов В.С., Анисимова Л.Н., Фригидова Л.М., Дикарев Д.В., Фригидов Р.А., Корнеев Ю.Н., Санжаров А.И., Арышева С.П. Оценка миграционной способности Zn в системе почва-растение // Почвоведение. 2018. № 4. С. 427–438.
- Башкин В.Н., Касимов Н.С. Биогеохимия. М.: Научный мир, 2004. 648 с.
- Временные максимально допустимые уровни (МДУ) некоторых химических элементов госсипола в кормах сельскохозяйственных животных. Утвержден Главным Управлением Ветеринарии министерства сельского хозяйства РФ, 1991.
- Медведев С.С. Физиология растений. СПб.: Изд-во СПб. ун-та, 2004. 336 с.
- Минкина Т.М., Назаренко О.Г., Мотузова Г.В., Манджиева С.С., Бурачевская М.В. Групповой состав соединений тяжелых металлов в почвах агроценозов, загрязненных аэрозольными выбросами Новочеркасской ГРЭС // Агрохимия. 2011. № 6. С. 68–77.
- Aksoy A., Demirezen D., Duman F. Bioaccumulation, detection and analysis of heavy metal pollution in Sultan Marsh and its environment. Water Air Soil Pollut. 2005. Vol. 164. P. 241–255.
- Bonanno G., Vymazal J., Cirelli G.L. Translocation, accumulation and bioindication of trace elements in wetland plants // Sci Total Environ. 2018. Vol. 631–632. P. 252–261.
- Bonanno G., Vymazal J. Compartmentalization of potentially hazardous elements in macrophytes: Insights into capacity and efficiency of accumulation // Journal of Geochemical Exploration, 181. 2017. DOI:10.1016/j.gexplo.2017.06.018.

- Bonanno A., Russo C., Menapace L. Market power and bargaining in agrifood markets: A review of emerging topics and tools // *Agribusiness*. 2017. Vol. 34 (2). DOI:10.1002/agr.21542.
- Burke D.J., Weis J.S., Weis P. Release of metals by the leaves of the salt marsh grasses *Spartina alterniflora* and *Phragmites australis*. *Estuar Coast. Shelf Sci.* 2000. Vol. 51. P. 153–159.
- Eid E.M., Galal T.M., Sewelam N.A., Talha N.I., Abdallah S.M. Phytoremediation of heavy metals by four aquatic macrophytes and their potential use as contamination indicators: a comparative assessment // *Environ Sci Pollut Res.* 2020. Vol. 27. P. 12138–12151.
- Hinsinger P., Bengough G.A., Vetterlein D., Young I.M. Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance // *Plant Soil*. 2009. Vol. 321. P. 117–152.
- Kabata-Pendias A. Trace elements in soils and plants. London: CRC Press, 2011. 505 p.
- Marchand L., Nsanganwimana F., Cook B.J., Vystavnac Y., Huneau F., Le Coustumer P., Lamy J.B., Oustrière N., Mench M. Trace element transfer from soil to leaves of macrophytes along the Jalle d'Eysines River, France and their potential use as contamination biomarkers // *Ecological Indicators* 46. 2014. P. 425–437.
- Minkina, T.M., Fedorenko, G.M., Nevidomskaya, D.G., Pol'shina, T.N., Fedorenko, A.G., Chaplygin, V.A. Bioindication of soil pollution in the delta of the Don River and the coast of the Taganrog Bay with heavy metals based on anatomical, morphological and biogeochemical studies of macrophyte (*Typha australis* Schum. & Thonn) // *Environmental Geochemistry and Health*. 2019. P. 1–19. <https://doi.org/10.1007/s10653-019-00379-3>.
- Minkina, T.M., Nevidomskaya, D.G., Pol'shina, T.N., Fedorov, Y.A., Mandzhieva, S.S., Chaplygin, V.A. Heavy metals in the soil–plant system of the Don River estuarine region and the Taganrog Bay coast // *Journal of Soils and Sediments*. 2017. Vol. 17 (5). P. 1474–1491. <https://doi.org/10.1007/s11368-016-1381-x>.
- Mitsch W.J., Gosselink J.G., Nagajyoti P.C., Lee K.D., Sreekanth T.V.M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ Chem Lett.* 2015. Vol. 8. P. 199–216.
- Owers C.J., Rogers K., Woodrofe C.D. Terrestrial laser scanning to quantify aboveground biomass of structurally complex coastal wetland vegetation // *Estuar Coast Shelf Sci.* 2018. Vol. 204. P. 164–176.
- Peltier E.E., Webb S.M., Gaillard J. Zinc and lead sequestration in an impacted wetland system // *Adv. Environ. Res.* 2003. Vol. 8. P. 103–112.
- Pérez-Sirvent C., Hernández-Pérez C., Martínez-Sánchez M.J., García-Lorenzo M.L., Bech J. Metal uptake by wetland plants: implications for phytoremediation and restoration // *J Soils Sediments*. 2017. Vol. 17. P. 1384–1393. DOI 10.1007/s11368-016-1520-4.
- Rzymiski P., Niedziński P., Klimaszyk P., Poniedziałek B. Bioaccumulation of selected metals in bivalves (Unionidae) and *Phragmites australis* inhabiting a municipal water reservoir // *Environ. Monit Assess.* 2014. Vol. 186. P. 3199–3212.
- Sharma P.N., Chatterjee C., Agarwala S.C., Sharma C.P. Zinc deficiency and pollen fertility in maize (*Zea mays*) // *Plant and Soil*. 1990. Vol. 124. P. 221–225. DOI: 10.1007/BF00009263.
- Vymazal J., Březinová T. Accumulation of heavy metals in aboveground biomass of *Phragmites australis* in horizontal flow constructed wetlands for wastewater treatment: a review // *Chem Eng J.* 2016. Vol. 290. P. 232–242.
- Whalley W.R., Riseley B., Leeds-Harrison P.B., Adderley P.W. Structural differences between bulk and rhizosphere soil // *Eur J Soil Sci.* 2005. Vol. 56 (3). P. 353–360.

КИНЕТИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ФОРМИРОВАНИЮ ДВУХМЕДИАТОРНЫХ СИСТЕМ ДЛЯ СОЗДАНИЯ МИКРОБНЫХ БИОСЕНСОРОВ НА ПРИМЕРЕ ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗА ИНДЕКСА БИОХИМИЧЕСКОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА

В.А. Арляпов, А.С. Харькова, А.С. Илюхина

Тульский государственный университет, Россия

Биосенсорные технологии достаточно часто используются в экологическом мониторинге, так как позволяют проводить быстрый, точный анализ качества окружающей среды [1]. Зачастую стандартные методы не относятся к экспрессным, так как требуют длительной инкубации, например, при оценке биохимического потребления кислорода (БПК) [2], чем и обеспечивают высокий спрос на разработку биосенсоров. Исходя из особенностей определения индекса БПК для формирования биорецепторов используют целые клетки микроорганизмов. Обнаружение органических загрязнителей в сточных водах может быть выполнено с использованием электрохимических биосенсоров. Наиболее успешное сопряжение выбранного биоматериала с электродом реализуется в амперометрических медиаторных биосенсорных системах [1]. Микробные амперометрические медиаторные биосенсоры представляют собой аналитические устройства, содержащие клетки микроорганизмов, электрический контакт которых с преобразователем биосенсора осуществляется с помощью медиаторов электронного транспорта. Медиатор обладает электрохимической активностью и способен восстанавливаться под действием микроорганизмов, осуществляя перенос электронов на электрод. Использование данного подхода позволило разработать портативные экспресс-системы оценки БПК [3–4]. Однако существенное ограничение данной технологии состоит в том, что ее возможно использовать преимущественно с бактериальными клетками. Дрожжевые клетки имеют толстую клеточную стенку, содержащую полисахариды и белки. Сигнализирующие системы – цитохромы дрожжей расположены в митохондриях, а трансмембранные белки – в клеточной мембране, окруженной клеточной стенкой. Следовательно, чтобы получить электрохимический сигнал от дрожжевых клеток, медиатор должен пройти через клеточную стенку и осуществить взаимодействие с мембраной и/или с внутриклеточными компонентами, такими как НАД⁺/НАДН [5]. Таким образом, использование одномедиаторных систем совместно с дрожжевыми клетками характеризуется низкой эффективностью. При этом следует учитывать, что с точки зрения экспресс-мониторинга БПК дрожжи являются перспективным биоматериалом: они способны метаболизировать широкий спектр субстратов, характеризуются устойчивостью к негативным факторам окружающей среды (высокая соленость, колебания температуры и pH среды) [1,2].

Использование двухмедиаторной системы позволяет повысить чувствительность анализа. В исследовании [6] было показано использование дрожжей *Debaryomyces hansenii* совместно с медиаторами ферроценом и метиленовым синим. Нижняя граница определяемых концентраций БПК для биосенсора составила 2,5 мг/дм³, при этом в одномедиаторной системе анализ можно было проводить только с образцами, имеющими индекс БПК не менее 5.1 мг/дм³. Следует отметить, что применение двухмедиаторных систем не всегда приводит к улучшению характеристик биосенсора [7]. Для того, чтобы передача электронов в двумедиаторной системе шла последовательно и оба медиатора не конкурировали между собой, необходимо обеспечить разницу в скоростях взаимодействия как с биоматериалом, так и с электродом. Идеальным является реализация такой схемы, при которой один медиатор с высокой скоростью взаимодействует с электродом и обладает низкой скоростью при взаимодействии с биоматериалом. При этом второй медиатор должен иметь высокую скорость при взаимодействии с биоматериалом и низкую – с электродом [6]. В данной работе изучается обоснованность выбора двухмедиаторных систем с точки зрения кинетики биоэлектрохимических реакций и предлагается основа по созданию на этом принципе биосенсора для определения БПК.

Для нахождения корреляции результатов определения БПК с использованием биосенсорного и стандартного методов анализа необходимо, чтобы разработанный биосенсор мог регистрировать окисления как можно более широкого спектра органических субстратов. В качестве биоматериала в работе были использованы бактерии *Escherichia coli* K-802, дрожжи *Blastobotrys adeninivorans* ВКМ Y-2677 и *Ogataea polymorpha* ВКМ Y-2559. Дрожжевые клетки *O. polymorpha* и *B. adeninivorans* обладают широким спектром окисляемых органических соединений.

Штамм *B. adeninivorans* ВКМ У-2677, принадлежащий Всероссийской коллекции микроорганизмов, используется в качестве производственной культуры на гидролизных заводах и характеризуется высокой солетолерантностью [8]. Дрожжи *O. polymorpha* активно применяют в биотехнологии для получения определенных белков, а в биосенсорной технологии они используются при создании биодатчиков для определения метилового и этилового спиртов. Бактерии *E. coli* присутствуют в природных и сточных водах, а также являются одним из компонентов инокулята в стандартном методе анализа, что повышает чувствительность определения БПК₅ при их включении в рецепторный элемент. Выбор эффективного биокатализатора был осуществлен по субстратной специфичности рецепторного элемента на основе систем «микроорганизм-медиатор». Оценка субстратной специфичности была проведена по 32 субстратам, относящимся к различным классам органических соединений (рис. 1). В качестве субстратов были выбраны органические вещества, наиболее часто встречающиеся в стоках различных производств. Попадание таких веществ в водоемы приводит к существенному увеличению индекса биохимического потребления кислорода.

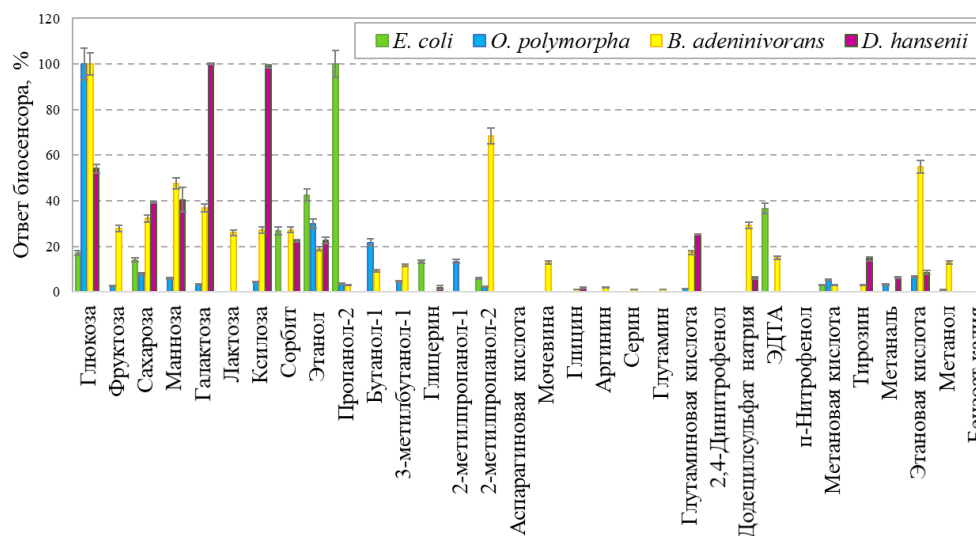


Рис. 1. Субстратная специфичность бактерий *E. coli*, дрожжей *O. polymorpha*, *B. adeninivorans* в присутствии медиатора ферроцена.

Таким образом, большее число окисляемых субстратов можно зарегистрировать при использовании медиатора ферроцена и дрожжей *B. adeninivorans* (23 субстрата). Субстратная специфичность аналогичного биосенсора на основе исследованных ранее гало-, осмоотолерантных дрожжей *D. hansenii* составляла всего лишь 14 субстратов [6]. Таким образом, на основе субстратной специфичности, а также приспособленности клеток *B. adeninivorans* к негативным факторам окружающей среды, а именно, благодаря гало- и осмоотолерантности, для дальнейшей работы были выбраны дрожжи *B. adeninivorans*.

Выбор медиатора электронного транспорта соединений, относящихся к различным классам, проводили по результатам сравнительной оценки эффективности биоэлектродокаталитического окисления глюкозы дрожжами *B. adeninivorans*. При регистрации циклической вольтамперограммы в присутствии глюкозы происходит увеличение анодного тока за счет электродокаталитического окисления субстрата дрожжами. Для того, чтобы медиатор был эффективным акцептором электронов для исследуемого биоматериала необходимо, чтобы константа скорости взаимодействия микроорганизмов с медиатором имела наибольшее значение, в этом случае медиатор будет успешно конкурировать с природным акцептором электронов – растворенным кислородом и при эксплуатации биосенсора не будет требоваться деаэрация ячейки. Предполагая, что ферментные системы дрожжей *B. adeninivorans* находятся в восстановленном состоянии из-за высокой концентрации субстрата можно найти константу взаимодействия дрожжей с исследуемыми медиаторами с помощью уравнения Николсона и Шайна [9].

Для определения констант скорости были получены зависимости отношения предельных анодных токов в присутствии и в отсутствии субстрата (I_k/I_d) от величины $1/v^{1/2}$; по тангенсу угла наклона линейной регрессии находили k_{B3} : $\sqrt{\frac{k_{B3}[E]RT}{nFv}}$ где I_k – предельный ток в присутствии субстрата (А), I_d – предельный ток в отсутствии субстрата (А); k_{B3} – константа скорости взаимодействия медиатора и биоматериала (дм³/мг×с); R – универсальная газовая постоянная, Дж/моль×К; T – температура, град. Кельвина К; $[E]$ – титр клеток (мг/дм³); v – скорость развертки (В/с); n – количество перенесенных электронов; F – постоянная Фарадея (Кл/моль).

Полученные значения констант взаимодействия медиаторов с дрожжами *B. adeninivorans* представлены в таблице 1. В целом можно отметить, что растворимые медиаторы взаимодействуют с клетками намного быстрее, чем ферроценом, что вероятно связано со способностью медиаторов феназинового и фенатиозинового ряда проникать в клетку, обуславливая высокие скорости взаимодействия. Следует отметить, что дрожжи *B. adeninivorans* являются достаточно перспективным биоматериалом для их дальнейшего использования в медиаторном биоэлектрокатализе, так как в ряде случаев константы взаимодействия дрожжей с медиаторами превосходят аналогичные константы для системы на основе бактерий *P. yeai*, выделенных из активного ила [10]. Для формирования рецепторной системы БПК-биосенсора был выбран медиатор нейтральный красный, так как он обладает наибольшей константой взаимодействия с исследуемыми дрожжами (наибольшей скоростью), а также медиатор ферроцен, который превосходит другие используемые медиаторы по скорости передачи электрона на угольно-пастовый электрод; для него константа гетерогенного переноса электронов на угольно-пастовый электрод составляет 0.4 ± 0.1 см/с [10].

Как уже отмечалось, один из подходов позволяющий увеличить эффективность переноса электронов, предусматривает использование двухмедиаторных систем. Для этого необходимо, чтобы один из медиаторов быстро взаимодействовал с микроорганизмом, а второй переносил электроны на электрод. Исходя из исследований, описанных в [10], ферроцен превосходит другие используемые медиаторы по скорости передачи электрона на электрод, в связи с чем он был выбран в качестве одного из компонентов системы. Для выбора второго медиатора для формирования рецепторной системы протестированы четыре медиатора: метиленовый синий, гексацианоферрат (III) калия, тионин, нейтральный красный; константа взаимодействия с биоматериалом для них более чем в девять раз превышает константу взаимодействия медиатора ферроцена с исследуемыми эукариотами и на порядок уступает по константе гетерогенного переноса электронов (таблица 1). Эффективность переноса электронов в двухмедиаторной системе будет зависеть от скорости взаимодействия двух медиаторов – высокое значение данной константы не вызовет лимитирования процесса передачи электронов при эксплуатации биосенсоров в данных условиях. Кроме того, высокое значение константы взаимодействия медиаторов и низкое значение гетерогенной константы переноса электронов для акцептора электронов от биоматериала будет обеспечивать последовательность переноса электронов, а не конкуренцию двух медиаторов. Для того, чтобы оценить данную константу было использовано моделирование Николсона-Шайна (таблица 1).

Таблица 1. Кинетические характеристики, сформированных двухмедиаторных систем.

Медиатор	Константа (k_1) взаимодействия дрожжей <i>B. adeninivorans</i> с медиаторами, дм ³ /г×с	Константа (k_2) взаимодействия медиатора с ферроценом, дм ³ /моль×с	Константа (k_3) гетерогенного переноса электронов на электрод, см·с ⁻¹ [32]
Метиленовый синий	0.092 ± 0.004	1950 ± 90	0.025 ± 0.009
Тионин	0.123 ± 0.007	7790 ± 80	0.022 ± 0.005
Нейтральный красный	0.681 ± 0.009	14200 ± 100	0.017 ± 0.005
Гексацианоферрат (III) калия	0.620 ± 0.008	13170 ± 70	0.0067 ± 0.0009
Ферроцен	0.011 ± 0.005	-	0.4 ± 0.1

Представленные результаты свидетельствуют о том, что нейтральный красный обладает наибольшими константами взаимодействия как с биоматериалом, так и с медиатором ферроценом, что позволяет обеспечить последовательный перенос электронов в двухмедиаторной системе (рис. 3). Таким образом, были сформированы три рецепторные системы на основе дрожжей *B. adeninivorans*: одномедиаторные системы на основе нейтрального красного и ферроцена, а также двухмедиаторная, включающая совместное использование данных медиаторов.

Для исследуемых биосенсоров были получены градуировочные зависимости аналитического сигнала от индекса БПК₅ (рис. 2).

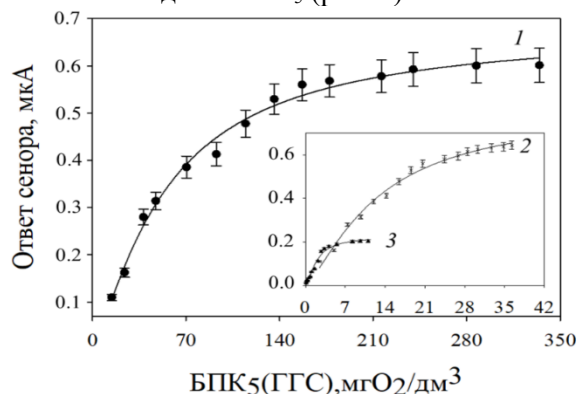


Рис. 2. Зависимость ответа биосенсоров от БПК₅ измеряемой пробы: 1 – одномедиаторная система на основе медиатора нейтрального красного; 2 – одномедиаторная система на основе медиатора ферроцена; 3 – двухмедиаторная система на основе комбинации медиаторов «ферроцен-нейтральный красный»

Электрохимический ответ биорецепторного элемента на основе целых клеток обеспечивается ферментативными реакциями микроорганизмов, поэтому обработку экспериментальных данных проводили по уравнению Михаэлиса-Ментен. В табл. 2 представлены основные аналитические и метрологические характеристики одно- и двухмедиаторных биосенсоров на основе дрожжей *B. adeninivorans*.

На основании анализа метрологических и аналитических характеристик, приведенных в таблице 4, можно сделать вывод о том, что ответ биосенсора более стабилен при использовании двухмедиаторной системы – относительное стандартное отклонение составляет 1.5 %. По долговременной стабильности оба биосенсора работают в среднем в течение 30 суток, что говорит о возможности достаточно длительного срока эксплуатации биосенсоров без замены рецепторного элемента. Время единичного анализа не превышает 5 минут, что позволит увеличить производительность анализа проб.

Таблица 2. Характеристики биосенсора на основе дрожжей *B. adeninivorans* одно- и двухмедиаторной системы

Характеристика	Нейтральный красный	Ферроцен	Ферроцен – нейтральный красный
Операционная стабильность, %	7.6	6.6	1.5
Долговременная стабильность, сутки	31	5	26
Длительность единичного измерения, мин	4–5	4–5	4–5
Коэффициент чувствительности, нА·дм ³ /мг О ₂	5±1	25±6	52±5
Линейный диапазон определяемых значений БПК ₅ , мг О ₂ /дм ³	14.5–71	2.5–21	0.16–2.7
Субстратная специфичность, число окисляемых субстратов из 32	27	23	30

Для анализа природных вод, для которых значение БПК₅ может быть довольно низким и составлять ~2 мг/дм³ (чистые природные воды), одномедиаторная система на основе нейтрального красного мало пригодна, т. к. нижняя граница биосенсора достаточно высока и составляет 14.5 мг/дм³; чувствительность одномедиаторной системы на основе ферроцена также ограничивает аналитические возможности биосенсора. Поэтому для природных вод целесообразно применять двухмедиаторную систему, так как нижняя граница биосенсора позволяет производить оценку более низких значений БПК₅.

Таким образом, биорецепторный элемент на основе двухмедиаторной системы ферроцен-нейтральный красный и дрожжей *B. adeninivorans* по таким параметрам как чувствительность и селективность наиболее пригоден для создания БПК-биосенсора. Разработанный медиаторный БПК-биосенсор на основе двухмедиаторной системы ферроцен – нейтральный красный не только не уступает известным аналогам, но превосходит их по значению нижней границы определяемых концентраций, а предложенный кинетический подход создания рецепторной системы на основе дрожжей *B. adeninivorans* и двухмедиаторной системы ферроцен-нейтральный красный позволил сформировать более чувствительную систему, превышающую по характеристикам одномедиаторные аналоги, а также разработанную ранее для дрожжей *D. hansenii* [6].

Для апробации двухмедиаторного биосенсора были отобраны пробы 10 образцов поверхностных вод. Статистическая обработка полученных данных показывает, что результаты анализа стандартным методом разбавления и методом с использованием биосенсоров незначимо различаются между собой. Коэффициент корреляции составил $R = 0.9693$ при анализе 10 образцов воды. Таким образом, разработанный двухмедиаторный биосенсор на основе дрожжевых клеток *B. adeninivorans* и системы медиаторов ферроцен-нейтральный красный можно эффективно использовать для анализа различных образцов воды.

Исследование выполнено в рамках Государственного задания МИНОБРНАУКИ РФ № FEWG-2020-0008

Литература

- Ejeian F., Etedali P., Mansouri-Tehrani H.A., Soozanipour A., Low Z.X., Asadnia M., Taheri-Kafrani A., Razmjou A. Biosensors for wastewater monitoring: A review //Biosensors and Bioelectronics. – 2018. – V. 118. – PP. 66–79.
- ISO 5815-1:2003, 2003. Water Quality – Determination of Biochemical Oxygen Demand after N Days (BOD_N) – Part 1: Dilution and Seeding Method with Allylthiourea Addition.
- Niyomdech S., Limbut W., Numnuam A., Asawatreratanakul P., Kanatharana P., Thavarungkula P. A novel BOD biosensor based on entrapped activated sludge in aporous chitosan-albumin cryogel incorporated with graphene and methylene blue //Sensors and Actuators B: Chemical. – 2017. – V. 241. – P. 473–481.
- Hu J., Li Y., Gao G., Xia S. A Mediated BOD Biosensor Based on Immobilized *B. Subtilis* on Three-Dimensional Porous Graphene-Polypyrrole Composite //Sensors. – 2017. – V. 17. – №. 11. – P. 2594.
- Rawson F., Gross A., Garrett D., Downard A., Baronian K. Mediated electrochemical detection of electron transfer from the outer surface of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* //Electrochemistry Communications. – 2012. – V. 15. – №. 1. – P. 85–87.
- Zaitseva A.S., Arlyapov V.A., Yudina N. Yu., Alferov S.V., Reshetilov A.N. Use of one – and two-mediator systems for developing a BOD biosensor based on the yeast *Debaryomyces hansenii* // Enzyme and Microbial Technology. – 2017. – V. 98. – P. 43–51.
- Gao G., Fang D., Yu Y., Wu L., Wang Y., Zhi J. A double-mediator based whole cell electrochemical biosensor for acute biotoxicity assessment of wastewater //Talanta. – 2017. – V. 167. – P. 208–216.
- Chan C., Lehmann M., Tag K., Lung M., Kunze G., Riedeld K., Gruendige B., Renneberg R. Measurement of biodegradable substances using the salt-tolerant yeast *Arxula adeninivorans* for a microbial sensor immobilized with poly(carbamoyl)sulfonate (PCS). Part II: Application of the novel biosensor to real samples from coastal and island regions. // Biosens Bioelectron. – 1999. – V.14. – I. 3. – PP. 295–302.
- Nicholson R.S., Shain I. Theory of stationary electrode polarography. Single scan and cyclic methods applied to reversible, irreversible, and kinetic systems //Analytical Chemistry. – 1964. – V. 36. – №. 4. – P. 706–723.
- Kharkova A.S., Arlyapov V.A., Turovskaya A.D., Shvets V.I., Reshetilov A.N. A mediator microbial biosensor for assaying general toxicity. // Enzyme and Microbial Technology. – 2020. – V. 132.

УДК 504.3

ОЦЕНКА ФОСФОРНОЙ НАГРУЗКИ ДЛЯ СУБЪЕКТОВ РФ С УЧЁТОМ ИНТЕНСИФИКАЦИИ ПРОИЗВОДСТВА ФОСФОРНЫХ УДОБРЕНИЙ**Е.Г. Васильева¹, К.В. Пищяева¹, А.С. Макарова¹**¹Российский химико-технологический университет Д.И. Менделеева, Москва, Россия

Основываясь на различных прогнозах о состоянии глобальных водных систем можно сделать вывод, что общее их состояние будет зависеть, в первую очередь, от объёмов использования чистой воды для производства различных товаров, включая продукты питания. При 117-процентном росте мирового производства животноводства, который по своей сути неэффективен по сравнению с растениеводством [1] базовый сценарий, включающий в себя рост численности населения планеты и глобальные климатические изменения, показывает увеличение глобальных избытков N и P (23 % и 54 % соответственно) для сельскохозяйственной системы в целом в период между 2000 и 2050 годами [2].

Авторами исследования [3] произведена оценка фосфорной нагрузки на регионы Российской Федерации с учётом глобальных климатических изменений и интенсификации сельскохозяйственной деятельности, которая показала увеличение нагрузки до 27 % к 2045 году.

В 2019 году в России за счёт введения новых производственных мощностей было произведено порядка 550 тыс. тонн фосфорных удобрений, 30 % из которых были использованы в сельском хозяйстве страны. В приведённом А.В. Волковой [4] анализе рынка минеральных удобрений рассматривается возможность увеличения производственных мощностей для фосфорных удобрений на 22 %, что, в свою очередь, приведёт к увеличению объёмов использования таких удобрений в сельскохозяйственной деятельности не менее чем на 7 %.

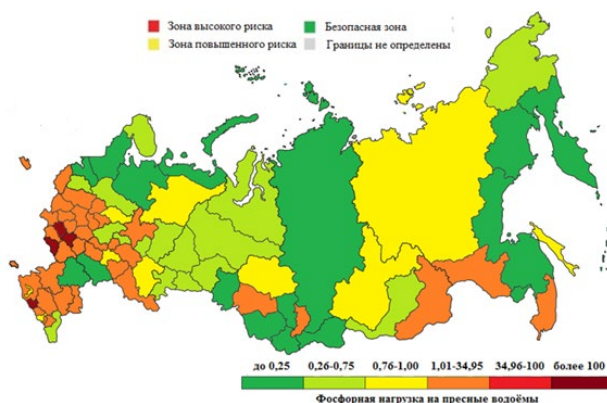


Рис. 1 Карта фосфорной нагрузки на водные системы субъектов Федерации

Коллективом авторов был смоделирован сценарий, включающий в себя интенсификацию производства и использования фосфорных удобрений на 7 % и глобальные климатические изменения до 2045 года, который показал увеличение фосфорной нагрузки не менее чем на 30 % в среднем по стране, и на 50–60 % в отдельных субъектах Федерации.

Вычисленные массы P были пересчитаны в концентрации P для пресноводных объектов субъектов РФ. Полученные концентрации сопоставлены с величиной ПДК (0,2 мг/л) и отображены с помощью карты фосфорной нагрузки (рис. 1).

На основании полученных результатов можно сделать вывод о необходимости снижения количества используемых фосфорных удобрений в сельскохозяйственной деятельности с целью сохранения водных систем и предотвращения возможности их эвтрофикации.

Литература

- Van der Hoek K.W., Nitrogen efficiency in global animal production. Environmental Pollution. 1998. V. 102. P. 127–132.
- Bouwman A.F. et al., Exploring global changes in nitrogen and phosphorus cycles in agriculture induced by livestock production over the 1900–2050 period, Livestock and Global Change Special Feature. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011, V. 110 (52). P.1–6.
- Тарасова Н.П., Макарова А.С., Васильева Е.Г., Шляхов П.И., Занин А.А., Оценка фосфорной нагрузки на пресные водоёмы субъектов российской федерации: моделирование миграции фосфора и его соединений между компонентами окружающей среды, Доклады Академии наук. 2018. Т. 480. № 6. С. 717–721.
- Волква А.В., Рынок минеральных удобрений. Национальный исследовательский университет Высшая школа экономики. 2019. С. 52.

ПРИМЕНЕНИЕ ЭЛЕКТРОПРОВОДЯЩИХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ ПРОЦЕССА АНАЭРОБНОЙ ПЕРЕРАБОТКИ НАВОЗНОГО СТОКА СВИНОКОМПЛЕКСА

Е.А. Журавлева, С.В. Шехурдина, Ю.В. Литти

ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт микробиологии Виноградского, Москва, Россия

Животноводство является одной из ключевых отраслей сельского хозяйства, несущее высокую экологическую нагрузку на окружающую среду вследствие образования больших объемов быстроразлагаемых навозных стоков. Одним из многообещающих вариантов решения данной проблемы является стимулирование недавно открытого процесса прямого межвидового переноса электронов (DIET) путем внесения электропроводящих материалов и облегчения передачи электронов между синтрофными микробными партнёрами в анаэробных условиях.

В работе было изучено влияние электропроводящих материалов (карбонный войлок, сетка из нержавеющей стали) с разными инокулятами (сброженный осадок сточных вод (далее, ОСВ) и сброженный навоз крупного рогатого скота (далее, КРС) на процесс анаэробной переработки стока и навоза свиного комплекса. Для определения вклада биопленкообразования и процесса DIET на эффективность сбраживания, применялись контроли без и с внесением инертных материалов, близких по физико-химическим свойствам (полиэфирный войлок и сетка из стекловолокна). Первый этап эксперимента включал периодическое термофильное анаэробное сбраживание стока и навоза с относительно низкой концентрацией ОВ 13,5 г/л, на втором этапе в качестве субстрата использовался только навоз, и концентрация ОВ субстрата была увеличена до 25,6 г/л. На первом этапе наибольшая эффективность процесса наблюдалась при использовании КРС и сетки из нержавеющей стали. Довольно неплохие показатели были также при использовании сетки из стекловолокна, вероятно удобной для обрастания микроорганизмами. Удельный выход метана при использовании КРС с сеткой из стекловолокна и сетки из нержавеющей стали, составил 344,8 и 318,5 мл $\text{CH}_4/\text{г ОВ}$, что было выше на 22,7 и 17,3 %, соответственно, относительно контроля. Разложение растворенного ОВ составило 27 и 37 %, а нерастворенного – 25 и 30 %, соответственно. При этом степень разложения ЛЖК, в частности пропионата, была значительно выше при использовании сетки из нержавеющей стали. По результатам второго этапа эксперимента, комбинация КРС и сетки из нержавеющей стали была также наиболее оптимальной. При этом удельный выход метана составил 258,6 мл $\text{CH}_4/\text{г ОВ}$, разложение растворенного ОВ – 43 %, а нерастворенного – 40 %. Интересно, что при удельном выходе метана 266,4 мл $\text{CH}_4/\text{г ОВ}$ при использовании ОСВ и инертного войлока, другие важные параметры метаногенеза, такие как степень разложения растворенных и нерастворенных ОВ вместе с тем были ниже и составляли 43 % и 26 %. Согласно результатам сканирующей и конфокальной микроскопии, можно предположить, что наличие пилеподобных структур в биопленках, обрастающих неэлектропроводящие материалы, вероятно, позволяет осуществлять DIET А типа и объяснить эффективность процесса. Анализ профиля микробного сообщества биопленок, обрастающих различные материалы, и сравнение их с контролем показал доминирование гидрогенотрофных метаногенов рода *Methanothermobacter* во всех пробах в архейной составляющей сообщества, и доминирование класса *Limnochordia* в пробах с КРС и частично с ОСВ. Класс *Limnochordia* в основном был представлен некультивируемой группой МВА03, которая, по последним данным предположительно является синтрофной [1].

Таким образом, для анаэробной переработки навозных стоков свиного комплекса наиболее эффективным было использование сброженного навоза КРС и сетки из нержавеющей стали, что вероятно связано с эффективным стимулированием прямого межвидового переноса электронов в анаэробном микробном сообществе.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075–15–2020–907 от 16.11.2020 г. на осуществление государственной поддержки создания и развития НЦМУ «Агротехнологии будущего».

[1] Heitkamp K, Latorre-Pérez A, Nefigmann S, Gimeno-Valero H, Vilanova C, Jahmad E, Abendroth C 2021 Monitoring of seven industrial anaerobic digesters supplied with biochar, Preprint <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-499198/v1>

УДК 579.695

ОБЕСЦВЕЧИВАНИЕ КРАСИТЕЛЕЙ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО И БРИЛЛИАНТОВОГО ЗЕЛЕННОГО КАК МОДЕЛЬ ФОТОКАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БИОГЕННЫХ НАНОЧАСТИЦ**В.С. Кулигин^{1,2}, О.А. Журавлева^{1,2}, Т.А. Воейкова^{1,2}, В.Г. Дебабов^{1,2}**¹НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия²НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика, Москва, Россия

Синтетические красители, содержащиеся в текстильных сточных водах, часто являются устойчивыми к деградации из-за сложных ароматических структур, стойких к биологическому разложению, по своей природе канцерогенны из-за наличия N=N связей. Фотокатализ растворов таких красителей с использованием полупроводников показал большой потенциал – органические красители могут быть частично переведены в такие простые соединения как вода и углекислый газ, и активность полупроводников увеличивается при дополнительном УФ-облучении. При этом было показано, что «зелёный» синтез таких полупроводниковых соединений в форме биогенных наночастиц является простым и безопасным методом, укладывающимся в экологические ограничения.

Биогенные наночастицы сульфида кадмия (NPsCdS) получали по опубликованной нами ранее оптимизированной методике [1] с использованием бактериального штамма *B. subtilis* 168 (№ В-7360), предоставленного НБЦ ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика.

В качестве моделей для исследования фотокаталитической активности были использованы водные растворы красителей метиленового синего (25 мг/л) (МС) и бриллиантового зеленого (25 мг/л) (БЗ). Для каждого эксперимента готовили контрольные образцы (15 мл раствора красителя + 1 мл дистиллированной воды) и реакционные опытные образцы (15 мл раствора красителя + 1 мл суспензии NPsCdS). Конечная концентрация NPsCdS в реакционных образцах составляла 0,5 мг/мл.

В качестве источника ультрафиолетового излучения использовали лампу чёрного света HSBW 160W (Sylvania, КНР) с пиком излучения в области 365 нм, установленную на высоте 30 см над чашками Петри с образцами. Контрольные и опытные образцы помещались под УФ-облучатель на 3 часа, с измерением оптической плотности растворов в течение каждого часа.

Результаты экспериментов показали эффективность фотокаталитической активности NPsCdS: фотодеградация БЗ составила в контрольных пробах 40 %±0,2 %, в опытных пробах 84 %±0,2 %; для МС в контрольных пробах – 8 %±0,2 %, в опытных – 36 %±0,2 %.

Было установлено, что активность фотокатализа МС и БЗ зависит от концентрации наночастиц. Для эксперимента использовали NPsCdS с конечной концентрацией в растворах красителей – 0,5 мг/мл и 0,25 мг/мл. Была установлена нелинейная зависимость эффективности фотодеградации от концентрации наночастиц. При использовании NPsCdS в концентрации 0,5 мг/мл и 0,25 мг/мл эффективность фотодеколонизации для БЗ составляла 84 %±0,2 % и 42 %±0,2 % (сравнимо с контрольным раствором), а для МС – 36 %±0,2 % и 21 %±0,2 %, соответственно. Результаты указывают на необходимость анализа оптимальной концентрации наночастиц для каждого красителя.

Показана возможность повторного эффективного использования NPsCdS и их стабильность в течение трёх циклов фотокатализа (каждый цикл – с использованием вновь приготовленного раствора красителя (25 мг/л) и наночастиц, «отмытых» ультрацентрифугированием в дистиллированной воде после предыдущего цикла использования): I цикл – для МС и БЗ – 36±0,2 % и 84±0,2 %; II цикл – 21±0,2 % и 49±0,2 %; III цикл – 15±0,2 % и 32±0,2 %, соответственно.

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-04-00088. Работа поддержана государственным заданием НИЦ «Курчатовский институт» № АААА-А20-120093090015-2.

Литература

1. Журавлева О.А., Воейкова Т.А., Булушова Н.В. и др. Биотехнологический способ получения наночастиц сульфидов серебра, кадмия и цинка. Физико-химические свойства. Создание полимерных нанокомпозитов. Вопросы материаловедения. 2019; (1(97)):110–119.

ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТА МЕТАНОЛДЕГИДРОГЕНАЗЫ МЕТИЛОБАКТЕРИЙ В БИОЭЛЕКТРОКАТАЛИЗЕ

Т.А. Карасева

Тульский государственный университет, Тула, Россия

Метанолдегидрогеназа (МДГ) является основным ферментом первичного C_1 -метаболизма метиловых бактерий. Этот фермент катализирует окисление метанола до формальдегида, передавая электроны *in vivo* природному акцептору электронов – цитохрому c_L . Известно, что *in vitro* в присутствии феназинметосульфата (ФМС) или феназинэтосульфата МДГ способна проявлять активность с искусственными акцепторами электронов, получающими электроны от восстановленного фермента, такими как: 2,6 – дихлорфенолиндифенол (ДХФИФ), 1,6 – дихлорфенолиндифенол, голубой Вюрстера и др. [1]. Для характеристики свойств и описания кинетических параметров МДГ *in vitro* классическим является спектрофотометрический метод, описанный Энтони и Затманом, где в качестве красителей используют систему акцепторов электронов ДХФИФ и ФМС [2]. Эти данные являются основополагающими для применения МДГ в биоэлектрокатализе в качестве основы электрохимических биосенсоров и биотопливных элементов (БТЭ). Так, на основе МДГ *Methylobacterium extorquens* разработан биотопливный элемент для определения концентрации первичных спиртов. Наилучшие результаты были получены при использовании в качестве акцептора электронов N, N, N', N'-тетраметил-4-полифенилдиамина [3]. В другой работе иммобилизованную на поверхности угольно – пастового электрода МДГ *Methylobacterium extorquens* AM1 применяли для амперометрической детекции аммония в присутствии. Электрод многократно использовали при комнатной температуре в течение 15 дней, и он сохранил 50 % своей исходной активности ФМС [4]. В похожем исследовании фермент иммобилизовали на поверхности стеклоуглеродного электрода для амперометрической детекции метанола. Показано, что эффективными медиаторами могут служить N, N-диметил-п-фенилендиамин, N, N, N', N'-тетраметил-4-полифенилдиамина и ферроцена. Однако только в присутствии последнего сенсор давал стабильный ответ на метанол [5]. В работе [6] МДГ *Methylobacterium nodulans* иммобилизовали на поверхности графито-пастового электрода для определения концентрации метанола амперометрическим методом в присутствии медиатора электронного транспорта – ферроцена. Показано, что внесение гидроксиапатита в графитовую пасту повышало чувствительность и операционную стабильность МДГ-биосенсора. Электрохимическое окисление метанола и формальдегида под действием Eu^{3+} -МДГ метанотрофа *Methylophilum fumariolicum* SolV, с собственным цитохромным акцептором электронов c_{GL} , изучали в работе [7]. Фермент был соадсорбирован биополимером хитозана на электрод, модифицированный монослоем меркаптоундеканола. Изучение электрохимии, показало аналогичные биокаталитические свойства фермента, что и полученные в присутствии искусственной медиаторной пары ФМС/ДХФИФ. Вышеописанные примеры свидетельствуют о перспективности применения МДГ в качестве биокатализатора в биосенсорах и БТЭ в присутствии различных медиаторов электронного транспорта, причем как искусственных, так и природных. Следует отметить, что в описанных работах использовали только нативные МДГ.

Для получения нативной МДГ обычно используют хроматографические методы, включающие, как правило, от 2-х до 5 последовательных стадий, что снижает выход белка и увеличивает временные затраты на его получение. В большинстве известных работ [8–12] очистка фермента состоит из 2–3 хроматографических стадий с выходом от 17 до 29 %. Исключение составляет работа [13], в которой описана одностадийная очистка фермента посредством катионообменной хроматографии с последующей ультрафильтрацией, что способствует значительному увеличению выхода продукта до 67 %. Таким образом, для увеличения выхода и уменьшения длительности получения искомого фермента следует применять меньшее количество стадий при его очистке. Это возможно в случае применения метода одностадийной очистки рекомбинантной МДГ с помощью Ni^{2+} -NTA хроматографии.

В данной работе предлагается использование рекомбинантного штамма метиловых бактерий, сконструированного на основе дикого штамма *Methylobacterium extorquens* AM1, для одностадийной очистки МДГ и ее последующего применения в качестве основы амперометрического медиаторного биосенсора.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта государственного задания МИНОБРНАУКИ (FEWG-2020–0008 «Направленное формирование нано/био интерфейсов с переносом заряда в биоэлектрoхимических системах»).

Литература

1. Understanding the chemistry of the artificial electron acceptors PES, PMS, DCPIP and Wurster's Blue in methanol dehydrogenase assays / B. Jahn, N.S.W. Jonasson, H. Hu [et al] // J Biol Inorg Chem. 2020. V. 25. № 2. P. 199–212.
2. Anthony C., Zatman L.J. The microbial oxidation of methanol // Biochem. J. 1964. V.92. P.614–621.
3. Bioelectrochemical fuel cell and sensor based on a quinoprotein, alcohol dehydrogenase / G. Davis, [et al] // Enzyme Microb. Technol. 1983. V. 5. P. 383–388.
4. Mediated amperometric determination of ammonia with a methanol dehydrogenase from *Pseudomonas* sp. AM 1 immobilized carbon paste electrode / S. Suye [et al] // Biosens. Bioelectron. 1996. V. 5. P. 529–534.
5. Liu, Q.F., Kirchhoff J.R. Amperometric detection of methanol with a methanol dehydrogenase modified electrode sensor // Journal of Electroanalytical Chemistry. 2007. V. 601(1–2). P. 125–131.
6. Свойства модифицированных амперометрических биосенсоров на основе метанолдегидрогеназы и клеток *Methylobacterium nodulans* / Кузнецова Т.А., Бесчастный А.П., Алферов С.В. [и др.] // Прикл. биохим. микробиол. 2013. Т. 49. № 6. С. 613–618.
7. Electrocatalysis of a Europium-Dependent Bacterial Methanol Dehydrogenase with Its Physiological Electron-Acceptor Cytochrome cGJ / P. Kalimuthu [et al] // Chemistry. 2019. V. 25(37). P. 8760–8768.
8. Purification and properties of methanol dehydrogenase from *Methylosinus* sp. WI 14 / S. Grosse [et al] // J. Basic Microbiol. 1998. V. 38. № 3. P. 189–196.
9. Purification and properties of methanol dehydrogenase from *Methylocystis* sp. GB 25 / S. Grosse [et al] // J. Basic Microbiol. 1997. P. 269–279.
10. Kim, H.G., Kim S.W. Purification and characterization of a methanol dehydrogenase derived from *Methylomicrobium* sp. HG 1 cultivated using a compulsory circulation diffusion system // Biotechnology and bioprocess engineering. 2006. V.11. P. 134–139.
11. Очистка и свойства метанолдегидрогеназы ризосферного фитосимбионта *Methylobacterium nodulans* / Т.А. Кузнецова [и др.] // Прикл. биохим. микробиол. 2012. Т. 48. № 6. С. 606–611.
12. Kim, H.G., et al., Comparative analysis of two types of methanol dehydrogenase from *Methylophaga aminisulfidivorans* MPT grown on methanol. J Basic Microbiol, 2012. 52(2): p. 141–9.
13. A rapid method for the purification of methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* / Q. Liu [et al] // Protein Expr Purif. 2006. V. 46(2). P. 316–20.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА АКТИВНОСТЬ РАБОТЫ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ФЕРМЕНТНЫХ ЭЛЕКТРОДОВ

Н.В. Лакина¹, В.Ю. Долуда¹, В.Г. Матвеева¹, А.И. Сидоров¹, Г.Ю. Рабинович²¹ Тверской государственный университет, Тверь, Россия² Всероссийский НИИ мелиорированных земель, Тверь, Россия

Актуальность исследований биотопливных элементов на основе ферментных электродов в реакционном растворе глюкозы связывают с поиском альтернативы «зеленому» источнику топлива, который является экономически эффективным и может удовлетворить растущие глобальные потребности в энергии. Глюкозный биотопливный элемент, делает ферментативные биотопливные элементы на основе глюкозы «зеленой» альтернативой обычным топливным элементам для выработки энергии с высокой конверсией и эффективностью при температуре окружающей среды и нейтральной pH. Для улучшения электрических свойств ферментативного биотопливного элемента необходимо повышение активности биокатализатора на электродах.

Целью данной работы явился поиск оптимальных условий работы ферментных электродов на основе окислительно-восстановительных ферментов, иммобилизованных в полимерные матрицы поливинилпирролидона с помощью последовательного нанесения модифицирующих агентов хитозана (Chit) и glutaraldehyde (GA) и комплекса окислительно-восстановительных ферментов глюкооксидазы (GOx) и пероксидазы (HRP) (ПВП/Chit/GA/GOx/HRP). Полученные результаты представлены на рисунках 1, 2.

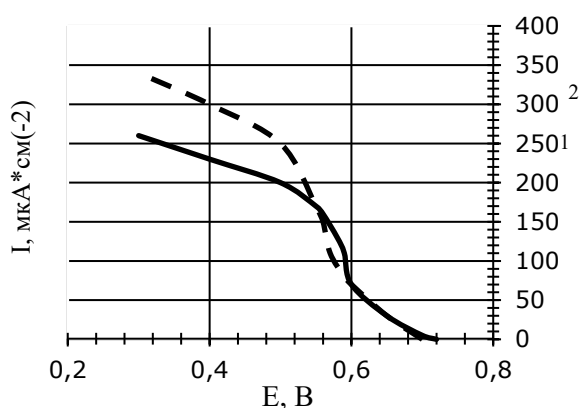


Рисунок 1. Поляризационные кривые восстановления кислорода на графитовом электроде, модифицированном комплексом GOX/HRP иммобилизованном на ПВП (1) и на ПВП/Chit/GA/GOx/HRP (2)

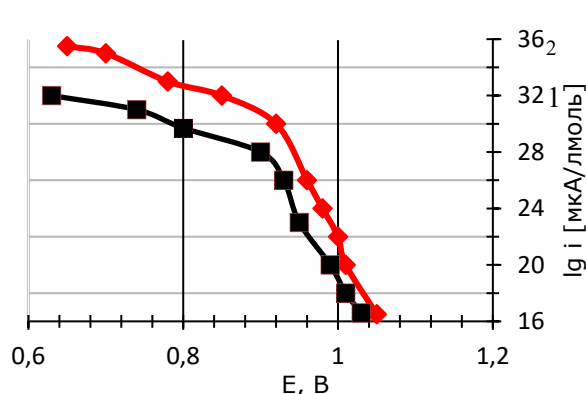


Рисунок 2. Тафелевские зависимости, полученные на композитах: ПВП/GOX/HRP – электрод 1; ПВП/Chit/GA/GOx/HRP – электрод 2

Форма кривой 2 (рис. 1.) подобна по форме поляризационной кривой, полученной на электроде с ПВП/GOX/HRP в отсутствии модифицирующих агентов (рис. 1, кривая 1). Видно, что на электроде с композитом ПВП/Chit/GA/GOx/HRP наблюдаются более высокие значения тока восстановления кислорода во всей исследованной области потенциалов. Поляризационные кривые в тафелевских координатах аналогичны для всех электродов с иммобилизованной биополимерной композицией GOX/HRP: наблюдаются наклоны 0.03, 0.06 и 0.12 В и выход на предельный ток (рис. 2). Таким образом, в ходе работы были получены данные, подтверждающие эффективность ковалентной иммобилизации ферментов в полимерную матрицу с целью усиления аналитического отклика электрохимической реакции окисления D-глюкозы для улучшения работы ферментных электродов.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-08-00186).

УДК 579.695; 546.85; 502.55; 661.63

**ДЕТОКСИКАЦИЯ СОЕДИНЕНИЙ ФОСФОРА, И ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИЙ ЕЁ
МИКРООРГАНИЗМ****А.З. Миндубаев¹, Э.В. Бабынин³, Е.К. Бадеева², Й.А. Акосах³**¹Институт энергетики и перспективных технологий ФИЦ Казанского научного центра РАН, Казань, Россия²Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН, Казань, Россия³Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Нами выделена и изучена культура *Aspergillus niger*, превращающая ряд токсичных соединений фосфора в фосфат, безвредный для окружающей среды. Предлагаемый нами метод позволит производить очистку сточных вод предприятий и загрязненных территорий. Нам удалось подвергнуть биологической деструкции токсичные неорганические вещества – белый и красный фосфор, ряд солей кислот восстановленного фосфора. Биodeградацию элементного фосфора мы наблюдали впервые в мире.

При воздействии белого фосфора наблюдается изменение толщины клеточной стенки. Также значительно увеличивается число митохондрий в клетках гиф [1]. Кроме, того, на поверхности клеточной стенки появляется дополнительный волокнистый слой, состоящий из протеогликанов – поверхность гифов становится ворсистой, чего не наблюдается в контроле. Данные признаки наверняка связаны с защитой от внешних воздействий – клеточная стенка служит барьером, а митохондрии осуществляют энергетический обмен, поддерживают метаболическую активность.

Исследования протеома, описанные в работе [2], продемонстрировали четкие различия белкового профиля при росте аспергилла в отсутствии и в присутствии белого фосфора (рис. 4). Белковый профиль в свою очередь определяется экспрессией генов, следовательно, есть основания говорить об ответе на загрязнение белым фосфором на этом уровне.

Эволюционная история выделенного из технического белого фосфора штамма *Aspergillus niger* воспроизведена с построением филогенетического дерева [3]. Результаты филогенетического анализа *A. niger* AM1 показали, что в наибольшем родстве с ним состоят штаммы из Китая, которые способны к растворению фосфатных минералов [4]. Они имеют 64 % сходства по гену ITS. Таким образом, можно предполагать, что штамм AM1 относится к кластеру, эволюционно возникшему на территории Китая и специализировавшемуся на биодеструкции фосфорных соединений. Возможно, белый фосфор, из которого он выделен, был доставлен в нашу страну из Китая, и штамм завезен вместе с ним.

Литература

1. Миндубаев А.З., Федосимова С.В., Григорьева Т.В., Романова В.А., Бабаев В.М., Бузюрова Д.Н., Бабынин Э.В., Бадеева Е.К., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Акосах Й.А., Караева Ю.В. Влияние белого фосфора на клеточную морфологию и белковый профиль штаммов гриба *Aspergillus niger* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т.11. № 1. С. 69–79.
4. Mindubaev A.Z., Kuznetsova S.V., Evtyugin V.G., Daminova A.G., Grigoryeva T.V., Romanova Y.D., Romanova V.A., Babaev V.M., Buzyurova D.N., Babynin E.V., Badeeva E.K., Minzanova S.T., Mironova L.G. Effect of White Phosphorus on the Survival, Cellular Morphology, and Proteome of *Aspergillus niger* // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2020. Vol.56. No.2. P.194–201.
2. Миндубаев А.З., Бабынин Э.В., Даминова А.Г., Бадеева Е.К., Горбачук Е.В., Низамов И.С., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Акосах Й.А. Влияние белого фосфора на жизнеспособность *Aspergillus niger* AM1 и AM2. Происхождение данных штаммов // Бултеровские сообщения. 2021. Т. 65. № 3. С. 25–48.
3. Li Zh., Bai T., Dai L., Wang F., Tao J., Meng Sh., Hu Y., Wang Sh., Hu Sh. A study of organic acid production in contrasts between two phosphate solubilizing fungi: *Penicillium oxalicum* and *Aspergillus niger* // Sci. Rep. 2016. Vol.6. No.25313. P.1–8.

ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ В ПРОГАМНОЙ ФАЗЕ ОПЛОДОТВОРЕНИЯ У ПЕТУНИИ (*PETUNIA HYBRIDA*)

Ю.В. Минкина

Обнинский институт атомной энергетики – филиал Национального исследовательского национального университета МИФИ, г. Обнинск, Россия

Участие флавоноидов (Фл) в репродуктивном процессе у растений неоднократно обнаруживалось во многих исследованиях [1, 2]. В данной работе получены данные о динамике содержания Фл в спорофитных тканях пыльника, в тесном взаимодействии с которыми происходит развитие мужского гаметофита, в прорастающей *in vitro* пыльце и в системе *in vivo* пыльца–пестик петунии двух клонов (самосовместимого и самонесовместимого).

Формирование пыльцевых зерен самосовместимого и самонесовместимого клонов сопровождалось постепенным увеличением содержания Фл в развивающихся пыльниках (рис. 1). Зрелая пыльца содержала 20 мг Фл/г сырой массы. Зрелый мужской гаметофит (пыльца) и неопыленные пестики различались по уровню Фл: по сравнению с мужским гаметофитом спорофитные ткани пестика характеризовались в 10 раз более низким содержанием Фл (рис. 1). В прорастающих *in vitro* мужских гаметофитах обоих клонов отмечено повышение Фл в течение первого часа прорастания (рис. 1). Пыльцевые трубки культивировали в термостатированных условиях при 25–26°C на среде, содержащей 15 % сахарозы и 0.01 % борной кислоты. Динамика содержания Фл при прорастании пыльцы и росте пыльцевых трубок *in vivo*, в проводниковых тканях пестика, была несколько иной (рис. 1). Прорастание мужского гаметофита на воспринимающей поверхности рыльца в течение 1–2 ч, так же как и *in vitro*, сопровождалось постепенным повышением уровня Фл. Однако дальнейший рост пыльцевых трубок в тканях рыльца (от 2 до 4 ч после опыления), а затем и в тканях столбика (от 4 до 8 ч после опыления) проходил при сохранении мало меняющегося уровня Фл. Характер изменений уровня Фл в системе пыльца–пестик после самосовместимого опыления в целом оказался сходен с таковым после самонесовместимого опыления, однако их содержание после совместимого опыления было несколько выше (рис. 1).

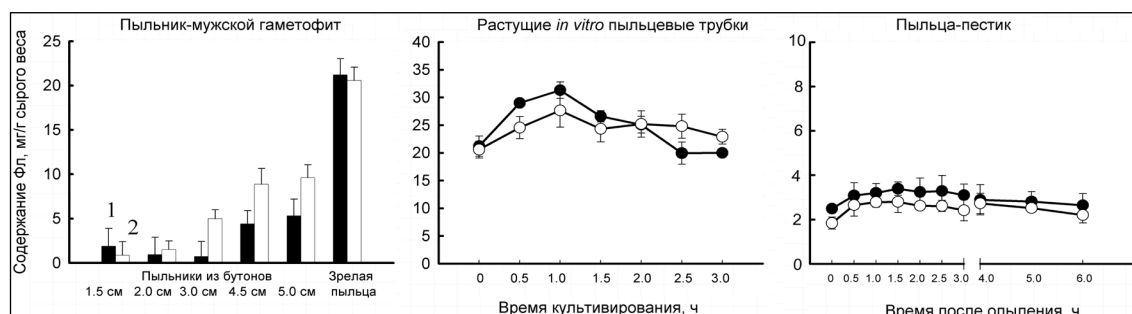


Рис. 1. Содержание Фл в развивающихся пыльниках, растущих *in vitro* пыльцевых трубках и системе пыльца–пестик петунии двух клонов.

Приведены средние арифметические и их стандартные ошибки из 3–5 независимых опытов, каждый из которых проведен в 2-кратной биологической повторности 1 – самосовместимый, 2 – самонесовместимый клон

Литература

1. Guyon V.N., Astwood J.D., Garner E.C., Dunker A.K., Taylor L.P. Isolation and characterization of cDNAs expressed in the early stages of flavonol-induced pollen germination in *Petunia* // Plant Physiol. 2000. V. 123. P. 699–710.
2. Miller K.D., Guyon V., Evans J.N.S., Shuttleworth A., Taylor L.P. Purification, cloning, and heterologous expression of a catalytically efficient flavonol 3-O-galactosyltransferase expressed in the male gameto-phyte of *Petunia hybrida* // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 34 011 – 34 019.

Секция 4. Биоинформатика и IT

МУЛЬТИГЕННЫЙ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КАРОТИНОСОДЕРЖАЩЕЙ МИКРОВОДОРОСЛИ *D. SALINA*

А.О. Лантушенко¹, Я.В. Мегер¹, В.Е. Шаповалова¹, И.В. Дегтяр¹, А.Б. Боровков²

¹ Севастопольский государственный университет, Севастополь

² Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН, Севастополь

Dunaliella salina – микроскопическая водоросль, в массовом количестве вызывающая красное «цветение», особенно яркое в период летнего испарения воды из гиперсоленых озер, и широко распространенная в гипергалинных озерах степного Крыма. *Dunaliella salina* известна своими антиоксидантными свойствами, благодаря способности к выработке β-каротина в больших количествах, который широко используется в производстве косметики, пищевой продукции и биологически активных добавок. Существовать в условиях высокой солености этим водорослям позволяет высокая концентрация β-каротина и глицерола, выполняющих протекторные функции. Высокое накопление этих биологически активных веществ обуславливает перспективность использования *D. salina* в биотехнологии [1].

Важной особенностью *Dunaliella* является отсутствие жесткой клеточной стенки и наличие пластичной клеточной мембраны, способной быстро менять форму в ответ на изменение внешних условий. Это обуславливает сильные колебания размеров клеток, что не позволяет морфометрически определить видопринадлежность с достаточной степенью достоверности.

Поэтому в настоящее время для идентификации и дифференциации морфологически пластичных организмов используется молекулярная таксономия. Для изучения рода *Dunaliella* используется несколько молекулярных маркеров [2]: ген 18S рРНК, внутренняя транскрибируемая область (ITS) и большая субъединица гена рибулозо-бисфосфаткарбоксилазы (RbcL) и общепринятым является использование комплексного подхода, заключающегося в совместном рассмотрении морфологических, физиологических и молекулярно-генетических характеристик.

В данной работе проведен мультигенный филогенетический анализ культуры микроводоросли *Dunaliella salina* штамм IBSS-2 из ЦКП "Коллекция гидробионтов Мирового океана" ФИЦ ИнБЮМ с использованием последовательностей генов 18S рРНК, ITS и rbcL.

Исследования проводились в ЦКП «Молекулярная структура вещества» СевГУ. Секвенирование молекулярных фрагментов осуществлялось на секвенаторе НАНОФОР-05 (Синтол, Россия).

Амплификация рибосомального гена 18S рРНК из изолята *Dunaliella* в настоящем исследовании дала ПЦР-продукты размером около 1800 bp. Ранее было установлено [2], что различные известные виды *Dunaliella* имеют ПЦР продукты разной длины, и их размер позволяет отличить, в частности, *D. tertiolecta* и *D. salina*.

Филогенетический анализ проводили в программе MEGA-X и MrBayes. Для реконструкции филогенетического дерева применяли методы максимального правдоподобия и Байеса. Достоверность установленной топологии проверяли при помощи bootstrap-анализа (1 000 итераций).

Самый высокий уровень гетерогенности был получен в результате филогенетического анализа с использованием ITS последовательности. Комплексное рассмотрение морфологических, физиологических и молекулярно-генетических характеристик позволяет отнести исследованный штамм к виду *Dunaliella salina*.

Работа выполнена в рамках внутреннего гранта СевГУ на 2021 г., идентификатор 30/06–31 и темы № 121030300149–0 ФИЦ ИнБЮМ «Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса»

Литература

1. Боровков А.Б. Зеленая микроводоросль *Dunaliella salina* Teod. (обзор) // Экология моря. – 2005. Т. 67. – С. 5–17.
2. Preetha, K., John, L., Subin, C.S., Vijayan, K.K., 2012. Phenotypic and genetic characterization of *Dunaliella* (Chlorophyta) from Indian salinas and their diversity. *Aquat. Biosyst.* 8, 27. <https://doi.org/10.1186/2046-9063-8-27>.

УДК 640

ПРОФИЛИРОВАНИЕ ЕДИНИЧНЫХ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ КАРОТИДНОЙ ПАРААНГЛИОМЕ**А.В. Снежкина¹, В.С. Павлов¹, Д.В. Калинин², Г.С. Краснов¹, А.В. Кудрявцева¹**¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия² Институт хирургии им. А.В. Вишневского Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Каротидные параанглиомы (КПА) – это редкие нейроэндокринные опухоли, развивающиеся в области бифуркации сонной артерии. КПА характеризуются низким уровнем злокачественности (4–6 %), однако все параанглиомы обладают метастатическим потенциалом. Злокачественные ПА часто связаны с наследственными мутациями в гене-супрессоре опухоли SDHB. Мутация зародышевой линии в гене-супрессоре опухоли является фактором, предрасполагающим к заболеванию, которое требует соматического события – потери гетерозиготности (LOH) в качестве «второго удара», ведущего к потере аллеля дикого типа и развитию опухоли.

Нами проведено исследование хромосомных нарушений у пациента со злокачественной КПА, имеющего герминальную патогенную мутацию в гене SDHB. Выполнен сравнительный анализ частоты альтернативного аллеля (VAF) в паре «опухоль vs норма». Из списка единичных нуклеотидных полиморфизмов (SNPs), полученных при анализе экзозом (всего 57.907 SNPs), выбраны SNPs соответствующие следующим параметрам: 1) общая длина секвенированной последовательности составляла > 25 для образца опухоли и нормы (40.016 SNPs), 2) VAF варьировал от 0.35 до 0.65 (22.425 SNPs), 3) SNPs были аннотированы в dbSNP v. 150 (21.871 SNPs). Затем для SNPs, прошедших все фильтры, проведено сравнение значений VAF между образцами опухоли и нормы с использованием точного теста Фишера. Отличие опухоли от нормы между значениями VAF > 0.2 or < -0.2 при $p < 0.05$ считалось значимым. В результате, для каждой хромосомы сформировано значение VAF для опухоли и нормы. На рисунке 1 представлено VAF для каждого SNPs для хромосомы 1 и 2 в исследуемых образцах опухоли и нормы. Отклонение VAF от значения 0.5 маркирует делецию короткого плеча хромосомы 1 и потерю гетерозиготности в области локализации гена SDHB [1p36.13].

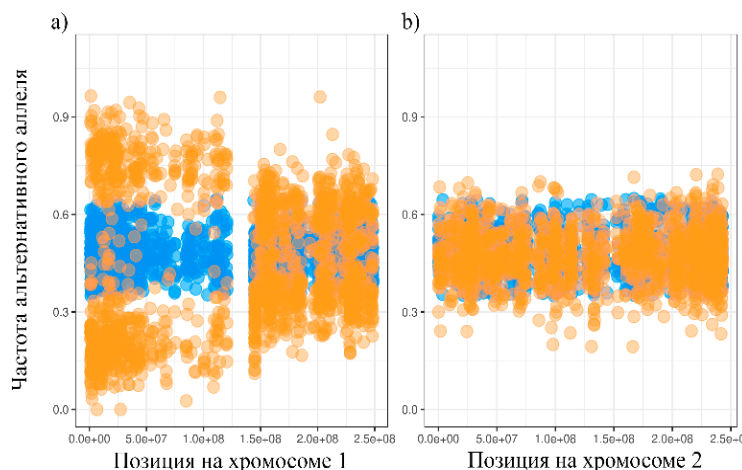


Рис. 1. Значение VAF для каждого SNPs на хромосоме 1 и 2. а) делеция короткого плеча хромосомы 1, б) хромосома 2 без аллельных нарушений. Синим обозначены SNVs нормы, оранжевым – SNVs опухоли. Источник: составлено авторами

Таким образом, у исследуемого пациента с герминальной мутацией в гене SDHB подтверждена потеря аллели дикого типа, что согласуется с классическим механизмом инактивации генов-супрессоров опухоли. Используемый нами метод может быть предложен для оценки гетерозиготности на основе данных высокопроизводительного секвенирования.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21–14–00353). Работа выполнена на оборудовании ЦКП “Геном” ИМБ РАН (http://www.eimb.ru/rus/ckp/ccu_genome_c.php).

**СЕРИНОВЫЕ ПЕПТИДАЗЫ СЕМЕЙСТВА S1 В ГЕНОМАХ И ТРАНСКРИПТОМАХ
ТЕНЕБРИОНИД – ВРЕДИТЕЛЕЙ ЗАПАСОВ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР**

Н.И. Жиганов¹, В.Ф. Тереженкова¹, Ali Reza Bandani², И.Ю. Филиппова¹, Е.Н. Элпидина³

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² University of Tehran, College of Agriculture and Natural Resources, Tehran, Iran

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Москва, Россия

Жуки из семейства Tenebrionidae, включая *Tenebrio molitor* и *Tribolium castaneum*, являются важными вредителями запасов зерновых культур и продуктов их переработки в хранилищах и на складах. Личинки жуков обладают мощным ферментативным аппаратом и активно употребляют в пищу преимущественно муку семян пшеницы, овса и других злаковых культур, которую человечество способно переваривать только в процессированном виде, да и то у 1–2 % населения продукты из пшеницы, ржи и ячменя вызывают наследственное заболевание целиакию в связи с мальабсорбцией продуктов их переваривания. Одной из 2-х важнейших групп пищеварительных пептидаз у жуков являются сериновые пептидазы семейства химотрипсина S1. Целью нашей работы явилась аннотация и сравнительная характеристика набора транскриптов и предсказанных белковых последовательностей этих сериновых пептидаз в объединенном транскриптоме *T. molitor*, так как геном этого жука ещё не расшифрован, и в геноме и транскриптоме *T. castaneum*. Всего у *T. molitor* было выявлено 237 последовательностей предсказанных сериновых пептидаз, из которых 127 оказались активными пептидазами с канонической триадой аминокислот активного центра HDS, а 110 представляли гомологов сериновых пептидаз с 1 или 2 заменами в каталитической триаде, что обычно приводит к потере каталитической активности. У *T. castaneum* было найдено 102 последовательности активных сериновых пептидаз и 58 гомологов. Анализ подцентра связывания субстрата S1, определяющего специфичность этого семейства пептидаз, в котором выделяют 3 важнейших аминокислотных остатка, позволил выявить основные виды активных сериновых пептидаз. Самой многочисленной группой у обоих видов оказались трипсины, которых было выявлено 58 у *T. molitor* и 44 у *T. castaneum*. У большинства из них в составе пропептида были выявлены различные регуляторные домены (у 38 из 58 у *T. molitor*), однако трипсины, которые имели максимальные уровни экспрессии мРНК в кишечнике личинок обоих насекомых и предположительно выполняющие пищеварительные функции, не имели регуляторных доменов. Выделена также небольшая группа трипсиноподобных пептидаз с заменой G на A в составе субстрат-связывающего центра: 5 у *T. molitor* и 7 у *T. castaneum*. Следующей группой явились химотрипсины и химотрипсиноподобные пептидазы, которых найдено 5 и 16, соответственно у *T. molitor* и 5 и 11 у *T. castaneum*. Регуляторные домены у этой группы пептидаз малочисленны, а субстрат-связывающие сайты обладали значительным разнообразием. Следующей по численности группой явились эластазоподобные сериновые пептидазы: 14 у *T. molitor* и 5 у *T. castaneum*. Здесь были выявлены единичные регуляторные домены и существенное разнообразие в структуре субстрат-связывающих сайтов. Наиболее малочисленной оказалась группа сериновых коллагеназ: 5 у *T. molitor* и 4 у *T. castaneum*. Регуляторные домены у них отсутствовали, а состав субсайта связывания консервативен – GGD. И кроме того, была выделена группа неаннотированных сериновых пептидаз с неканоническим субсайтом связывания субстрата. В неё вошли 24 пептидазы у *T. molitor* и 26 у *T. castaneum*. В её составе довольно много пептидаз с регуляторным доменом. Отметим, что во всех группах присутствовали пептидазы с высоким уровнем экспрессии в кишечнике личинок тенебрионид и не содержащие в структуре регуляторных доменов. Именно эти пептидазы предположительно являются пищеварительными.

Таким образом, спектр пищеварительных пептидаз тенебрионид обладает высоким разнообразием и это способствует их устойчивости к действию белковых ингибиторов, входящих в их диету.

Работа поддержана грантом РФФИ № 20–54–56044 Иран_m.

УДК 616–006.61–07:575.112

ОСОБЕННОСТИ ИНТЕРАКТОМА МЕЖГЕННЫХ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ ПРИ РАКЕ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА**А.А. Демидова¹, В.П. Омельченко², Г.В. Антоненко¹, В.А. Лысенко¹, А.С. Мелихов¹**¹ Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия² Донской государственный технический университет, Ростов-на-Дону, Россия

Анализ межгенных и белок-белковых взаимоотношений, сигнальных путей при различной патологии может осуществляться с помощью современных информационных технологий. Для российских ученых при изучении межбелковых связей и сигнальных путей доступны информационные возможности автоматизированного анализа, разработанные компаниями GeneGo (США), Ariadne Genomics (США), Biobase (Германия), Biomax (Германия), Algodign, (США) и другие. Применение биоинформационных и когнитивных технологий хотя и требует развития у специалистов системного мышления, информационной культуры, универсальных знаний, понимания технологических достижений, но предоставляет актуальную ценную информацию и позволяет разрабатывать эффективные таргетные лекарственные пути воздействия на патогенетические звенья заболевания.

Взаимодействуя друг с другом, гены и их продукты образуют сложные сети взаимодействий внутри клеток – интерактом. Интерактом – это карта биологически значимых молекулярных взаимосвязей. В настоящее время признание получила точка зрения, что связь между интерактомом и фенотипом дает более ценную информацию, чем генотипа и фенотипа, поскольку предполагает разработку лекарственного воздействия на болезнь.

В канцерогенезе злокачественных новообразований ключевым является накопление генетических и эпигенетических изменений в клетках, изменение белкового синтеза и формирование злокачественного фенотипа. В последнее десятилетие была разработана методика выделения функционального интерактома рака, которая интегрирует сведения из баз полногеномных ассоциаций, соматических мутаций и фармакологических мишеней [6].

Целью работы явилось выявить особенности интерактома генов при раке слизистой оболочки полости рта (СОПР).

Анализ дифференциальной экспрессии генов общедоступных наборов данных для плоскоклеточного рака полости рта (GEO accession: GSE156208) проводили с использованием пакета «GEOquery» в среде «R studio». Визуализацию белок-белковых взаимодействий осуществляли с использованием программного обеспечения «Cytoscape» и базы данных «STRING» [5]. Оценку причастности исследуемых генов к сигнальным путям проводили с использованием базы данных «DAVID». Дополнительно значимость изменения экспрессии генов оценивалась с использованием данных проекта «TCGA» [6]. Потенциальные терапевтические агенты, направленные на взаимодействие с белками исследуемых генов выявляли с помощью базы данных «DGIdb» [1].

Проведенный анализ позволил идентифицировать в общей сложности 181 дифференциально-экспрессированных генов (ДЭГ) по сравнению с условно здоровой тканью. Среди общего количества выявленных ДЭГ 95 генов имели повышенную экспрессию, а 86 генов сниженную экспрессию относительно уровня в условно здоровой ткани.

Онтология генов (ГО) в категории биологические процессы (БП) обеспечивает систему для того, чтобы иерархически классифицировать гены или генные продукты к условиям, организованным в структуре графа. Биологические процессы подразумевают описание клеточной или физиологической роли, выполняемой геном, скоординированным с другими генами. Генное обогащение онтологии массива данных микрочипов выявило 20 терминов по критерию «биологические процессы» для ДЭГ с повышенной экспрессией (включая клеточную адгезию), и 14 терминов ГО-БП для ДЭГ с пониженной экспрессией (включая процессы окисления-восстановления).

На основании анализа базы данных STRING, идентифицировано 104 пары белок-белковых взаимодействий среди выявленных ДЭГ. Взаимодействующие компоненты (в данном случае белки) называются узлами (nodes), а взаимодействия между узлами отображаются линиями и называются ребрами (edges). Узлы, к которым сходится много ребер, называются хабами (hubs).

Установлено 14 наиболее плотных узлов со степенью связывания большей или равной 5, включающих ген матричной металлопептидазы 1 (MMP1) (также известную как интерстициальная коллагеназа), семейство которых демонстрируют частую дифференциальную экспрессию при плоскоклеточном раке СОПР и могут выступать потенциальными биомаркерами или мишенями (Bates), кератин 6A (KRT6A) и интерлейкин 8 (IL8, CXCL8). Известно, что сверхэкспрессия CXCL8 усиливает миграцию мононуклеарных клеток, тогда как подавление CXCL8 ингибирует миграцию и инвазию мононуклеаров через базальную мембрану. CXCL8 влияет на множественные процессы, вовлеченные в прогрессирование опухоли и идентифицируется как потенциальная терапевтическая мишень (Christofakis).

С помощью подключаемого модуля MCODE в программном обеспечении Cytoscape выявлены основные модули в белковой сети: модуль 1 (оценка MCODE = 8,6) и модуль 2 (оценка MCODE=3,5). Были проанализированы функции каждого модуля. Анализ обогащения пути показал, что модуль 1 состоит из 42 узлов и 102 ребер, которые в основном связаны с метаболизмом лекарств, в том числе платины. Модуль 2 состоит из 9 узлов и 14 ребер. Принадлежность данного модуля к сигнальным путям характеризуется следующими чертами: отражает метаболизм глутатиона, химический канцерогенез, устойчивость к лекарствам на основе платины, IL-7 сигналинг и сигнальный путь HIF1A. С использованием программного обеспечения cytoHubba, определены десять генов с более высокой степенью связности (хаб-гены): матриксная металлопротеиназа 1 (MMP1, кератин 6A (KRT6A), интерлейкин 8 (CXCL8), малый пролин-богатый пептид 8 (SPRR1B), кератин 16 (KRT16), малый пролин-богатый пептид 1A (SPRR1A), интерлейкин 7 (IL7), гипоксия-индуцированный фактор 1-альфа (HIF1A), интегрин-субъединица 2A (ITGA2), интегрин-субъединица 6A (ITGA6).

Анализ коэкспрессии генов десяти хаб-генов, выполненный базой данных STRING, показал, что эти гены могут активно взаимодействовать друг с другом, образуя два кластера взаимодействий.

Выявленные хаб-гены могут играть важную роль при развитии плоскоклеточного рака СОПР, участвуя в ряде биологических процессов. Среди таковых – интегриновые взаимодействия клеточной поверхности, VEGFR1 сигналинг, сигнальные события, опосредованные протеогликаном и синдеканом, бета-1-интегрин взаимодействия с клеточной поверхностью.

С ориентиром на 5 хаб-генов, были подобраны 23 противоопухолевых препарата для возможного лечения плоскоклеточного рака СОПР. Перспективными мишенями для этих препаратов являлись IL8, HIF1A и MMP1. Следует отметить, что лефлуномид и ацетат медроксипрогестерона воздействуют одновременно на IL8 и MMP1. Медроксипрогестерон снижает уровни MMP1 и IL8 [4], как и в случае с лефлуномидом [3]. Кроме того, ингибирующее воздействие оказывают маримастат, батимастат и приномастат против MMP1 [2]. Против HIF1A прямым ингибитором выступает нитроглицерин по данным исследования My Cancer Genome Clinical Trial.

Идентифицированная сеть межгенных и межбелковых взаимодействий при раке СОПР отмечает большую перспективу MMP1, IL8 и HIF1A как потенциальных мишеней при лечении плоскоклеточного рака данной локализации.

Литература

- Freshour S.L. Integration of the Drug–Gene Interaction Database (DGIdb 4.0) with open crowdsource efforts. *Nucleic acids research*. 2021; 49 (D1): D1144-D1151.
- Heath E.I., Grochow L.B. Clinical potential of matrix metalloprotease inhibitors in cancer therapy. *Drugs*. 2000 May; 59(5): 1043–55.
- Kulich W.C., Mur E., Aglas F., Niksic F., Czerwenka C. Inhibitory effects of leflunomide therapy on the activity of matrixmetalloproteinase-9 and the release of cartilage oligomeric matrix protein in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol*. 2006 Mar-Apr; 24(2): 155–60.
- Lockwood C.J., Paidas M., Krikun G., Koopman L.A. et al. Inflammatory cytokine and thrombin regulation of interleukin-8 and intercellular adhesion molecule-1 expression in first trimester human decidua. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2005 Aug; 90(8): 4710–5.
- Szklarczyk D. STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic acids research*. 2019; 47(D1): D607-D613.
- Tomczak K., Czerwińska P., Wiznerowicz M. The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge. *Contemporary oncology*. 2015; 19(1A): A68.

УДК 575.112

ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ ЯДРЫШЕК НА ОСНОВЕ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ И ФОТОМЕТРИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМПЬЮТЕРНОЙ ТЕХНОЛОГИИ**Б.С. Иолчиев¹, П.М. Кленовицкий¹, И.П. Новгородова¹, Ю.А. Прытков¹, Н.Ф. Хуснетдинова²**¹ ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, Московская область, г.о. Подольск, пос. Дубровицы, Россия² Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина, г. Москва, Россия

Введение. Ядрышко является самым крупным субкомпартоментам ядра высших эукариотов. Это безмембранная структурная единица, функция которой заключается в синтезе рибосомальной РНК (рРНК) и биогенез рибосом [1]. Уровень РНК в ядрышке является одним из основных факторов, влияющих на структуру ядра, так как каркас белков образует РНК ядрышки [2]. Ядрышко является динамической структурой, его активность зависит от биотических и абиотических факторов [3,4]. Оно играет определяющую роль в регуляции генома. В результате ингибирования транскрипции рРНК ее уровень в ядрышке снижается, что приводит к изменению строения и состава ядрышка. Ингибирование транскрипции рРНК приводит к перемещению одних белков к периферии, а других в нуклеоплазму. Белки, которые перемещаются в периферию образуют ядрышковый колпачок. Перемещение белков приводит к изменению состава ядрышка и его архитектуры [5,6]. [7]. Ядрышко является одним из основных факторов, регулирующих жизненный цикл клеток [8,9]. Оно играет большую роль в биогенезе рибонуклеопротеидов, регуляции, активности теломеразы [10,11]. Размеры ядрышка зависят от вида и могут быть меньше 1 мкм и больше 10 мкм, например, размер ядрышка у дрожжей меньше 1 мкм, тогда как у гороха оно больше 10 мкм [12]. Одним из факторов, влияющих на размер ядрышка является интенсивность синтеза рРНК, между этими показателями существует положительная корреляционная взаимосвязь [13]. В клетках в фазе деления увеличивается количество рРНК и ядрышко соответственно в таких клетках увеличивается [14]. Количество ЯОР в интерфазных клетках коррелирует с пролиферативной активностью клеток. Исследования показывают, что в ходе онтогенетического развития организма происходит снижение индекса ЯОР в интерфазных ядрах лимфоцитов в результате уменьшения пролиферативных и метаболических процессов в клетках.

Состояние ядрышкового аппарата является одним из критериев, позволяющих оценить активность клетки при различных физиологических и патологических процессах. Рибосомные гены играют важную роль в процессе адаптации организма к неблагоприятным экологическим условиям. Они предотвращают накопление активного кислорода, выполняя антиоксидантную защиту и препятствуют повреждению ДНК. Кластеры рибосомных генов локализованы в коротких плечах акроцентрических хромосом [15]. Количество формирующих ядрышкообразующие районы (ЯОР) и активные кластеры рибосомных генов (АкРГ) имеют большую вариабельность в зависимости от межклеточных и индивидуальных особенностей. Ядрышко содержит кислые негистоновые белки (C23, B23, UBF и РНК-полимераза), для которых характерно специфичное окрашивание азотнокислым серебром. Эти белки отвечают за активизацию и контроль транскрипции рибосомных генов, локализованных в ЯОР. Связь этих белков с количественными параметрами аргирофильных структур может быть использована для оценки активности рибосомных генов. Интенсивность Ag-окраски, используемой для выявления кислых негистоновых белков ЯОР можно использовать для оценки их активности. Активность ядрышка позволяет проводить оценку доли АкРГ на метафазных хромосомах и служит достаточно стабильным признаком (Grob A, Roussel P, Wright JE, et al. 2009).]. Было показано, что введение двунитевых разрывов в рДНК (с помощью технологий редактирования генома или лазерного микроизлучения) способно приводить к кардинальной перестройке структуры ядра, АТМ-зависимому подавлению транскрипции и активации различных механизмов репарации, что указывает на важную роль рДНК в поддержании структурной целостности генома (McStay B., 2016).

Целью исследования является разработка методов количественной и качественной оценки активности ядрышка с использованием интенсивности окраски аргирофильных областей.

Материалы и методы. Протоколы экспериментов были одобрены Комитетом по уходу и использованию животных Федерального исследовательского центра животноводства им. Л.К. Эрнста в соответствии с руководством Совета по контролю над экспериментами на животных.

Животные. Исследование выполнено на стадах овец и коз. В эксперименте участвовали 2 породы овец: романовская (n=25) и катадин (n=12), и общая численность исследуемых коз составила 32 животных. В группы выходили животные разного возраста и физиологического состояния. Все животные были исследованы ветеринарной службой.

Сбор крови и приготовление слайдов. Кровь у животных брали из вены. Лимфоцитов из крови выделяли с помощью метода седиментации в градиенте плотности фиколл-урографина. В центрифужную пробирку на 1 мл раствора фиколла ($\rho = 1,077$ г./мл) наслоили 1 мл разведенной крови и центрифугировали в течение 45 мин при 3000 об / мин. Слой лимфоцитов осторожно собрали по всей площади сечения пробирки, перенесли в чистую, сухую центрифужную пробирку и разбавили ФСБ в соотношении 1:1. Содержимое пробирки центрифугировали 5 мин при 3000 об /мин. Затем надосадочную жидкость удаляли, а полученный осадок ресуспендировали в ФСБ. Приготавливали мазок, который высушивали при комнатной температуре. Препараты фиксировали метиловым спиртом. Окрашивали.

Микроскопия. Полученные слайды исследовали с использованием микроскопа Nikon Eclipse Ni оборудованного цифровой видеокамерой DS-Qi2. Измерения и обработку полученных изображений проводили с помощью программного обеспечения NIS-Elements BR4.30.

Статистика. Для обработки полученной первичных цифровых материалов было использовано программное обеспечение Microsoft Excel-2010, для статистической обработки использовали пакет программ SPSS v. 23.0.

Результаты. Для идентификации объектов устанавливали следующие параметры учета: площадь и яркость ядер и ядрышек.

Определяли среднюю интенсивность окраски ядрышек и их общую площадь. Для оценки активности клеток использовали следующие показатели: n – количества ядрышек в клетке; $\sum N$ сумма количества ядрышек; S-площадь включений (ядрышка); $\sum S$ -общая площадь всех ядрышек; I_N -интенсивность окраски; I_{aver} . – средняя яркость объекта; A_{NOR} – активность ядрышка.

С помощью программ проводили измерение объектов, полученные первичные данные экспортировали в программу Microsoft Excel-2010 с помощью данной программы общее количество ядрышек и I_{color} – интенсивность окраски которой определяли расчетным методом по формуле: $I_N = 254 - I_{aver}$, показатель 254 соответствует степени плотности окрашивания прозрачного объекта, она равно нулю.

Активность ядрышек определяли по формуле: $A_N = I_N \sum S$.

В исследуемой популяции овец коэффициент вариации число ядрышек составило 43,8 % у коз 40,4 %. Максимальное число ядрышек в клетках составило 5 минимальное 1 (рис 2).

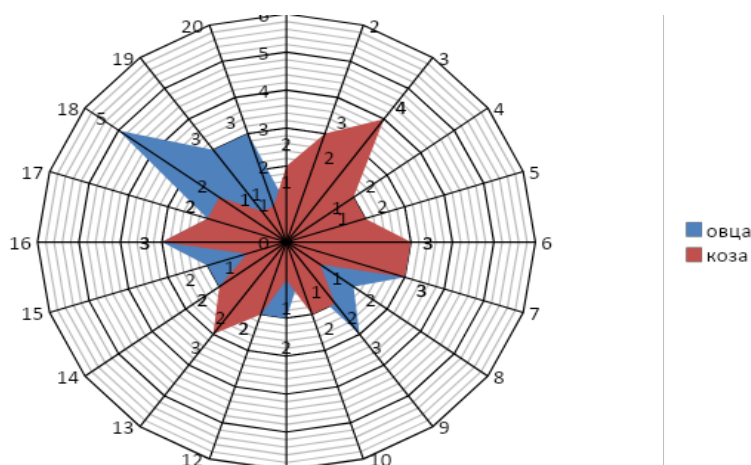


Рис. 2. Распределение частоты ядрышек у разных видов

В исследуемых популяциях, независимо от вида и породы, наиболее часто встречаются клетки с 2 ядрышками. В лимфоцитах исследуемых овец в среднем встречается 2,35 ядрышка у коз данный показатель составил 2,10. Площадь аргирофильных зон имеет высокую вариабельность в одной клетки могут быть ядрышки, размеры которых отличаются в несколько раз. Средняя общая площадь аргирофильных зон в исследуемых клетках в среднем у овец составила $275,66 \pm 27,23$ у коз $228,18 \pm 16,30$. Разница между

видами не имеет статистически значимой разницы. Интенсивность окрашивания, как и другие показатели имеют высокую вариабельность в пределах клетки в зависимости от ядрышек. Разница между видами не является статистически значимой.

Таблица 1. Показатели, характеризующие ядрышки инерфазных клеток у разных видов

Параметры	Виды	
	Овцы	Козы
Количества ядрышек в клетке	2,35 ±0,23	2,10±0,19
Общая площадь всех ядрышек	275,66±27,23	228,18±16,30
Интенсивность окраски ядрышек	155,74±3,11	110,00±2,19
Активность ядрышек организатора	42931±2146	25080±1723

Обсуждение. Результаты данного исследования показывают, что количество ядрышек имеет высокую вариабельность, оно варьирует в одной клетке от одного до пяти. В результате исследования установлено, что размер ядрышка зависит от вида и имеет высокий коэффициент вариации между клетками [12]. Данная гипотеза также была подтверждена в наших исследованиях. Размер ядрышка зависит от интенсивности синтеза рРНК, исследованиями установлено, что между данными показателями имеется положительная взаимосвязь [13, 14]. Результаты исследования, полученные в данном проекте, показывают, что площади и интенсивность окрашивания также имеет высокую вариабельность.

Закключение. Результаты исследования показывает, что площадь ядрышек и интенсивность окрашивание аргирофильных зон между клетками существенно отличается и эти показатели можно использовать для оценки активности ядрышек.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке РФФИ: проект № 20–016–00116А.

Литература

- M. Boisvert, S. van Koningsbruggen and J. Navascués, A.I. Lamond 2007 The multifunctional nucleolus. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8, 574–585.
- B. McStay. 2016. Nucleolar organizer regions: Genomic “dark matter” requiring illumination. Genes Dev. **30**, 1598–1610.
- Yuki Hayashi, Akiko Fujimura and Kazashi Kato, Rina Udagawa, Toru Hirota, Keiji Kimura 2018 Nucleolar integrity during interphase supports faithful Cdk1 activation and mitotic entry Science Advances 4 (6).
- Németh Attila, Längst Gernot 2011 Genome organization in and around the nucleolus. Trends in genetics : TIG. **27**. 149–56. Doi:10.1016/j.tig.2011.01.002.
- X. Yuan, Y. Zhou and E. Casanova, M. Chai, E. Kiss, H. – J. Gröne, G. Schütz, I. Grummt 2005 Genetic inactivation of the transcription factor TIF-IA leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest, and p53-mediated apoptosis. Mol. Cell 19 77–87.
- T. Kuroda et al.2011 RNA content in the nucleolus alters p53 acetylation via MYBBP1A. EMBO J. 30 1054–1066.
- Stępiński D 2014 Functional ultrastructure of the plant nucleolus Protoplasma 251, 1285–1306.
- Miroslav Dundr, Mark O.J. Olson 2017 Partially Processed pre-rRNA Is Preserved in Association with Processing Components in Nucleolus-derived Foci during Mitosis. Molecular Biology of the Cell Vol. 9, No. 9 2337–2698
- Sirri, V., Urcuqui-Inchima, S., Roussel, P. et al. 2008 Nucleolus: the fascinating nuclear body Histochem Cell Biol 129, 13–31.
- Hiscox, J. 2007 RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus. Nat Rev Microbiol 5, 119–127
- Boisvert FM, van Koningsbruggen S, Navascués J, Lamond AI.2007 The multifunctional nucleolus. Nat Rev Mol Cell Biol. 8(7):574–85.
- Peter J Shaw, John WS Brown 2004 Plant nuclear bodies Current Opinion in Plant Biology Volume 7, Issue 6 614–620.
- Tiku, V.; Antebi, A. Nucleolar Function in Lifespan Regulation. Trends Cell Biol. 2018, 28, 662–672.
- Derenzini, M.; Trere, D.; Pession, A.; Montanaro, L.; Sirri, V.; Ochs, R.L. Nucleolar function and size in cancer cells. Am. J. Pathol. 1998, 152, 1291–1297.
- Bilban M, Vaupoti J 2001 Chromosome aberrations study of pupils in high radon level elementary school Health Phys. 80(2):157–163.
- Grob A, Roussel P, Wright JE, et al. 2009 Involvement of SIRT7 in resumption of rDNA transcription at the exit from mitosis. J Cell Sci. 122:489–498.

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ГЕМОДИНАМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ

В.Г. Кориунов, Н.В. Карасенко, К.С. Караханян, Н.Г. Короткиева, И.О. Михальчик

Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия

Федеральный государственный образовательный стандарт высшего образования выдвигает требование формирования у обучающихся компетенции способности использования информационно-коммуникационных технологий в профессиональной деятельности. Компьютерное моделирование является эффективным инструментом в решении этой задачи.

На кафедре медицинской и биологической физики РостГМУ написана программа, позволяющая моделировать гемодинамические параметры системы кровообращения. Студенты изучают характеристики сердечно-сосудистой системы, получают профессиональные знания, приобретают навыки оптимизационного мышления и использования информационных технологий в медицине. Приведены примеры использования математической модели гемодинамики в образовательном процессе.

Информационные технологии в образовательном процессе приводят к стремительной трансформации всей системы высшей школы, появлению современных форм дистанционного и комбинированного обучения. Новые условия пандемии covid-19, вынужденный переход ВУЗов на удаленную форму обучения резко увеличили потребность высшей школы в компьютерных технологиях [1]. Математическое моделирование традиционно является мощным инструментом в образовательном процессе и органично интегрируется в дистанционный и комбинированный форматы обучения.

Компьютерное моделирование позволяет решать многофункциональные образовательные задачи работы с информацией: ее структурирование, визуализацию и графическую интерпретацию.

Обучение студентов-медиков использованию моделей в практике врача является актуальной задачей. Математические модели в современной клинической практике используют для оценки степени тяжести ишемических поражений в сердце, головном мозге, центральной гемодинамической системе, конечностях. Компьютерное моделирование на сегодняшний день используется для подбора эффективных лечебно-профилактических мероприятий, позволяет снизить риск операционного вмешательства при различных ишемических поражениях [2].

Изучение гемодинамических параметров для студентов-медиков носит этапный характер: начинается на первом курсе в рамках дисциплины «Физика, математика» и продолжается в дисциплине «Медицинская информатика» с применением математической гемодинамической модели Отто Франка [3]. В рамках модели артериальная часть большого круга кровообращения заменяется резервуаром с высокой эластичностью стенок, объем резервуара пропорционален давлению и его гидравлическим сопротивлением можно пренебречь; система мелких периферических сосудов моделируется жесткой неэластичной трубкой с большим гидравлическим сопротивлением; гидравлическое сопротивление и эластичность каждой группы сосудов не меняются во времени и в пространстве.

Модель О. Франка может быть описана следующей системой дифференциальных уравнений. Скорость изменения объема эластичного резервуара $\frac{dV}{dt}$ равна разности скорости притока крови из сердца Q_c и скорости оттока в периферические сосуды Q : $\frac{dV}{dt} = Q_c - Q$.

Изменение объема эластичного резервуара прямо пропорционально изменению давления крови dP : $dV = CdP$, где C – эластичность стенок крупных сосудов. Используем закон Пуазейля для стационарного потока жидкости по жесткой трубе: $Q = \frac{P - P_{\text{кон}}}{X}$, где P – давление на входе, $P_{\text{кон}}$ – давление на выходе из жесткой трубки, X – гидравлическое сопротивление периферических сосудов. С учетом 1, 2, 3 получаем уравнение: $\frac{dP}{dt} + \frac{P}{XC} = \frac{Q_c}{C} + \frac{P_{\text{кон}}}{XC}$.

Решение неоднородного дифференциального уравнения (4), связывающего объемную скорость кровотока, давление в крупных сосудах, эластичность и периферическое сопротивление позволяет анализировать гемодинамические параметры в различные фазы сердечного цикла [4].

В модели отдельно выделены три стадии последовательности процесса кровообращения: фаза систолы, диастолы и полного сердечного цикла (Рис. 1). В каждой из стадий вычисляется значение артериального давления в зависимости от времени сердечного цикла (Рис. 2). Все учитываемые в модели параметры могут меняться исследователем. Выбор стадии процесса и задача моделирования выбираются независимо. В каждом случае исследования изучается влияние факторов гидравлического сопротивления периферических сосудов, объемной скорости поступления крови в аорту и эластичности стенок крупных сосудов на давление в аорте.

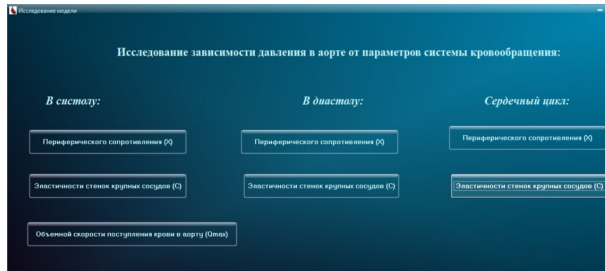


Рис. 1 Интерфейс структуры исследования

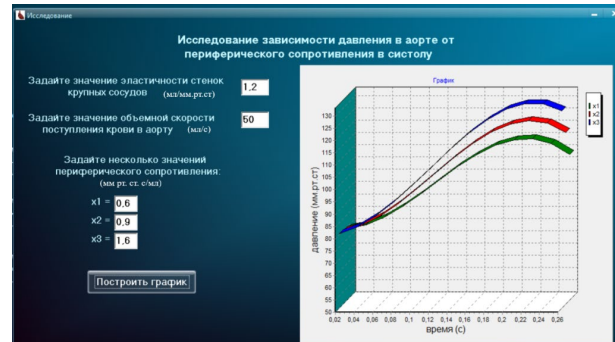


Рис. 2 Исследование зависимости артериального давления от периферического сопротивления в систолу

При изучении влияния конкретного фактора, например, значения гидравлического сопротивления периферических сосудов на давление в фазу систолы, фиксируются значение эластичности стенок крупных сосудов и значение объемной скорости поступления крови в аорту, меняется только изучаемый влияющий фактор (Рис. 2). Кривые изменения давления, соответствующие различным значениям периферического сопротивления представлены разными цветами. Для удобства анализа панель ввода данных и графический результат моделирования располагаются в одном окне. Студенты подбирают значение периферического сопротивления, которое обеспечивает нормальное систолическое давление 120 мм рт. ст.

Аналогично, моделируются и изучаются зависимости от эластичности стенок крупных сосудов и объемной скорости поступления крови в аорту (Рис. 1). Вариации исходно задаваемых параметров системы кровообращения позволяют обучающимся наглядно представлять их влияние на максимальное значение, скорость изменения артериального давления в различные фазы сердечного цикла.

Таким образом, использование компьютерной гемодинамической модели в обучении студентов позволяет решать целый комплекс образовательных задач: приобретение фундаментальных профессиональных знаний, получение навыков оптимизационного мышления, интерпретации графической информации и использования информационных технологий в профессиональной деятельности. Компьютерные математические модели органично вписываются в современные форматы обучения с применением информационных технологий.

Литература

- Карасенко Н.В., Короткиева Н.Г., Караханян К.С., Кижеватова Е.А. Дистанционное преподавание физики и математики в РостГМУ в условиях пандемии // Информатизация образования 2021 [Липецк, 23 – 25 июня 2021]: Сборник материалов Международной научно-практической конференции. Липецк: ЛГТУ. 2021. С. 153–158.
- Быков А.В., Корневский Н.А., Родионова С.Н., Артеменко М.В. Интеллектуальная поддержка выбора схем лечебной стабилизации при смешанном ишемическом поражении // Медицинская техника. 2020. № 4. С. 49–52.
- Омельченко В.П., Демидова А.А. Особенности преподавания медицинской информатики при подготовке медицинских профессиональных кадров // Современные проблемы науки и образования. 2019. № 5. С. 14–15.
- Омельченко В.П., Демидова А.А. Медицинская информатика. Учебник. М. Изд. группа «ГЕОТАР-МЕДИА», 2016. -528 с.

КАРТИРОВАНИЕ ГЕНОМНЫХ СБОРОК АЗИАТСКОЙ ПЧЕЛЫ APIS CERANA

М.Д. Каскинова, Л.Р. Гайфуллина, Е.С. Салтыкова, У.Б. Юнусбаев, А.Г. Николенко

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия

В 2001 году Международный Консорциум по секвенированию опубликовал первую сборку генома человека. Расшифровка генома человека способствовала развитию технологий секвенирования и картирования, что позволило получить геномные сборки для других видов живых организмов, в том числе и для медоносной пчелы (Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006). Последняя сборка генома медоносной пчелы Amel_HAv_3.1 (Wallberg et al. 2019) была собрана на основе нескольких технологий секвенирования и картирования (Illumina, Pacbio, Bionano). Данная сборка представлена на хромосомном уровне и является наиболее полной версией генома медоносной пчелы. В Genebank представлены четыре сборки генома азиатской пчелы Apis cerana (ACSNU-2.0, ASM1110058v1, Apiscer_1.0, ApisCC1.0), сестринского вида A. mellifera. Из них только одна собрана на хромосомном уровне (ASM1110058v1). Нами была поставлена задача перевести оставшиеся сборки на хромосомный уровень и выполнить аннотацию генов.

В качестве референсного генома нами был использован геном медоносной пчелы Amel_HAv_3.1 (https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCF/003/254/395/GCF_003254395.2_Amel_HAv3.1/GCF_003254395.2_Amel_HAv3.1_genomic.fna.gz и https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCF/003/254/395/GCF_003254395.2_Amel_HAv3.1/GCF_003254395.2_Amel_HAv3.1_genomic.gff.gz). В таблице 1 представлены основные характеристики исследуемых сборок. Две сборки A. cerana были собраны на основе длинных прочтений (long reads) PacBio и Oxford Nanopore и представляют наибольший интерес для исследователей.

Таблица 1 Характеристика исследуемых сборок

	Amel_HAv3.1	ACSNU-2.0	Apiscer_1.0	ApisCC1.0	ASM1110058v1
Покрытие	192.0x	152.0x	292x	122.0x	134.0x
Технология секвенирования	PacBio; 10X Chromium; Phase Genomics HiC; Bionano	Illumina HiSeq	Minion nanopore; illumina Hiseq2500	Illumina GAIIx; 454	PacBio Sequel
Метод сборки	FALCON v. 0.5.0; Arcs v. 1.0.1; Links v. 1.8.5; BioNano Solve v. 3.1	AllPaths v. 42411	SPAdе v. 3.10.1; Finishing Module in CLC genomics workbench Genome v. 1.7	Velvet v. 1.2.03	HGAP v. March-2019

Сборки A. cerana были переведены на хромосомный уровень с помощью RaGOO (Alonge et al. 2019). Для аннотации генов использовали Liftoff (Shumate and Salzberg 2020), используя gff файл Amel_HAv_3.1 как референс. В таблице 2 представлены данные по переносу исследуемых сборок генома на хромосомный уровень. В целом, размеры хромосом разных сборок совпадают.

В сборке Amel_HAv_3.1 аннотировано 12332 генов. Мы выполнили перенос этих генов на сборки A. cerana с помощью Liftoff (рис. 1). Самое большое количество генов картировалось на сборку ASM1110058v1, собранную из длинных прочтений PacBio. Park et al. (2015) аннотировали 10651 генов для своей сборки ACSNU-2.0. Тогда как с использованием Amel_HAv_3.1 нами было аннотировано 12089 генов.

Таблица 2 Размеры хромосом в сборках генома Amel_HAv3.1 и Apis cerana

	Amel_HAv3.1	ACSNU-2.0	Apiscer_1.0	ApisCC1.0	ASM1110058v1
Chr1	27754200	30493594	27245775	29586723	26802524
Chr2	16089512	16993187	16631585	16221043	16892262
Chr3	13619445	13698954	14122599	14146147	15590573
Chr4	13404451	13125209	12022470	15077644	15483476
Chr5	13896941	14424151	15114023	14929130	13581003
Chr6	17789102	17345009	16738848	18123026	13422283
Chr7	14198698	13958837	12181940	13796122	13101753
Chr8	12717210	13288447	12123437	12418764	13171213
Chr9	12354651	14328994	10553639	12938676	11764534
Chr10	12360052	11153287	11707081	11820133	11894629
Chr11	16352600	16487584	14253970	16878668	11548277
Chr12	11514234	11749249	10816915	10161981	10523944
Chr13	11279722	11427994	11150747	10986969	10566570
Chr14	10670842	11361364	9899063	12622570	10402947
Chr15	9534514	10259240	9120600	10226317	9174731
Chr16	7238532	7736732	6518383	7009582	7099464

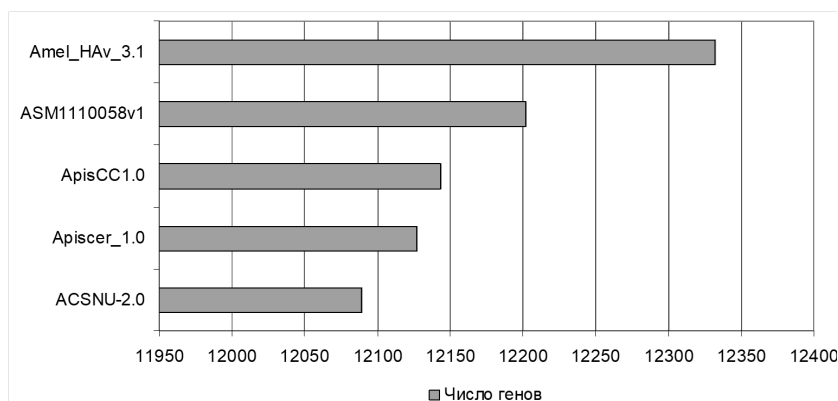


Рисунок 1 Аннотация генов в сборках Apis cerana с помощью Liftoff (Amel_HAv3.1 в качестве референса)

Таким образом, не смотря на то, что эволюционное разделение азиатской *A. cerana* и европейской *A. mellifera* произошло 6–25 млн лет назад (Tihelka et al., 2020), у них выявлено большое количество общих генов. Полученные данные можно использовать для сравнительного анализа генов двух видов Apis и для оценки внутривидового полиморфизма *A. cerana*.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 19–54–70002.

Литература

- Alonge M., Soyk S., Ramakrishnan S., Wang X., Goodwin S. et al. RaGOO: fast and accurate reference-guided scaffolding of draft genomes. *Genome Biol.* 2019. 20: 224.
- Shumate A., Salzberg S.L. Liftoff: accurate mapping of gene annotations. *Bioinformatics.* 2020. 15: btaa1016.
- Wallberg A., Bunikis I., Pettersson O.V., Mosbech M. – B., Childers A.K. et al., A hybrid de novo genome assembly of the honeybee, *Apis mellifera*, with chromosome-length scaffolds. *BMC Genomics.* 2019. 20: 275.
- Honeybee Genome Sequencing Consortium. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature.* 2006. 443: 931–949.
- Tihelka E., Cai C., Pisani D. et al. Mitochondrial genomes illuminate the evolutionary history of the Western honey bee (*Apis mellifera*). *Sci Rep.* 2020. 10: 14515.
- Park D., Jung J.W., Choi B.S. et al. Uncovering the novel characteristics of Asian honey bee, *Apis cerana*, by whole genome sequencing. *BMC Genomics.* 2015. 16: 1.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ПРОФАГОВ В ГЕНОМАХ ШТАММОВ *BACILLUS PUMILUS*

Д.С. Пудова, А.А. Тойменцева, М.Р. Шарипова

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Штамм *B. pumilus* 7P был выделен из почв Республики Татарстан, как продуцент внеклеточной рибонуклеазы. Приобретение штаммом 7P устойчивости к стрептомицину привело к появлению мутантного штамма 3–19 с увеличенной активностью гидролитических ферментов (протеиназ, фосфатазы и рибонуклеазы). На сегодняшний день, упрощение и снижение стоимости промышленного производства ферментов является актуальной задачей для биотехнологии. С целью получения эффективной экспрессии генов ферментов мы планируем провести редактирование геномов *B. pumilus* путем использования метода CRISPR/Cas9. С помощью данной системы появилась возможность удалять специфические последовательности генов с высокой точностью и эффективностью, создавая при этом мутантные штаммы с необходимыми свойствами. При этом одной из проблем данного метода является трансформация природных штаммов. Низкая эффективность трансформации может быть связана с динамической частью бактериального генома. Известно, что многие биотехнологически важные бактериальные культуры инфицированы бактериофагами, которые способны влиять на свойства бактерий. Целью данного исследования являлось идентификация последовательностей профагов в геномах двух штаммов *B. pumilus* 7P и 3–19.

Полногеномное секвенирование двух штаммов проводили на платформах Ion Torrent, 454 GS Junior и Oxford Nanopore MinION, что обеспечило общее покрытие геномов равное 42х. Фильтрацию ридов по качеству проводили с использованием программы Trimmomatic v0.32. Сборку генома проводили с использованием геномного ассемблера SPAdes v. 3.12.0, качество сборки проверяли с помощью программы QUAST v. 2.3. В результате сборки длина геномов штаммов *B. pumilus* 7P и 3–19 составила 3.62 и 3.61 Мб соответственно. Финальные сборки занесены в базу данных NCBI под номерами CP058911.1 для 7P и CP054310.1 для 3–19. Поиск областей профагов в бактериальных геномах проводили с использованием инструментов PHAge Search Tool – Enhanced Release (PHASTER) и PhiSpy со стандартными параметрами анализа. Анализ двух геномов показал отсутствие значительных различий между штаммами. С помощью программы PHASTER в геномах было выявлено наличие пяти профаговых регионов, два из которых (Vp1 и Vp2) были признаны “достоверными”. Наличие последовательностей профагов Vp1 и Vp2 также подтверждены программой PhiSpy. Содержание GC-пар в предсказанных фаговых регионах (<40.0 %) отличалось от GC-состава всего бациллярного генома штаммов равного 41,9 %. Это подтверждает, что данные участки ДНК попали в геном извне, т. е. являются мобильными элементами. Более 50 % белков Vp1 профагового региона сходны с белками умеренного бациллярного фага φ105, который был идентифицирован в геноме *B. subtilis* 168. Известно, что наличие этого профага связано с низкой эффективностью трансформации бактерий *B. subtilis* [1] и репрессией механизма горизонтального переноса генов [2]. Таким образом, присутствие профага Vp1 в геномах штаммов могло повлиять на механизм естественной компетентности бактерий *B. pumilus*.

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета и поддержана грантом РФФИ № 19–08–00853 (А).

Литература

1. Garro, A.J. Relationship Between Lysogeny, Spontaneous Induction, and Transformation Efficiencies in *Bacillus subtilis* / A.J. Garro, M.F. Law // *J. Bacteriol.* – 1974. – V.120. – P.1256–1259.
2. Bose, B. A conserved anti-repressor controls horizontal gene transfer by proteolysis / B. Bose, J.M. Auchtung, C.A. Lee, A.D. Grossman // *Mol. Microbiol.* – 2008. – V.70. – P.570–582.

УДК 519.854

ПРИМЕНЕНИЕ БПЛА ДЛЯ ПОИСКА БРАКОНЬЕРОВ

В.А. Ку-Ян-Шуй¹, Л.А. Коробова¹, И.С. Толстова¹¹ Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Введение. На данный момент Министерство по чрезвычайным ситуациям (МЧС) располагает достаточно большим парком беспилотных летательных аппаратов (БПЛА), которые не всегда эффективно используются при проведении различных работ. Зачастую мониторинг каких-либо территорий ведется в ручном режиме пилотирования, поэтому ни о каком эффективном мониторинге местности речь не идет. Внедрение модифицированной задачи коммивояжера в систему БПЛА при построении полетного плана позволит увеличить эффективность мониторинга местности и сведет к минимуму человеческий фактор ошибок при пилотировании БПЛА.

Рассматривается автономная система поиска браконьеров на базе БПЛА и зарядных станций. Предлагаемая система – это многофункциональная летающая платформа, использующаяся во многих промышленных задачах. Главный плюс этой платформы – сверхточная навигационная система и широкий спектр дополнительного оборудования, которым можно расширять функционал данной платформы и модернизировать его под конкретную задачу. При возникновении опасности, которая может подвергнуть риску жизни людей, требуется незамедлительная реакция. Сейчас для поиска пропавших людей зачастую используются волонтеры, которые в основном задействованы только в дневное время. Повысить эффективность поиска людей позволит использование дронов, оснащенных камерами с тепловым наблюдением, т. е., тепловизорами.

Объекты и методы. Изначально дрон может быть запрограммирован на автономный полет по определенной местности. Программирование дрона осуществляется на базе одноплатного микрокомпьютера Raspberry Pi. Также дроном можно управлять и в ручном режиме с помощью пульта управления [1].

При обнаружении определенной температуры, заданной заранее, у дрона автоматически включается камера, и вся информация, включая данные местоположения, посылается оператору [2]. Если дрон находится в автономном полете, то он автоматически подлетает в источнику излучения тепла. Далее решение следует от оператора. Если дрон обнаружил что-то несущественное, то оператор дает команду далее лететь дрону по изначально выбранному маршруту; а если же нашли того, кого искали, то по данным геолокации дрона, которые передаются оператору.

Преимущества использования данной системы дронов: использование теплового излучения помогает обнаружить людей в темное время суток, а также в условиях плохой видимости; дроны могут использоваться в труднодоступных или опасных для людей местах, тем самым не подвергая опасности жизни людей; дроны имеют «вид сверху», тем самым захватывая большие территории поиска, существенно снижая время поиска; точность обнаружения пропавших людей; маневренность и малый размер дрона позволяют ему работать в местах, которые недоступны для вертолетов; гораздо меньшее число сотрудников.

Однако есть и существенные минусы, которые необходимо учитывать: высокая стоимость покупки и эксплуатации дрона, оснащенного тепловизором; время полета ограничено, которое составляет от 30 до 50 минут; необходимость иметь не один такой дрон; использование дрона с тепловизором серьезно усложняется в лесах. Кроны деревьев и вся лиственность, к сожалению, не прозрачны.

Данная система дронов очень универсальна. Дроны могут осуществлять поиск не только пропавших людей, но и искать браконьеров. Это также довольно актуальная проблема, ведь на сегодняшний день исчезают многие биологические ресурсы. Под этим мы подразумеваем незаконную добычу рыбы и животных. Данная проблема может привести к гибели, сокращению численности, либо же нарушению среды обитания многих животных [3].

По статистике незаконно во внутренних водоемах России только за 2020 год было выловлено около 3.749.726 рыб и убито около 4,5 тыс. животных, поэтому мы решили создать новое инновационное решение, которое позволит также вести и борьбу с браконьерством.

Основной идеей проекта является разработка автономной системы, которая позволит определять нахождение некоторых объектов на определенных территориях (обнаружение людей). Система будет работать на базе квадрокоптеров и зарядных станций.

Помимо этого, система также может быть использована и для решения других задач в зависимости от необходимости, например, контролировать возникновение лесных пожаров, охранять поля и заповедники, осуществлять контроль за горнолыжными курортами, помогать фермерам и строителям [4, 5].

Механизм поиска основан на машинном зрении и автономном полете по GPS-координатам. Для управления и контроля всех параметров системы из любой точки мира используется специально разработанное программное обеспечение, которое работает на базе операционной системы для робототехники ROS посредством языка программирования Python. Данное программное обеспечение дает возможность следить за телеметрией дронов и зарядных станций, просматривать видео с квадрокоптеров, автоматически запускать маршруты полета по заданному времени, настраивать различные блоки и многое другое. Также данная система может работать и самостоятельно, то есть может автоматически контролировать все происходящие процессы: проверять работоспособность системы; составлять отчеты о проделанной работе; управлять запусками дронов, предварительно перед этим проверив информацию о состоянии зарядной станции, на которую летит устройство; контролировать количество коптеров на запланированном маршруте; проверять заряд аккумулятора; анализировать наличие ошибок и работоспособность всех систем квадрокоптера.

При обнаружении системой каких-либо неисправностей, она оповещает оператора об ошибке, а затем пытается её решить. При всем этом вмешательство человека минимально.

Результаты и дискуссия. Для оптимальной работы рекомендуется использовать не менее 2 зарядных станций и 1 дрона. В такой комплектации эффективность работы всей системы будет максимальной, например, для полета вдоль реки от одной станции до другой с целью поиска браконьеров.

Вся группировка дронов и зарядных станций является одним целым, они общаются и передают данные между собой, что практически на 90 % исключает человеческий фактор, так как система всё контролирует и посылает нужные команды на выполнение вместо человека.

Преимущество зарядной станции состоит в том, что она работает от электричества, вырабатываемого солнечными батареями, и располагается она на высоте около 5 метров. Эти технологии позволяют размещать ее в любом месте, не боясь внешних угроз [5, 6].

Разработка автономной системы на базе БПЛА и зарядных станций включает следующие этапы.

Создание эскиза рамы, которая подходит под цели и задачи системы. За ее основу взято два материала: карбон и нейлон. Они обеспечивают высокую прочность и малый вес конструкции. Лучи дрона выполнены из карбоновых трубок диаметром 18 x 16 мм. Расстояние между двигателями составляет 700 мм.

Подбор моторов по всем необходимым характеристикам. Наиболее достойные из всех оказались T-Motor Antigravity 4006 на 380KV. Они обладают сравнительно небольшим весом, малым потреблением электроэнергии, и их средняя тяга составляет больше 1кг на двигатель при токе в 3.7А.

По рекомендации производителя двигателей, принято решение использовать карбоновые пропеллеры T-Motor 16 × 5.4 и регуляторы оборотов T-Motor 40A Air. Данная связка компонентов полностью удовлетворяет всем требованиям.

Обеспечивать питанием дрон будет аккумулятор от фирмы Gens Ace Tattu. Его емкость составляет 16000mAh, а напряжение всех ячеек 22.2V (6S).

В коптере в качестве полетного контроллера используется *pixhawk*. В свою очередь он работает в связке с микрокомпьютером Raspberry Pi 3b+ по средствам протокола MAVLink, для обеспечения связи, управления и контроля БПЛА.

Для получения основного видео с дрона используется камера GoPro HERO 4, с трех осевым подвесом Walkera G-3D Gimbal для стабилизации картинки [6, 7].

Для расширения функционала всей системы и улучшенного поиска браконьеров автономная система оснащена специальным тепловизором.

Контролировать и управлять станцией будет микрокомпьютер Raspberry Pi 3b+. Обеспечивать связь будет 4G LTE модем Huawei E3372h-320 [6, 7].

Для получения электроэнергии использованы две солнечных батареи по 450w SilaSolar PERC и гибридный солнечный инвертор SILA V 1000P. Он дает возможность запасать накопленную энергию в аккумулятор VEKTOR GL на 12v 200A/h и преобразовывать ее в 220v. Данная связка компонентов позволит автономно работать как днем так и ночью.

Для зарядки дрона использовано зарядное устройство SkyRC B6 Nano и блок питания ImaxRC B20 Pro. С их использованием время полного заряда квадрокоптера составит 1 час.

Проект предназначен для государственных и частных природоохранных организаций, например, таких как: Федеральное агентство по рыболовству, Федеральное агентство водных ресурсов, Министерство природных ресурсов и экологии Российской Федерации, Всероссийское общество охраны природы.

Анализ рынка показал, что у разрабатываемой системы есть несколько схожих аналогов, один из них это СОЕХ Пеликан. Его цена составляет около 1000000 руб., в отличие от нашего решения за 400000 руб. Также зарядная станция рассматриваемой системы оборудована солнечными батареями, что делает ее независимой от внешнего питания 220v в отличие от аналога. Представляемая система находится в стадии стартапа.

Таким образом, можно сделать следующие выводы.

Подобраны необходимые компоненты разрабатываемой системы, сделаны расчеты характеристик дрона и зарядной станции.

Произведен анализ имеющихся решений.

Разработана 3D модель дрона и зарядной станции.

Написана большая часть программного кода.

Настроена передача данных с дрона на компьютер через сервер.

В ходе работы над предлагаемой системой постепенно идея модифицируется, исправляются недочеты ранних этапов, и тем самым развиваются инженерные способности.

Литература

Сафаров, М.С. Мониторинг и исследования водных объектов и опасных гидрологических явлений горных территорий с применением беспилотных летательных аппаратов / М.С. Сафаров, А.Р. Фазылов, В.А. Фазылов // Вестник Международного Университета Кыргызстана. – 2021. – № 2(43). – С. 348–355.

Алтуни, Д.М. Исследование способов получения информации об окружающем мире беспилотным летательным аппаратом / Д.М. Алтуни, С.И. Журавлев // Инновации. Наука. Образование. – 2021. – № 32. – С. 1241–1245.

Деревянко, Д.В. Применение беспилотных летающих аппаратов в гражданских целях и их безопасность / Д.В. Деревянко // Инновации. Наука. Образование. – 2021. – № 32. – С. 1438–1452.

Клименко, Д.А. Факторы распространения беспроводной связи Wi-Fi / Д.А. Клименко, Л.А. Коробова // Материалы студенческой научной конференции за 2016 год, Воронеж, 01 января – 31 2016 года. – Воронеж: Воронежский государственный университет инженерных технологий, 2016. – С. 402.

Рылева, Д.А. Разработка детерминированной модели учета потерь сигнала при расчете сетей беспроводной связи / Д.А. Рылева, Л.А. Коробова // Информационные технологии в строительных, социальных и экономических системах. – 2019. – № 2(16). – С. 39–40.

Беспилотные машины и их применение в сельском хозяйстве / В.И. Балабанов, В.В. Елесеев, П.Д. Солдатов [и др.] // Наука в центральной России. – 2020. – № 3(45). – С. 31–40. – DOI 10.35887/2305–2538–2020–3–31–40.

Бабаев, В.В. Способы и оборудование для авиапатрулирования трассы / В.В. Бабаев, К.Е. Дорофеев, Я.М. Смазнова // Транспорт и хранение углеводородов: Материалы I Международной научно-технической конференции для молодых учёных, Омск, 07 сентября 2020 года. – Омск: Омский государственный технический университет, 2020. – С. 36–37.

ВЛИЯНИЕ РЕПРОДУКТИВНОГО ФЕНОТИПА НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ПЕРИОДА КОРМЛЕНИЯ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

А.В. Розачева, Т.П. Шкурат

Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского, Ростов-на-Дону, Россия
пустая строка

Введение. В пределах класса Млекопитающие наблюдается значительная межвидовая вариабельность по продолжительности грудного вскармливания. Данная вариабельность обусловлена генетическими факторами, механизмами гормональной репродуктивной регуляции, условиями проживания и образом жизни самок (Lee and Kelleher, 2016; Criswell et al., 2020). Однако, генетическая предрасположенность и гормональная регуляция формируют репродуктивный фенотип, совокупность фенотипических репродуктивных черт, связанных между собой влияющих и друг на друга. Продолжительность периода грудного вскармливания у млекопитающих – важнейший видоспецифический репродуктивный признак, обуславливающий физическое благополучие и выживаемость потомства. Поэтому понимание того, как общий репродуктивный фенотип связан с процессами лактогенеза в норме, необходимо для диагностики и лечения патологий вскармливания.

Материалы и методы. В рамках исследования был проведен автоматизированный сбор основных фенотипических репродуктивных данных по 4219 видам млекопитающих из базы данных AnAge (сроки наступления половой зрелости самок / самцов (дн.), средний размер помета, продолжительность периода беременности (дн.), количество пометов в год и тд.) и их биоинформатическая обработка, включая корреляционный анализ. Поиск, обработка и анализ данных проводились в среде Python 3.8 на платформе jupyter с использованием библиотек Biopython, Matplotlib, NumPy.

Коэффициенты корреляции указаны по Спирмену. Продолжительность грудного вскармливания в базах данных указана в средних значениях количества дней.

Результаты. Проведенный корреляционный анализ выявил наличие следующих зависимостей: Половая зрелость самок (самцов)/ продолжительность периода кормления ($\rho=0,72$; $p<0,05$); продолжительность периода беременности / продолжительность периода кормления ($\rho=0,58$; $p<0,05$); половая зрелость самок/ интервалы между рождениями пометов ($\rho=0,77$; $p<0,05$); половая зрелость самцов/ интервалы между рождениями пометов ($\rho=0,77$; $p<0,05$); продолжительность периода кормления / интервалы между рождениями пометов ($\rho=0,67$; $p<0,05$).

Заключение. Из полученных результатов видно, что видоспецифическая вариабельность продолжительности грудного вскармливания положительно коррелирует со сроками наступления половой зрелости самцов и самок и интервалами между рождениями пометов / детенышей. Корреляция продолжительности вскармливания с интервалами между кормлениями указывает на существование компромисса между текущим и будущим потомством: чем дольше самка кормит текущее потомство, тем дольше не производит следующее (McKerracher et al., 2017). Зависимость сроков наступления половой зрелости самок / самцов с продолжительностью периода кормления неясна и требует дальнейшего изучения.

Литература

- Criswell R. et al. Endocrine-disrupting chemicals and breastfeeding duration: a review //Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity. – 2020. – Т. 27. – №. 6. – С. 388–395.
- Lee S., Kelleher S.L. Biological underpinnings of breastfeeding challenges: the role of genetics, diet, and environment on lactation physiology //American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. – 2016. – Т. 311. – №. 2. – С. E405-E422.
- McKerracher L.J. et al. Energy-related influences on variation in breastfeeding duration among indigenous Maya women from Guatemala //American journal of physical anthropology. – 2017. – Т. 162. – №. 4. – С. 616–626.

УДК 579

ГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ МЕТАБОЛИЗМА МЕТАНОЛА И МЕТИЛАМИНА НОВОГО МЕТИЛОТРОФА 'ANCYLOBACTER RADICIS' VT**Н.В. Агафонова***Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, ФИЦ Пушчинский научный центр биологических исследований РАН, Пушкино, Россия*

Бактерии рода *Ancylobacter* являются хемоорганотрофными бактериями, встречаются в различных местах обитания (водная среда, донные отложения, растения), многие представители являются метилотрофами, т. к. используют в качестве источников углерода и энергии различные C₁-соединения (метанол, метиламин, формальдегид и др.). Недавно был секвенирован геном (номер NCBI GenBank JAHNCQH000000000) нового метилотрофного представителя рода *Ancylobacter*, '*Ancylobacter radialis*' VT (VKM B-3255), выделенного нами из корней лапчатки (*Potentilla* sp.).

Цель работы – геномный анализ метаболизма метанола и метиламина у исследуемого штамма. Поиск и аннотацию генов проводили с использованием сервера RAST v. 2.0, с последующей проверкой в результате сравнения предсказанных генов с базами данных NCBI.

Как и другие известные представители рода *Ancylobacter*, штамм VT является факультативным метилотрофом, использует метанол и метиламин, а также ряд полиуглеродных соединений в качестве источников углерода и энергии. Метанол окисляет до формальдегида двумя разными метанолдегидрогеназами (МДГ): идентифицирован полный оперон, кодирующий классическую МДГ (*mxaHFJGIRSACKLDE*, KIP89_04550–04490), и 2 копии гена *хоxF* (KIP89_13095, KIP89_18225), кодирующие лантанонид-содержащий тип ХоxF-МДГ. Выявлены гены, кодирующие ферменты окисления формальдегида (*fae*, KIP89_12980–13000) и формиата (KIP89_10005–10025, KIP89_11770–11785), в т. ч. НАД⁺-зависимая формиантдегидрогеназа (KIP89_11675). Штамм VT реализует рибулозобисфосфатный (РБФ) путь C₁-метаболизма, в геноме обнаружены гены всех ферментов цикла Кальвин-Бенсон-Бассем: фосфорибулокиназа (KIP89_02405), рибулозобисфосфаткарбоксилаза (*cbbLM*, KIP89_02385–02390), фосфоглицераткиназа (KIP89_18865), глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа (KIP89_18870), триозофосфатизомераза (KIP89_04270), фруктозобисфосфатальдолаза (KIP89_18860), фруктозо-1,6-бисфосфатаза (KIP89_12205), транскетолаза (KIP89_02400, KIP89_18875, KIP89_11680), рибулозобисфосфат-3-эпимераза (KIP89_02375, KIP89_01470), рибозо-5-фосфатизомераза (KIP89_13510). Кроме того, анализ генома выявил, что в метаболизме углеводов участвуют три пути: гликолитический, пентозофосфатный и Энтнера-Дудорова, поскольку найдены гены альдолаз фруктозо-1,6-бисфосфата (KIP89_02410) и 2-кето-3-дезоксиглюкозо-6-фосфоглюконата (KIP89_19215), а также дегидрогеназ глюкозо-6-фосфата (KIP89_02615) и 6-фосфоглюконата (KIP89_09985, KIP89_01850, KIP89_17830). Показано наличие генов изоцитратдегидрогеназы (KIP89_01360), а также α-кетоглутаратдегидрогеназы (KIP89_02115), что свидетельствует о замкнутом цикле Кребса. Обнаружены также гены ферментов глиоксилатного шунта: изоцитратлиаза (KIP89_13590), малатсинтаза (KIP89_17460) и ФЕП-карбоксилаза (KIP89_16035).

Поскольку не обнаружен ключевой ген прямого окисления метиламина, кодирующего фермент метиламиндегидрогеназу (*mauA*), по-видимому, использование этого субстрата осуществляется через N-метилглутаматный (НМГ) путь. Выявлены кластеры генов, кодирующие ферменты НМГ-пути: N-метилглутаматдегидрогеназа (*mgdABCD*, KIP89_19175–19190), N-метилглутаматсинтаза (*mgsABC*, KIP89_11245–11255) и γ-глутамилметиламидсинтаза (*gmaS*, KIP89_11260).

Таким образом, проведенный анализ генома выявил основные пути метаболизма метанола и метиламина: показано, что штамм VT способен к автотрофной метилотрофии, реализует РБФ-путь C₁-метаболизма, а метиламин утилизирует посредством N-метилглутаматного пути.

ГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ НОВОГО МЕТИЛОТРОФА 'METHYLOLIGELLA MARIS' GL2

Н.В. Агафонова, Е.Н. Капаруллина, Н.В. Доронина

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, ФИЦ Пушчинский научный центр
биологических исследований РАН, Пушкино, Россия

Аэробные метилотрофные бактерии – одна из экологически и биотехнологически важных групп микроорганизмов. Известно, что метанол является естественным продуктом метаболизма растений, а также образуется *in situ* в океанах во время роста и разложения фитопланктона и в результате микробной ферментации водорослей. Недавно из морской воды (о. Лусон, Филиппины) нами выделен новый представитель рода *Methyloligella* – '*Methyloligella maris*' GL2 (VKM B-3381).

Цель работы – поиск генов окисления метанола и метиламина в геноме исследуемого штамма (номер в NCBI GenBank CP054476), а также генов, ответственных за синтез биотехнологически значимых метаболитов. Поиск и аннотацию генов проводили с использованием сервера RAST v. 2.0, с последующей проверкой в результате сравнения предсказанных генов с базами данных NCBI.

Исследуемый штамм является умеренно галофильными облигатным метилотрофом, использующим метанол и / или метиламин в качестве единственного источника углерода и энергии. Геном штамма GL2 содержит две метанолдегидрогеназы (МДГ), катализирующие окисление метанола. Структурные компоненты Ca^{2+} -зависимой МДГ с пирролохинолинхиноном (PQQ) в активном центре и белки, необходимые для ее каталитической функции, кодируются кластером из 13 генов (*mxaHFJGIRSACKLDE*) (HT051_11865–11805). Показано также наличие генов, кодирующих альтернативную ХохF-МДГ, содержащую вместо кальция лантаноид в активном центре: *xoxFJG* (HT051_03055–HT051_03065), *xoxFJ* (HT051_11775–HT051_11780) и отдельные гены *xoxF* (HT051_05195, HT051_05200). Штамм GL2 реализует изоцитратлиазотрицательный вариант серинового пути C_1 -метаболизма, показано наличие генов, кодирующих ферменты серин-глиоксилатаминотрансферазу (*sga*, HT051_02810) и гидроксипируватредуктазу (*hpr*, HT051_02815), отсутствие гена *aceA*, кодирующего изоцитратлиазу. Не обнаружены гены, кодирующие ключевые ферменты рибулозо-монофосфатного (*hps*, гексулозофосфатсинтаза) и рибулозо-бисфосфатного (*cbbL*, большая субъединица рибулозо-бисфосфаткарбоксилазы) путей C_1 -метаболизма, также не найден ген (*tauA*), кодирующий малую субъединицу метиламиндегидрогеназы (отвечает за прямое окисление метиламина до формальдегида). Вероятно, утилизация метиламина происходит через *N*-метилглутаматный (NMG) путь, который включает ферменты: γ -глутамилметиламидсинтетазу (*gmaS*, HT051_11880), *N*-метилглутаматсинтазу (*mgsABC*, HT051_11885–11895). При этом NMG-дегидрогеназа, катализирующая окислительное разложение *N*-метилглутамата до глутамата и формальдегида, представлена саркозиноксидазоподобным опероном (*soxBDAG*, HT051_12205–12220). Наличие кластера генов *ectABC* (HT051_00285–HT051_00295), ответственного за биосинтез биопротектора эктоина, хорошо коррелирует с солеустойчивостью штамма (до 9 % NaCl в среде). Кроме того, показано наличие генов синтеза полигидроксibuтирата: *phaA* (HT051_02680), *phaB* (HT051_02685), *phaC* (HT051_09005) и регулятора PhaR (HT051_02675), что согласуется с данными о синтезе высокомолекулярного ПГБ известными представителями рода *Methyloligella* (*M. halotolerans* C2^T и *M. solikamskensis* SK12^T) (Doronina et al., 2013).

Таким образом, проведенный геномный анализ выявил гены, кодирующие ферменты первичного окисления метанола и метиламина, а также генов, ответственных за синтез биотехнологически значимых метаболитов – универсального биопротектора эктоина и биodeградебельного полимера полигидроксibuтирата.

Секция 5. Клеточная и генетическая инженерия

ТРАНСКРИПТОМНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КЛЕТКАХ РАКА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ siRNA ПОДАВЛЕНИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА SOX9

Л.Г. Кондратьева, Е.П. Копанцев, И.П. Чернов

ФГБУН ИБХ им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Транскрипционный фактор SOX9 является одним из главных участников ген-регуляторной сети эмбриогенеза поджелудочной железы (ПЖ) и процессов развития предраковых состояний ПЖ и злокачественной трансформации. Известно, что функция SOX9 связана с несколькими протонкогенными свойствами, включающими способность стимулировать пролиферацию, ингибировать старение клеток и взаимодействовать с другими онкогенами в трансформации опухоли. В данной работе были исследованы транскриптомные изменения, происходящие в клетках линий рака ПЖ при siRNA деплеции гена SOX9.

Для подавления экспрессии белка SOX9 в клетках линий рака ПЖ PANC1 и Colo357 использовали siРНК дуплексы и трансфекцию с помощью RNAiMAX. Для определения уровня подавления белкового синтеза SOX9 в лизатах клеток использовали вестерн блот анализ, уровни экспрессии генов оценивали с помощью RNA-seq и qRT-PCR. Были обнаружены дифференциально экспрессируемые гены в клетках линий PANC1 и Colo357 при siRNA деплеции гена SOX9. С помощью биоинформатического анализа были определены функциональные категории, обогащённые генами с изменённым уровнем экспрессии.

Для клеток линий PANC1 и Colo357 были обнаружены значительные отличия в профилях экспрессии множества генов, в частности, относящихся к таким клеточным процессам как пролиферация, адгезия, программируемая клеточная гибель, подвижность и к межклеточным взаимодействиям. Выявлены значительные отличия по количеству транскриптов генов – маркеров эпителиальной и мезенхимальной дифференцировки. Данные RNA-seq показали большее содержание транскриптов мезенхимальных генов в линии PANC1, чем в линии Colo357. Результаты вестерн блот анализа подтвердили «более эпителиальный» статус клеток линии Colo357 и «более мезенхимальный» – PANC1.

Деплеция гена SOX9 в клетках линии PANC1 привела к изменению более чем в 2 раза экспрессии 1049 генов (DESeq2, $p\text{-adj} < 0,05$), при этом содержание транскриптов 653 генов оказалось сниженным, а 396 – повышенным. Нокдаун гена SOX9 в клетках линии Colo357 привел к изменению более чем в 1,5 раза экспрессии 397 генов (DESeq2, $p\text{-adj} < 0,05$), с повышением содержания транскриптов 111 генов и снижением – 286 генов. Таким образом, можно отметить, что транскриптомные изменения клеток линии Colo357 в ответ на нокдаун гена SOX9 были менее выражены, чем в линии PANC1. При этом, как среди генов с повышенной, так и с пониженной экспрессией были обнаружены общие для двух линий гены. Большая часть общих, изменивших уровень экспрессии генов, принадлежит к функциональной категории генов, вовлеченных в клеточный метаболизм фосфата в. В обеих исследованных клеточных линиях нокдаун гена SOX9 приводил к изменениям экспрессии генов связанных с клеточной адгезией, организацией внеклеточного матрикса, а также генов, вовлеченных в сигнальные каскады от рецепторов на поверхности клетки.

Были выявлены изменения в уровнях транскрипции генов, вовлеченных в процессы регуляции клеточного цикла. При этом, в клеточной линии PANC1 при нокдауне гена SOX9 преимущественно происходит подавление экспрессии множества генов данной категории. Полученные данные согласуются с экспериментами *in vitro*: было выявлено повышение уровня экспрессии белков ингибиторов митотической прогрессии p21 и p27, снижение скорости роста клеток линии, а также уменьшение доли клеток, находящихся в S и G2 фазах клеточного цикла. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о снижении способности клеток линии PANC1 с подавленным уровнем синтеза белка SOX9 вступать в митоз и понижении их пролиферативной активности.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проект № 20–015–00447).

УДК 578.2

ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ ЭСКЕЙП-МУТАНТА РЕКОМБИНАНТНОГО ВИРУСА ВЕЗИКУЛЯРНОГО СТОМАТИТА, НЕСУЩЕГО ГЛИКОПРОТЕИН ВИРУСА ЭБОЛА**П.П. Голдовская, И.А. Климкина, О. Попова, Т.А. Ожаровская, О.В. Зубкова***НИЦЭМ имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия*

Болезнь, вызванная вирусом Эбола, (БВВЭ) является острым высококонтагиозным заболеванием, протекающим с выраженным геморрагическим синдромом. Лихорадка Эбола относится к наиболее тяжелым инфекционным болезням человека с летальностью до 90 % [1].

Одним из потенциальных способов экстренной терапии БВВЭ являются лекарственные препараты моноклональных антител [2]. В результате многочисленных исследований моноклональные антитела, например в препаратах ZMAb, Immazeб, ZMapp, MB-003, продемонстрировали высокую эффективность в качестве лечения лихорадки Эбола [3, 4, 5]. Вирион вируса имеет только один поверхностный белок – гликопротеин (GP). GP отвечает за связывание вируса с рецептором и проникновение в клетку и, таким образом, является единственной мишенью для нейтрализующих антител. Однако, в случае возникновения мутаций в структуре GP, антитела не смогут связаться с вирусом, так как обладают антигенной специфичностью. Определение сайтов связывания является важной характеристикой препаратов моноклональных антител. Широкие возможности для решения этой задачи дает получение и анализ эскейп-мутантов.

Целью исследования являлось получение эскейп-мутанта рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, несущего гликопротеин вируса Эбола (VSV-GP) для определения локализации антигенных сайтов моноклональных антител.

Для получения эскейп-мутанта VSV-GP обрабатывали моноклональным антителом, обладающим вируснейтрализующей активностью и пассировали для отбора устойчивого к данному антителу варианта вируса. В результате секвенирования по Сэнгеру гена гликопротеина эскейп-мутанта вируса VSV-GP в сравнении с гликопротеином дикого типа были выявлены аминокислотные замены в субъединице GP1 в двух положениях – замена глутаминовой кислоты на лизин в положении 280 (280E→K) и замена треонина на изолейцин в положении 485 (485T→I). Первый аминокислотный остаток расположен в конце гликанового кэпа перед муциновым доменом. Второй аминокислотный остаток расположен после муцинового домена. Таким образом, полученные результаты показывают, что антигенные сайты моноклонального антитела локализуются между муциновым доменом GP1 субъединицы.

Литература

- Борисевич И.В., Сыромятникова С.И. «Геморрагическая лихорадка Эбола», 2015.
- Kilgore, P.E., Grabenstein, J.D., Salim, A.M., & Rybak, M. (2015). Treatment of Ebola Virus Disease. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 35(1), 43–53.
- Audet, J., Wong, G., Wang, H., Lu, G., Gao, G.F., Kobinger, G., & Qiu, X. (2014). Molecular Characterization of the Monoclonal Antibodies Composing ZMAb: A Protective Cocktail Against Ebola Virus. *Scientific Reports*, 4(1).
- Mendoza, E.J., Racine, T., & Kobinger, G.P. (2017). The ongoing evolution of antibody-based treatments for Ebola virus infection. *Immunotherapy*, 9(5), 435–450.
- Frederick Hansen, Heinz Feldmann, Michael A Jarvis (2021). Targeting Ebola virus replication through pharmaceutical intervention: *Expert Opin Investig Drugs*, 30(3), 201–226.

РАЗРАБОТКА СПОСОБА ДОСТАВКИ СИСТЕМЫ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ CRISPR/CAS9 В ЗАРОДЫШЕВЫЕ КЛЕТКИ ПЫЛЬЦЫ *ALLIUM CEPA*Л.И. Хрусталева¹, А.С. Ермолаев¹, М.В. Яковцева², Н.А. Кудрявцева¹¹ Российский Государственный Аграрный Университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Россия² Московский физико-технический институт, Россия

Открытие системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 создает новые возможности в получении сортов растений с заданными свойствами. Несмотря на перспективы использования геномного редактирования в медицине, именно продукты питания, полученные от отредактированных культур, будут первым результатом широкого практического использования этой новой технологии. Генетически отредактированные сорта растений будут восприниматься потребителями намного дружелюбнее, чем трансгенные растения, так как они ничем не отличаются от обычных сортов, полученных с помощью мутагенеза или спонтанного мутирования. Сегодня существует два главных фактора, препятствующих широкому внедрению геномного редактирования для создания растений с хозяйственно-ценными свойствами: 1) проблема доставки системы редактирования в растительную клетку; 2) трудности регенерации растений *in vitro*. Целью наших исследований является создание системы редактирования генома растений без внедрения чужеродной ДНК и использования *in vitro* технологий, а именно, редактирование генома, используя только протеин (эндонуклеазу) и РНК, в сочетании с 'regeneration free' системой получения отредактированных форм растений – получение напрямую семян с отредактированным геномом.

Исследования были проведены на луке репчатом (*A. cepa*). Целевым геном для редактирования был взят ген, кодирующий синтазу фактора слезотечения (LFS). Это небольшой (450 bp), однолокусный безинтронный ген (Masamura *et al.* 2012), участвующий в метаболическом пути синтеза соединений, отвечающих за вкус и запах лука. Выключение гена LFS легко определяется фенотипически. Для осуществления редактирования гена LFS с помощью системы CRISPR/Cas9 были разработаны две sgRNA, нацеленные на уникальные сайты рестрикции в гене. Это позволило создать простой молекулярный маркер для быстрой проверки события целевого редактирования. sgRNAs были подобраны с помощью программы CRISPRdirect (Naito *et al.*, 2015).

Для доставки CRISPR/Cas9 в пыльцу использовали магнитные наночастицы. Нанотехнологии позиционируются как ключевой фактор в создании инструмента доставки системы геномного редактирования в растительную клетку (Kwak *et al.* 2019). Однако возможности использования наночастиц для доставки биомолекул в растительные клетки остаются почти неизученными. Нами был проведен синтез наночастиц различной природы и с различным функциональным покрытием. Наилучшим образом себя зарекомендовали магнитные наночастицы на основе магнетита размером 60 нм, стабилизированные карбоксиметилдекстраном и покрытые FITC в качестве флуоресцентной метки для дальнейшей детекции наночастиц в тканях растений.

Для реализации экспериментальной части проекта по доставке CRISPR/Cas9 в генеративную клетку зрелой пыльцы с использованием наночастиц, была изучена структура пыльцы лука репчатого с использованием люминисцентной и электронной сканирующей микроскопии. В результате измерений длины и ширины апертуры было установлено, что длина апертуры составила 6.4 μm (max) и 1.8 μm (min) и ширина – 1.4 μm и 0.8 μm , что позволяет проход синтезированных нами наночастиц размером 60 нм.

Мы провели пилотные эксперименты по анализу проникающей способности наночастиц+FITC в пыльцевые зерна лука репчатого. Были подобраны параметры обработки пыльцы наночастицами и оптимизирована питательная среда. Обработку пыльцы наночастицами проводили в жидкой питательной среде на неодимовом магните. Жизнеспособность пыльцы после обработки проверяли путем прорастивания на питательной среде. Микроскопия пыльцевых трубок показала наличие FITC сигнала внутри пыльцевых трубок, что свидетельствует о прохождении наночастиц внутрь пыльцевого зерна (предполагается через апертуру).

Для подтверждения событий редактирования после обработки пыльцы системой CRISPR/Cas9 был отработан метод прямой ПЦР пыльцы с праймерами на LFS.

Исследования по разработке способа доставки системы редактирования CRISPR/Cas9 в растительную клетку продолжаются. Апробируются и другие способы доставки.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ проекта № 20–016–00065

Литература

- Kwak, S.Y. *et al.* (2019). Chloroplast-selective gene delivery and expression in planta using chitosan-complexed single-walled carbon nanotube carriers. *Nature nanotechnology*, 14(5), 447.
- Masamura, N. *et al.* (2012). Chromosomal Organization and Sequence Diversity of Genes Encoding Lachrymatory Factor Synthase in *Allium cepa* L. G3: Genes, Genomes, Genetics, 2(6), 643–651.
- Naito Y, Hino K, Bono H, Ui-Tei K. (2015) CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics*, 31, 1120–1123.

УДК 66.047

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ГОЛОВЫ И ШЕИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОПОЛИМЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ИЗ ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА

М.С. Холина¹, Н.В. Белишев¹, А.П. Бонарцев¹, Д.С. Святославов², С.И. Самойлова², И.В. Решетов², К.В. Шайтан¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России

Введение. Плоскоклеточный рак головы и шеи (ПРГШ) занимает особое нишу среди опухолевых заболеваний: он занимает 6 место по заболеваемости среди всех видов рака, а эффективность лечения традиционными методами противораковой терапии (хирургическое вмешательство, лучевая терапия и химиотерапия) составляет лишь 50 % [1,2]. Данное исследование направлено на разработку близкой к условиям *in vivo* экспериментальной клеточной 3D-модели ПРГШ, которая позволит более детально изучить различные процессы, происходящие при развитии опухоли, ее метастазировании и других процессов, ассоциированных с этим заболеванием. Кроме того, полученная модель может служить новейшим инструментом для диагностики эффективности и безопасности, как отдельных противораковых агентов, так и комплексных подходов, направленных на борьбу с раком [3]. ПРГШ является гетерогенным заболеванием, в его формировании и развитии играют роль множество факторов: различные типы клеток, ассоциированные с данным типом рака (иммунные, стволовые, эпителиальные клетки и др.), влияние микроокружения и ниши, в которой прогрессирует опухоль. Экспериментальная 3D-модель опухоли, или в данном случае, многоклеточный гетерогенный сфероид, в состав которого входят: биосовместимые микросферы из поли-3-оксibuтирата, а также клетки различных типов: опухолевые клетки линии Нер-2 и мезенхимальные стволовые клетки (МСК) является перспективным инструментом для изучения различных, ранее не изученных процессов взаимодействия рака и других факторов, влияющих на его развитие [4].

Материалы и методы. МСК были выделены в нашей лаборатории по протоколу, описанному ранее [5]. МСК и опухолевые клетки линии Нер-2 культивировали в пластиковых чашках Петри диаметром 10 см, с регулярной сменой полной питательной среды (раз в 3 дня), в состав которой входили: питательная среда ДМЕМ (ПанЭко, Россия), 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (Biological Industries, Израиль) и 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия) при 5 %-содержания CO₂ и температуре 37 °С. При достижении 80 % конfluэнтности, жизнеспособность клеток оценивалась с помощью окрашивания трипановым синим при помощи подсчета в камере Горяева (Freshney).

В качестве источника поли-3-оксibuтирата (ПОБ), использовался штамм-продуцент *Azotobacter chroococcum* 7Б [6]. Для получения микросфер из поли-3-оксibuтирата, диаметр которых составил 40 и 90 мкм, применялся метод «water-in-oil-water». В качестве порообразователя использовался 5 %-ый карбонат аммония. Подробные детали метода были описаны ранее [4].

В работе были получены два типа сфероидов: моно-сфероиды, в состав которых входили клетки линии Нер-2 и микросферы, а также гетерогенные ко-сфероиды, состоящие из клеток Нер-2 и первичных МСК крысы. Для получения сфероидов использовали методы «висячая капля» и «культивирование на низкоадгезионной поверхности». Метод «висячей капли» был описан ранее [7]. Однако использовались некоторые модификации: объем капель был увеличен до 50 µl, период культивирования (до созревания сфероидов) составил 5 суток, микросферы были внесены в среду ДМЕМ и были разведены до концентрации 10–20 микросфер на сфероид. Метод получения сфероидов при «культивировании на низкоадгезионной поверхности» (soft agar) был описан ранее [8], но в данном исследовании, для культивирования сфероидов использовались 48-луночные планшеты (Corning, США). Используемое соотношение клеток МСК/Нер-2 в ко-сфероидах 1:1. Для изготовления сфероидов, обоих описанных выше типов, использовалось от 3 до 5 тыс. клеток на сфероид. Период созревания сфероидов для метода «висячей капли» составил 5 суток, для метода «культивирование на низкоадгезионной поверхности» около 7 суток. Морфология и целостность полученных сфероидов оценивалась с помощью световой микроскопии.

При достижении срока созревания проводилось промывания сфероидов 10-кратных раствором PBS (фосфатно-солевой буфер). Образцы помещали в смесь для фиксации (2 % формалин, 0,2 % глутаральдегид в PBS) и инкубировали в течении суток. Образцы последовательно промывали в растворах этанола с повышающейся концентрацией: 30 %, 50 %, 70 %, 82 % и 96 %. Далее, сфероиды дважды промывали в смеси 100 % гексаметилдисилазана (HMDS) и 96 % спирта (1:1) и инкубировали в течении 10 минут в 100 %-ом HMDS, а затем снова помещали образцы в 100 %-ый HMDS, в котором образцы содержались до полного испарения реактива (около суток). По завершению данного процесса, образцы напылялись золотом. Для получения снимков использовался микроскоп CAMSCAN – S4.

Для сфероидов, полученных с помощью метода «висячей капли», было проведено окрашивание и проверка экспрессии маркеров CD44 и цитокератина 19 (для моно-сфероидов НЕР-2 и микросферами), а также упомянутыми маркерами CD44 и цитокератина 19 (в качестве метки раковых клеток) и поверхностными маркерами МСК: CD90 и CD45, которые использовались для ко-сфероидов МСК/НЕР-2 без микросфер. При окрашивании внутриклеточным маркером цитокератин 19 были проведены фиксация и пермеабилзация образцов, протокол которых был опубликован на официальном сайте Abcam [9]. В данном эксперименте использовался проточный цитометр FACSAria. SORP.

Результаты. Были получены два типа высокопористых микросфер с диаметром примерно 40 и 90 мкм, структура которых была охарактеризована с помощью СЭМ.

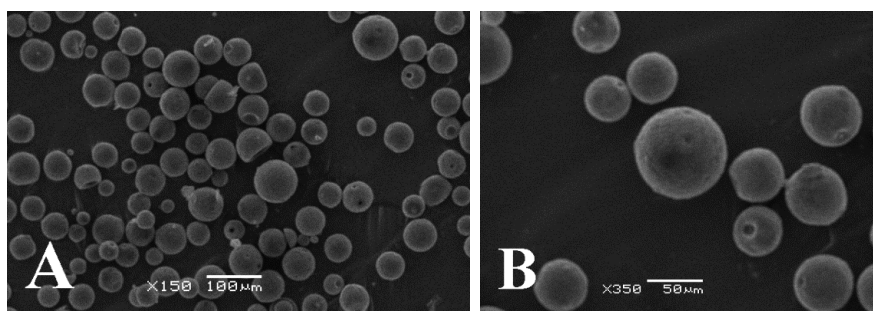


Рисунок 1. Микросферы диаметром 90 мкм (А), микросферы диаметром 40 мкм (В).

В более ранних экспериментах по созданию ко-сфероидов МСК/Нер-2 нами было выявлено, что метод «культивирование на низкоадгезионной поверхности» не пригоден для получения данного типа сфероидов или требует доработки [10]. Полученные данным методом ко-сфероиды оценивали с помощью световой микроскопии и было отмечено, что их структура нарушена, они имеют дефекты структуры и формы (Рис. 2). Предполагается, что такие дефекты образуются в областях скопления МСК, возможно, по причине формирования слабых межклеточных контактов между клетками разных типов.

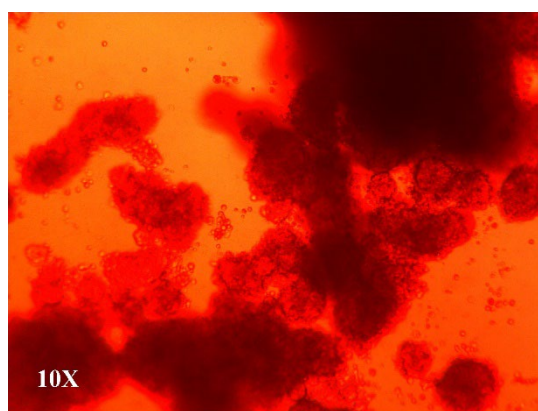


Рисунок 2. Ко-сфероид МСК/НЕР-2 полученный методом «культивирование на низкоадгезионной поверхности»

Используя метод «висячей капли» мы получили ко-сфероиды МСК/Нер-2, обладающие необходимой бездефектной морфологией. Как показали более ранние исследования, проводимые в нашей лаборатории, для получения моно-сфероидов НЕР-2 с микросферами пригоден метод «культивирования на низкоадгезионной поверхности». Другими словами, с помощью двух различных методик мы получили два различных типа сфероидов, которые охарактеризовали с помощью СЭМ (Рис. 3). Структура и морфология данных клеточных агрегатов полностью удовлетворяла предъявляемым к ним требованиям.

Анализ экспрессии маркеров, характерных для различных клеточных линий, дал неоднозначные результаты, которые требуют дальнейшего подтверждения.

Стоит отметить, что для цитометрического анализа были получены моно-сфероиды Нер-2 с помощью метода «висячей капли», что сократило время получения данных структур на двое суток, в сравнении с методом «культивирование на низкоадгезионной поверхности». При этом мы не включали в состав сфероидов микросферы, т. к. это могло создать сложности при работе на проточном цитометре. Как было описано выше, мы анализировали: экспрессию цитокератина 19 и CD44, как маркеров опухолевых клеток; экспрессию CD45 и CD90 как маркеров, характерных для МСК.

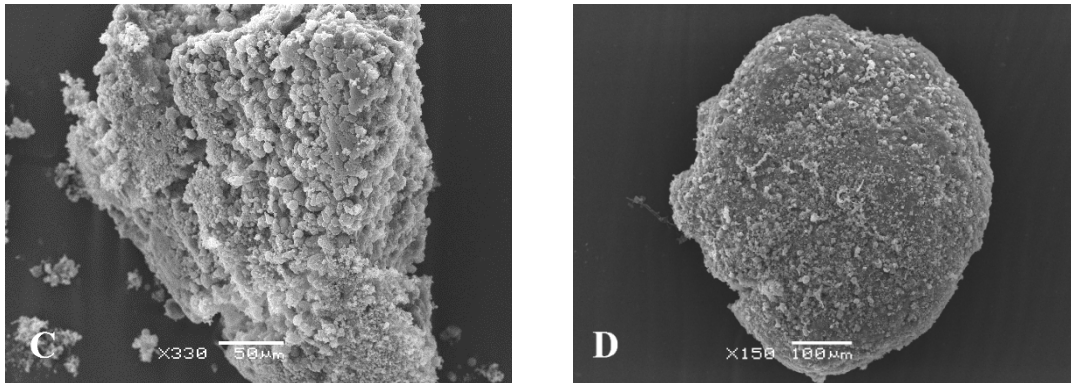


Рисунок 3. Ко-сфероид МСК/Нер-2 (С), моно-сфероид Нер-2 с микросферами диаметром 90 µm (D).

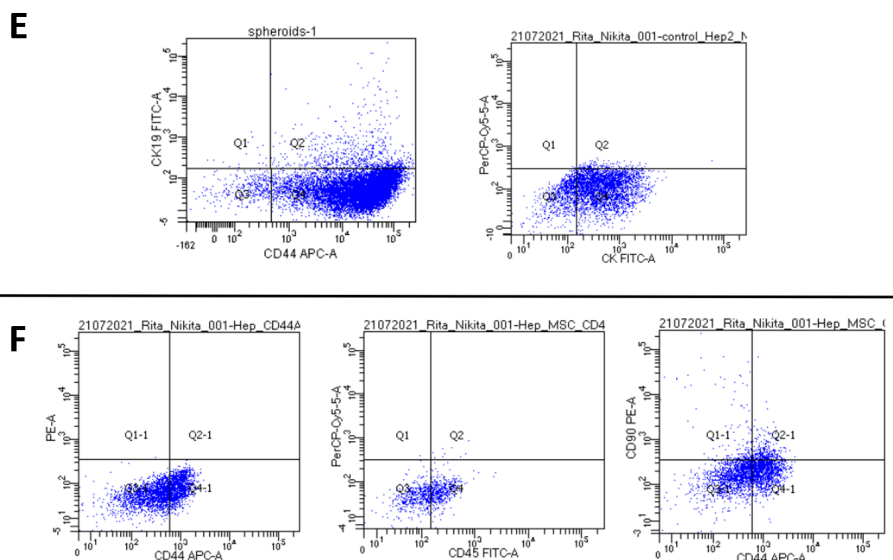


Рисунок 4. Экспрессия характерных маркеров в моно-сфероидах Нер-2(Е) и ко-сфероидах МСК/Нер-2(F). Полученные нами результаты, так же можно предоставить в виде таблицы 1.

Таблица 1. Процент экспрессия различных маркеров, характеризующих раковые клетки и МСК.

Тип сфероид	Цитокератин 19	CD44	CD45	CD90
Моно-сфероид Нер-2	79,9 %	98,1 %	—	—
Ко-сфероид МСК/Нер-2	—	40,3/49,5 %	46,0 %	10,4 %

Высокий уровень экспрессии цитокератина 19 и CD44⁺ в моно-сфероидах Нер-2 (79,9 % и 98,1 %) говорит о высокой жизнеспособности клеток, формировании стабильного цитоскелета, а также о большой вероятности метастатической активности модели, т. к. данные маркеры являются показателями метастазирования. Отсутствие экспрессии цитокератина 19 в ко-сфероидах, говорит об ошибке в протоколе окрашивания, фиксации или пермеабилзации образцов и требует повторного окрашивания. Высокий уровень экспрессии CD44⁺ в ко-сфероидах (при соотношении клеток МСК/Нер-2 1:1), говорит значительной активности опухолевых клеток в подобной модели.

Однако, фенотип МСК в данном эксперименте должен характеризоваться экспрессией CD90⁺ и низкой экспрессией CD45⁺, тогда как в нашем случае, ситуация противоположна (46,0 % к 10,4 %). Мы можем заключить, что 10,4 % клеток, вероятно, относятся к популяции клеток МСК, тогда как 46,0 %, проявляют себя как клетки другого типа (вероятно, они подверглись дифференцировке).

Заключение. Данная работа позволяет сделать выводы, что методика формирования сфероидов «культивирование на низкоадгезионной поверхности» и метод «висячая капля» позволяет получать стабильные и морфологически приемлемые экспериментальные 3D-модели ПРГШ, как гетерогенного состава, так и гомогенные структуры, а также модели в состав которых входят биополимерные частицы. Мы зафиксировали высокую активность опухолевых маркеров в моно-сфероидах HEp-2, что говорит о хорошей перспективе использования разрабатываемой модели. Однако в данном случае, необходимо расширить спектр анализируемых онко-маркеров. Модель со-культивирования показала неоднозначные результаты: мы можем говорить о сохранении популяции стволовых клеток в модели HEp-2/МСК. Тем не менее, делать выводы о взаимовлиянии МСК на активность раковых клеток, пока рано. Были получены стабильные, охарактеризованные с помощью СЭМ модели, но анализ взаимодействия клеток между собой и со своим микроокружением требует дальнейшей работы.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-29-09099.

Литература

1. WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. Solomon B, Young RJ, Rischin D. Head and neck squamous cell carcinoma: Genomics and emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatments. *Semin Cancer Biol.* 2018 Oct; 52 (Pt 2):228–240. doi: 10.1016/j.semcancer.2018.01.008. Epub 2018 Jan 31. PMID: 29355614.
3. Colella G, Fazioli F, Gallo M, De Chiara A, Apice G, Ruosi C, Cimmino A, de Nigris F. Sarcoma Spheroids and Organoids: Promising Tools in the Era of Personalized Medicine. *Int J Mol Sci.* 2018 Feb 21; 19(2):615. doi: 10.3390/ijms19020615. PMID: 29466296; PMCID: PMC5855837.
4. Меньших К.А., Воинова В.В., Бонарцев А.П. Создание 3D клеточных сфероидов на микросферах из поли-3-оксибутирата. «Биотехнология: наука и практика», VII Международная научно-практическая конференция, Севастополь, Россия, 16–20 сентября 2019.
5. И.В. Демьянова, Е.А. Акулина, Т.Х. Трунг и др. Рост мезенхимальных стволовых клеток на пленках поли-3-оксибутирата, загруженных левофлоксацином и симвастатином // Биологический журнал. – 2020. – № 4(15). – С. 4–9. – DOI 10.32743/2658–6460.2020.4.15.283.
6. V.A., Akoulina E.A., Ivanova E.V., Kuznetsova E.S., Shaitan K.V., Bonartseva G.A. Biosynthesis of poly(3 – hydroxybutyrate) copolymers by *Azotobacter chroococcum* 7B: a precursor feeding strategy // *Preparative Biochemistry and Biotechnology.* – 2017. V. – 47. N. – 2. – P. 173–184.
7. Bartosh TJ, Ylöstalo JH, Mohammadipoor A, Bazhanov N, Coble K, Claypool K, Lee RH, Choi H, Prockop DJ. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010 Aug 3; 107(31):13724–9. doi: 10.1073/pnas.1008117107. Epub 2010 Jul 19. PMID: 20643923; PMCID: PMC2922230.
8. Krishnamurthy S, Nör JE. Orosphere assay: a method for propagation of head and neck cancer stem cells. *Head Neck.* 2013 Jul; 35(7):1015–21. doi: 10.1002/hed.23076. Epub 2012 Jul 13. PMID: 22791367; PMCID: PMC3887391.
9. <https://www.abcam.com/protocols/flow-cytometry-intracellular-staining-protocol>
10. Kholina M.S., Menshikh K.A., Voinova V.V., Denisova K.R., Makhina T.K., Bonartseva G.A., Svyatoslavov D.S., Samoylova S.I., Reshetov I.V., Shaitan I K.V., Bonartsev A.P. The co-cultivation of human cancer HEp-2 with rat mesenchymal stem cells: low attachment vs. hanging drop spheroid culturing techniques. ESAO/TERMIS ONLINE Winter School in Jaca, Spain February 24–26, 2021, Online Conference, Испания, 24–26 февраля 2021.

УДК 578.2

РЕПЛИКАТИВНЫЕ СВОЙСТВА АДАПТАЦИОННЫХ МУТАНТОВ РЕКОМБИНАНТНОГО ВИРУСА ВЕЗИКУЛЯРНОГО СТОМАТИТА, НЕСУЩЕГО ГЛИКОПРОТЕИН ВИРУСА ЭБОЛА**И.А. Климкина, П.П. Голдовская, О. Попова, Д.Е. Зрелкин, О.В. Зубкова.***НИЦЭМ имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия*

В декабре 2013 года в Западной Африке началась вспышка болезни, вызванной вирусом Эбола (БВВЭ), которая унесла более 11000 жизней. БВВЭ характеризуется тяжелой лихорадкой, сопровождающейся системным воспалением и повреждением эндотелиального клеточного барьера, что приводит к полиорганной недостаточности с высоким уровнем летальности (50 – 90 %).

РНК-содержащие вирусы, в частности вирус Эбола, имеют высокую частоту мутаций. Исследования различных мутаций в белках вируса Эбола показали, что наиболее эффективными из них, с точки зрения репликации вируса являются те, которые затрагивают его гликопротеин (GP). Возникновение мутаций в гене, кодирующем GP, изменяют рост в клеточной культуре. Изучение репликативных свойств адаптационных мутантов необходимо для прогнозирования трансмиссивности и патогенности вируса Эбола.

Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита (rVSV), можно использовать как модельный вирус для изучения фенотипических характеристик и репликативной способности. Целью данного исследования являлось изучение корреляции между мутационной изменчивостью и репликативными свойствами рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, несущего гликопротеин вируса Эболы (VSV-GP) при культивировании на клетках линии Vero E6. Для исследования были взяты рекомбинантные вирусы rVSVs, несущие следующие мутации белка GP: G524R, T544I, H549R, D552N, G557R и R574I. Репликативные свойства оценивали по морфологии бляшек, а также скорости их роста на клетках Vero E6.

В результате проведенного исследования была выявлена корреляция между мутацией и репликативными свойствами rVSV-GP. Для всех мутантов бляшки в основном начинали формироваться через 24–48 часов после заражения и росли до 6–7 суток. По морфологическим характеристикам бляшек адаптационные мутанты можно разделить на три категории: 1) мутации, вызывающие крупные бляшки, 2) средние бляшки и 3) мелкие бляшки. Вирусы, несущие мутации G524R и H549R обладали мелкобляшечным фенотипом. Сформированные бляшки были в диаметре 1,65 и 1,59 мм соответственно. При этом у вируса с мутацией H549R они были значительно меньше, более неоднородные с нечеткими краями. rVSV несущий ген GP дикого типа давал круглые однородные бляшки среднего размера (2,05 мм) с ровными краями. Также бляшки среднего размера наблюдали у вируса, несущего мутацию R574I. Однако они были неоднородными, с четкими краями и зоной лизиса в центральной части. К адаптационным мутантам, имеющим большой размер бляшек, относятся rVSV-GP с T544I, D552N и G557R. По сравнению с диким типом фенотип бляшек заметно отличался. Они формировали достаточно крупные однородные бляшки с ровными краями и центральной зоной лизиса. Так мутант T544I формировал бляшки 2,8 мм, D552N 3,45 мм, G557R 3,1 мм.

Таким образом, проведенные нами исследования свидетельствуют, что по маркерному признаку размера, а также формы бляшек есть отличия среди адаптационных мутантов.

Литература

- Dietzel E., Schudt G., Kräling V., Matrosovich M., Becker S. 2017. Functional Characterization of Adaptive Mutations during the West African Ebola Virus Outbreak. *Journal of Virology* 91:e01913–16.
- Ruedas JB, Arnold CE, Palacios G, Connor JH. 2018. Growth-adaptive mutations in the Ebola virus Makona glycoprotein alter different steps in the virus entry pathway. *J Virol* 92:e00820–18.

РЕПАРАЦИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК, ВЫЗВАННЫХ ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЕМ, У ОДНОКЛЕТОЧНОЙ ЗЕЛЕННОЙ ВОДОРОСЛИ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

И.А. Сизова^{1,2}, И.Н. Суслова, В.И. Шалзуев, Н.Г. Соболева, В.Н. Вербенко^{1,2}

¹Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

²Курчатовский Геномный центр-ПИЯФ, Гатчина, Россия

Известно, что гамма-излучение прямо или косвенно вызывает одно- и двухцепочечные разрывы ДНК (ДЦР) и при высоких дозах радиации приводит к повреждению клеточных структур, нестабильности генома и гибели клетки. Внесенные в геном ДЦР могут восстанавливаться посредством гомологичной рекомбинации (HR), канонического нехомологичного соединения концов (сNHEJ) и альтернативного соединения концов (altEJ/TMEJ). Целью нашей работы является выяснение путей репарации ДЦР, вызванных гамма-излучением, у популярного модельного и экологически значимого организма – микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii*. В работе были использованы сконструированные нами нуль-мутанты *ku80*, *ku70* по ключевым генам пути сNHEJ и *polQ* пути altEJ/TMEJ (Greiner et al., 2017; Sizova et al., 2021). Проведенный нами анализ спектра мутаций, индуцированных с использованием CRISPR-SpCas9 редактирования, показал, что в клетках дикого типа около 70 % мутаций являлись 1 – 2 нуклеотидными вставками / делециями / обменами характерными для репарации посредством NHEJ, а около 30 % мутаций представляли делеции между участками микргомологии и “шаблонные” вставки специфичные для репарации посредством и altEJ/TMEJ. Таким образом, в мутагенной репарации уникального ДЦР, созданного CRISPR-SpCas9, принимали участие пути сNHEJ и altEJ/TMEJ, причем вклад пути NHEJ доминировал. Далее мы изучили чувствительность штаммов дикого и мутантного типов к антибиотику зеоцину (Zc), который обладает радиомиметическими свойствами и вызывает множественные ДЦР, количество которых зависит от его концентрации (Chankova et al 2007). Мы обнаружили, что репарационные мутанты были значительно чувствительней к действию Zc, чем клетки дикого типа. Причем клетки *polQ* проявляли более высокую чувствительность к антибиотику, чем клетки *ku80* или *ku70*, что указывало на доминирующую роль пути altEJ/TMEJ в репарации повреждений ДНК, вызванных действием Zc. Анализ чувствительности мутантов к гамма-излучению в диапазоне доз 0 – 100 Gy подтвердил более высокую чувствительность клеток *polQ* к множественным повреждениям ДНК по сравнению с клетками *ku80*, *ku70* и диким типом. Полученные результаты показывают, что выбор доминирующего пути репарации ДЦР может зависеть от степени повреждения ДНК, и при индукции множественных ДЦР в геноме, вероятно, связан с активацией пути altEJ/TMEJ. Для проверки этого предположения будет проанализирован спектр мутаций, индуцированных гамма-излучением у штаммов дикого типа и мутантов *ku80*, *ku70*, *polQ*. В настоящее время с использованием гамма-излучения мы получаем устойчивые к 2-фтораденину и 5-фториндолу мутанты, у которых инактивированы гены *APT* и *MAA7*, соответственно. Анализ нуклеотидных последовательностей аллелей *apt* и *maat7* выявит специфические “нуклеотидные подписи” путей NHEJ и TMEJ и их вклад в репарацию ДЦР и индуцированный мутагенез.

Работа выполнена как часть программы Курчатовского Геномного центра “Курчатовский Геномный центр-ПИЯФ – ПИЯФ” (соглашение No. 075–15–2019–1663)

Литература

- Sizova I., Simon Kelterborn S., Verbenko V., Kateriya S., Hegemann P. *Chlamydomonas* POLQ is necessary for CRISPR/Cas9-mediated gene targeting. *G3 Genes/Genomes/Genetics*, 2021, accepted, doi.org/10.1093/g3journal/jkab114
- Greiner A, Kelterborn S, Evers H, Kreimer G, Sizova I, Hegemann P. Targeting of Photoreceptor Genes in *Chlamydomonas reinhardtii* via Zinc-Finger Nucleases and CRISPR/Cas9. *Plant Cell*. 2017, 29(10):2498–2518.
- Chankova SG, Dimova E, Dimitrova M, Bryant PE. Radiat Environ Biophys. Induction of DNA double-strand breaks by zeocin in *Chlamydomonas reinhardtii* and the role of increased DNA double-strand breaks rejoining in the formation of an adaptive response. 2007, 46(4):409–16.

УДК 57.085.23

СОЗДАНИЕ КЛЕТОК С ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫМИ СЕНСОРАМИ***О.А. Рогачевская****Институт биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, г. Пущино, Россия*

Клеточные линии, на высоком уровне экспрессирующие различные экзогенные рекомбинантные белки широко используются в мировой практике для изучения различных аспектов рецепции и внутриклеточной сигнализации. Линии клеток, экспрессирующих рецепторы или ионные каналы, могут использоваться как модель для доклинических испытаний лекарственных средств, или как клеточный биосенсор при изучении секреции соответствующих активных веществ клетками разных тканей. В частности, ранее в нашей лаборатории были получены линии клеток СНО, экспрессирующие ионные каналы P2X2 (модель для испытания новых анальгетиков и биосенсор АТФ) и экспрессирующие рецептор 5HT2C (биосенсор серотонина).

Актуальной задачей доклинических исследований является так же максимально полный анализ внутриклеточной сигнализации, инициируемый потенциальными лекарственными средствами. Для решения этой задачи в настоящее время существуют генетически кодируемые молекулярные сенсоры, позволяющие осуществлять одновременный мониторинг в режиме реального времени нескольких внутриклеточных сигнальных каскадов. Так, в нашей лаборатории осуществлен одновременный мониторинг динамики изменений внутриклеточного Ca^{2+} и cAMP в клетках НЕК 293 под действием различных внеклеточных лигандов с помощью микрофотометрии.

Работы такого плана можно осуществлять на клетках, временно экспрессирующих целевой белок, однако оптимальным вариантом является получение моноклональных клеточных линий с постоянным высоким уровнем экспрессии белка интереса практически во всех клетках. Для получения таких линий нами используется следующий экспериментальный протокол: получение и наработка плазмиды, несущей участок гена, кодирующий белок интереса; химическая трансфекция клеток трансфекционным агентом и плазмидным вектором; наращивание или отбор клеток в присутствии селективного антибиотика; отбор клеток (1 клетка в одну лунку 96 луночного планшета) с помощью клеточного сортера по интенсивности флуоресценции; наращивание клеточных клонов; отбор лучших клонов с помощью физиологического анализа клеток; депонирование полученных клеточных линий. Данный подход достаточно длителен и трудоемок, однако полученные в процессе моноклональные клеточные линии характеризуются не только высоким уровнем экспрессии белка интереса, но и высокой степенью однородности клеточной популяции, что является немаловажным аспектом при исследовании внутриклеточных процессов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ № 20-04-01035 (рук. О.А. Рогачевская)

ИЗУЧЕНИЕ ПРОНИКАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ НАНОЧАСТИЦ, КОНЬЮГИРОВАННЫХ С CY3+(CAS9GFP+NLS), В ПЫЛЬЦУ ЛУКА РЕПЧАТОГО

М. Мардини, С.Г. Монахос, К.Н. Вишняков, Н.А. Кудрявцева, Л.И. Хрусталева

Российский Государственный Аграрный Университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, Россия

Пыльца – это естественная система передачи генетического материала. Метод опыления растений генетически отредактированной пылью привлекает внимание исследователей, так как является коротким путем к получению семян с измененным целевым геном. Магнитофекция пыльцевого зерна наночастицами является одним из наиболее современных и многообещающих методов генной инженерии. Термин "pollen magnetofection" появился первый раз в журнале Nature Plants (Zhao *et al.*, 2017). Авторы этой статьи сообщили, что под воздействием магнитного поля, магнитные наночастицы (МНЧ) могут случайным образом проходить в пыльцу хлопка через апертуру. Однако, несмотря на большое количество цитирований статьи Zhao с соавторами (125 на момент написания тезисов), до сих пор не удалось повторить этот эксперимент. Vejlupkova *et al.* (2020) проверили эффективность метода магнитофекции наночастицами в пыльцевых зёрнах кукурузы и ржи, и после 16 попыток не было обнаружено ни одного случая успешной трансформации. Авторы предполагают, что метод магнитофекция может быть проблематичным именно с данными видами, и они сообщают о необходимости проверки этого метода на других культурах и особенно однодольных.

В качестве растительного материала мы использовали пыльцевые зерна лука репчатого (*Allium cepa*) сорт Мячковский 300. Используемые наночастицы были в виде металл-органических каркасных структур (MOF) размером ± 100 нм. Частицы были приготовлены методом Ringaci *et al.* (2021). Для мониторинга проходимости разработанных наночастиц в пыльцевые зерна и доставки в ядро функциональных элементов системы CRISPR/Cas9 была создана система слежения с использованием флуорофора Cy3, ковалентно соединенного с МНЧ, и комплекса из функционального Cas9 и GFP (Green Fluorescent Protein), слитого с сиквенсом ядерной локализации (NLS), что обеспечит транспорт CRISPR/Cas9 в ядро. Магнитофекцию пыльцевых зерен проводили соответственно протоколу (Zhao *et al.*, 2017) с несколькими изменениями (Мардини и др., 2020). Гистологические и цитологические препараты прорастающей пыли анализировали с помощью эпифлуоресцентного микроскопа Zeiss AxioImager M2 и программы ZEN 3.4 Blue edition. МНЧ были детектированы в 10 % пыльцевых трубок.

В нашем проекте ген CENH3 является целевым объектом для редактирования. В 2010 году Ravi & Chan (2010) опубликовали сенсационные результаты – легкий метод получения гаплоидных семян *in vivo* у *Arabidopsis thaliana*, управляя единственным белком CENH3 (центромерный специфичный гистон H3). Авторы показали, что CenH3 – /– *Arabidopsis* нулевой мутант в сочетании с модифицированной версией CENH3 под названием «tailswap-CENH3» может индуцировать выход гаплоидов с очень высокой частотой (25–45 %). Для поиска гомологии с геном CENH3 в геноме *A. cepa* (Finkers *et al.*, 2021) мы использовали сиквенс мРНК AceCENH3 *A. cepa* (NCBI accession: AB600275; Nagaki *et al.*, 2012). BLAST анализ показал, что ген CENH3 *A. cepa* имеет размер 22556 bp и состоит из 7 экзонов и 6 интронов. Для определения мутаций, приводящих к потере функции гистона CENH3 *A. cepa* проводили SIFT анализ (Sim *et al.*, 2012). Эти данные будут использованы в дальнейшем для разработки sgRNA с целью получения CENH3-опосредованных гаплоидных форм лука репчатого. Получение гаплоидов с последующим их удвоением является важным инструментом ускоренной селекции растений. Линии удвоенных гаплоидов являются фенотипически стабильными и используются для создания F1 гибридов.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075–15–2020–905 от «16» ноября 2020 г. о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

Литература

- Finkers, R., van Kaauwen, M.P., Ament, K., Burger-Meijer, K., Egging, R.J., Huits, H... & Scholten, O. (2021). Insights from the first genome assembly of Onion (*Allium cepa*). bioRxiv.
- Nagaki, K., Yamamoto, M., Yamaji, N., Mukai, Y., & Murata, M. (2012). Chromosome dynamics visualized with an anti-centromeric histone H3 antibody in *Allium*. PLoS One, 7(12), e51315.
- Ravi, M., & Chan, S.W. (2010). Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. Nature, 464(7288), 615–618.
- Ringaci, A., Yaremenko, A.V., Shevchenko, K.G., Zvereva, S.D., & Nikitin, M.P. (2021). Metal-organic frameworks for simultaneous gene and small molecule delivery in vitro and in vivo. Chemical Engineering Journal, 418, 129386.
- Sim, N.L., Kumar, P., Hu, J., Henikoff, S., Schneider, G., & Ng, P.C. (2012). SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. Nucleic acids research, 40(W1), W452–W457.
- Vejlupkova Z. et al. (2020). No evidence for transient transformation via pollen magnetofection in several monocot species. Nature plants, 6(11), 1323–1324.
- Zhao, Xiang, et al. "Pollen magnetofection for genetic modification with magnetic nanoparticles as gene carriers." Nature plants 3.12 (2017): 956–964.
- Мардини М.И др. (2020). Анализ проникающей способности наночастиц в пыльцевые зерна лука репчатого. Тезисы докладов XX Всероссийская конференция молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии», Москва, 2020, сс. 43–44.

УДК 615.277

РЕКОМБИНАНТНЫЕ БЕЛКИ РЕЦЕПТОРА ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА, ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ

А.В. Зубков, Н.С. Кузьмина, М.А. Андреева, А.В. Сидоров, Л.Г. Бутова

ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

Введение. В патогенезе диффузного токсического зоба (ДТЗ) ведущую роль играет рецептор тиреотропного гормона (рТТГ), обнаруженный Pastan I. et all в 1966 году на мембране тиреоцитов [1]. В соответствии с современными представлениями, рТТГ локализуется на мембране тиреоцитов и является членом суперсемейства рецепторов, которые связаны с G-белками. Активация G-белков комплексом гормон-рецептор приводит к стимуляции продукции циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) аденилатциклазой по инозитолфосфатному пути. В процессе развития этого заболевания (ДТЗ) вырабатываются антитела, стимулирующие рТТГ (АТС рТТГ), активирующие сигнальные пути тиреоцита, приводящие к экспрессии гена ТПО и увеличивающие синтез гормонов ЩЖ; антитела, блокирующие рТТГ (АТБ рТТГ), препятствующие осуществлению биологических эффектов ТТГ, соответственно, снижающие синтез гормонов ЩЖ; антитела, расщепляющие рТТГ (АТР рТТГ), при связывании с линейными эпитопами в шарнирной области рТТГ, приводящие к активации каскада каспаз и активирующие процессы апоптоза [2].

Впервые молекулярное клонирование гена рТТГ собаки было выполнено Parmentier M., et all в 1989 г.: была получена кДНК размером 4,9 Kb, кодирующая пептид, состоящий из 744-х аминокислотных остатков [3]. В последние годы появились новые данные о функциональных и биохимических особенностях рТТГ и основных аутоантигенов щитовидной железы при ряде аутоиммунных патологий [2].

Одним из современных подходов к выявлению функциональных сайтов белка является изучение его антигенных детерминант (эпитопов) с помощью рекомбинантных белков и моноклональных антител. Главное преимущество рекомбинантных белков состоит в том, что в них представлены отдельные линейные эпитопы (участки поверхности) антигенов, состоящие из 15–25 аминокислотных остатков. Эти участки могут находиться вблизи функциональных сайтов молекулы или топографически совпадать с ними, что позволяет исследовать взаимосвязи между структурой и функциями молекул и проводить детальное картирование их антигенных детерминант, распознаваемых аутоантителами при аутоиммунной патологии. Патогенетическая значимость отдельных эпитопов антигенов щитовидной железы в настоящее время остаётся предметом пристального изучения. Применение моноклональных антител позволяет детально охарактеризовать конкретные эпитопы поверхности белков, проводить анализ гетерогенности аутоантител в сыворотке крови пациентов с аутоиммунными заболеваниями.

Получение рекомбинантных белков рецептора тиреотропного гормона (рТТГ) человека открывает новые возможности в исследовании взаимосвязи структуры аутоантигенов щитовидной железы и аутоантител в патогенезе аутоиммунных заболеваний: диффузный токсический зоб и аутоиммунный тиреодит (АИТ).

В данной работе клонировали фрагменты последовательности мРНК рТТГ, не содержащие нуклеотидных замен. Получены рекомбинантные векторы для экспрессии фрагментов рецептора тиреотропного гормона.

Актуальность и цель работы: основную роль в патогенезе диффузного токсического зоба – аутоиммунного заболевания щитовидной железы (АИЗ ЩЖ), играет рецептор тиреотропного гормона, что проявляется гиперпродукцией аутоантител (аутоАТ) к рТТГ, приводящей к устойчивому гипертиреозу [4].

В рТТГ можно выделить три домена: внутриклеточный, внеклеточный и трансмембранный. Наиболее интересная область для изучения взаимодействия между антителами и рецептором – внеклеточный домен рТТГ, содержащий обогащённый аминокислотой лейцином фрагмент, и, также, включающий шарнирную область, непосредственно связанную с трансмембранным доменом. Расщепление рецептора, приводит к образованию (α) – субъединицы, состоящей из шарнирной области и обогащённого лейцином участка, а также (β) – субъединицы, содержащей трансмембранный домен и С-концевую часть рецептора. Основным участком рецептора, к которому направлены аутоАТ является α -субъединица рецептора тиреотропного гормона [2, 4–6].

Одним из ключевых направлений исследований в этой области является изучение механизмов взаимодействия аутоантител с участками рТТГ, выявление взаимосвязи между мутациями в гене рТТГ и изменением аминокислотной последовательности эпитопов, приводящих к развитию аутоиммунного заболевания. Для детального изучения эпитопов рТТГ, принимающих участие во взаимодействии с антителами, необходимо выявить отдельные популяции аутоантител стимулирующих (стимулирующие аутоАТ), блокирующих (блокирующие аутоАТ) либо расцепляющие рецептор и приводящие к активации сигнальных путей от рецептора к внутриклеточным эффекторам тиреоцита.

Выявление в сыворотке крови пациентов аутоантител к рТТГ при аутоиммунных заболеваниях: ДТЗ, АИТ являются одним из критериев при постановке диагноза аутоиммунного заболевания.

Целью настоящей работы является клонирование фрагментов гена рТТГ человека, получение и анализ рекомбинантных белков, содержащих участки рецептора тиреотропного гормона, что позволит расширить понимание патогенеза аутоиммунных заболеваний щитовидной железы.

Материалы и методы. Объект исследования: ткань ЩЖ, полученная от пациента с ДТЗ. Выделение мРНК: ткань ЩЖ замораживали в жидком азоте и гомогенизировали. Нуклеиновые кислоты очищали от белков и разделяли методом ультрацентрифугирования при 100 000 g в градиенте цезия хлорида. Для получения кДНК использовали ферментативный синтез двухцепочечной кДНК на poly (A)⁺ – мРНК.

Для трансформации использовали компетентные клетки *E. coli*, штамм *DH5α*.

Олигонуклеотидные праймеры были подобраны на основе последовательностей нуклеотидов, собранных в Gen Bank с использованием онлайн-программы Primer Blast. Синтезировали пять пар праймеров на участок, соответствующий внеклеточному домену рТТГ, «Синтол» (Россия).

Методом ПЦР проведена амплификация фрагментов ДНК различной длины, содержащих участки нуклеотидной последовательности внеклеточного домена рТТГ, для последующего клонирования в векторные системы. проводили с помощью ПЦР – амплификатора T-100 (Bio-Rad). Полученные ПЦР-продукты и пробы ДНК (на этапах клонирования) разделяли методом электрофореза в 1,5 % агарозном геле. ПЦР – продукты выделяли из геля агарозы с помощью набора реактивов Cleanup Standart по методике, рекомендованной производителем.

Реакцию лигирования проводили с помощью набора Quick-TA kit без предварительной обработки рестриктазами в соответствии с инструкцией к набору. Для клонирования полученных ПЦР – продуктов и контроля экспрессии были использованы векторы: pAL2-T, pVax1 и pTurboRFP-C.

Результаты и обсуждение. На первом этапе наших экспериментов было проведено выделение РНК из ткани ЩЖ человека. Полученные образцы содержали 0,7 мкг/мкл РНК, что было подтверждено методом электрофореза проб РНК в 1,5 % агарозном геле (рис. 1).

Для получения генно-инженерных конструкций, содержащих фрагменты гена рТТГ, соответствующие внеклеточному домену, нуклеотидная последовательность которого включает в себя (1 – 1239) п.н. синтезировали пять пар праймеров. В указанной области были выбраны пять участков, на которые были синтезированы специфические олигонуклеотиды: 1-й участок – 1160 п.н.; 2-й участок – 1156 п.н.; 3-й участок – 432 п.н.; 4-й участок – 414 п.н.; 5-й участок – 389 п.н. (рис. 2.)

На следующем этапе была синтезирована кДНК на матрице РНК в двух вариантах, с oligo(dT) и random праймерами. На матрице кДНК, полученной с random праймерами для рТТГ, удалось синтезировать ПЦР – продукты длиной: 1160 п.н., 1156 п.н., 432 п.н., 389 п.н.

Амплифицированные продукты были клонированы в плазмидный вектор pAl-2T, который трансформировали в компетентные клетки *E. coli*, штамм *DH5α*.

Наличие в векторах pAl-2T фрагментов гена рТТГ проверяли методом ПЦР с праймерами M13 с дальнейшей визуализацией ПЦР – продуктов и исходных векторов в 1,5 % геле агарозы. В итоге, были получены три варианта вектора pAL2-T, содержащие фрагменты рТТГ – векторы pAL2-T с ПЦР-продуктами участка 1 (1160 п.н.), участка 3 (432 п.н.) и участка 5 (389 п.н.). Нуклеотидные последовательности трех различных клонов, содержащих различные последовательности фрагментов гена рТТГ были секвенированы. В результате секвенирования нуклеотидной последовательности векторов показали, что фрагменте 432 п.н. содержал 5 замен нуклеотидов; фрагменты, размером 1160 п.н. и 389 п.н., были полностью идентичны опубликованным нуклеотидным последовательностям из GenBank. Протяжённый участок гена рТТГ (1160 п.н.), кодирующий участок внеклеточного домена рТТГ, реклонировали в вектор pVax1, предназначенный для работы с клеточными линиями млекопитающих.

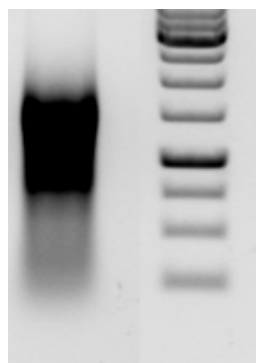


Рисунок 1.
Электрофореграмма в 1,5 % геле агарозы мРНК, выделенной из ткани щитовидной железы

Трек 1 – проба мРНК 0,7 мкг/ мкл. Трек 2 – 10 kВ Gene Ruler DNA Ladder маркер

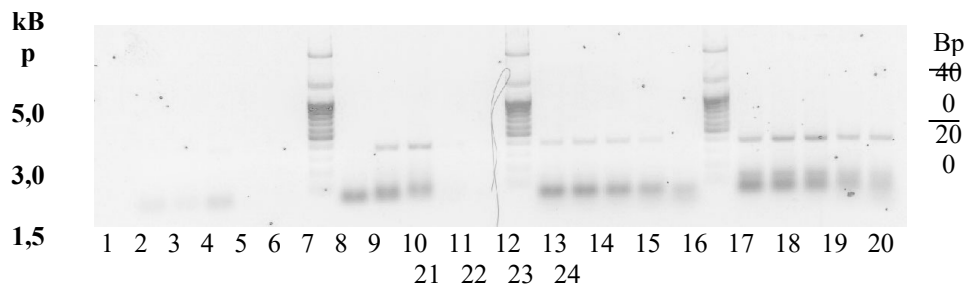
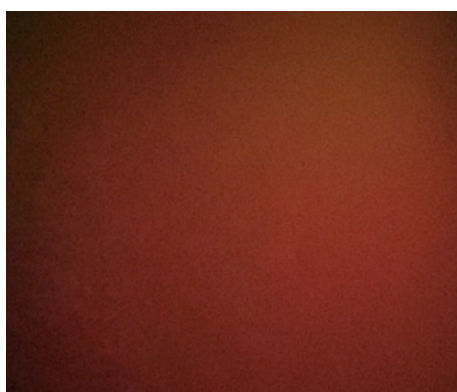


Рисунок 2. Электрофореграмма в 1,5 % геле агарозы ПЦР – продуктов

трек: 1 – пусто
треки 7,13,19 – маркер 1 kВ Gene Ruler DNA Ladder маркер.
треки 2,3,4,5,6 – ПЦР-продукт (432 п.н. градиент температуры 58–68 °С random матрица) треки 8,9,10,11,12 – ПЦР-продукт (432 п.н. градиент температуры 58–68 °С, Oligo(dT) матрица) треки 14,15,16,17,18 – ПЦР-продукт (389 п.н. градиент температуры 58–68 °С random матрица) треки 20,21,22,23,24 – ПЦР-продукт (489 п.н. градиент температуры 58–68 °С, Oligo(dT) матрица)

Трансфекцию векторов pVax1 и pTurboRFP-C проводили в клеточной линии СНО химическим методом, с помощью Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen™). Время трансфекции составляло 72 ч. Контроль трансфекции проводился с помощью вектора pTurboRFP-C, кодирующего красный флуоресцентный белок TurboRFP, который визуализируется с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DMI8 (рис. 3). Контроль полученных рекомбинантных белков, содержащих фрагменты внеклеточного домена рТТГ, проводили методом ИФА. Уровень сигнала в лунках планшета, сорбированных полученными рекомбинантными фрагментами после взаимодействия с аутоантителами из сывороток крови пациентов с диффузным токсическим зобом (уровень АТ к рТТГ – 10 – 40 Ед./л) составлял не менее 0,7 о.е., при уровне сигнала в лунках планшета, сорбированных материалом, полученным от нетрансфицированных клеток СНО не превышал 0,1 о.е.



А



Б

Рис. 3. Визуализация рекомбинантного белка RFP-C после трансфекции в клеточной линии СНО с вектором pTurboRFP-C, увеличение X 400. А – 0 ч, начало трансфекции, Б – через 72 ч после начала трансфекции.

Заключение. Методом трансфекции векторы pVax1 и pTurboRFP-C были внесены в клеточную линию СНО. Рекомбинантные белки, содержащие фрагменты внеклеточного домена рТТГ, были выделены из клеток СНО и проверены на образцах сывороток крови пациентов с диффузным токсическим зобом, содержащим специфические антитела к рецептору тиреотропного гормона. В иммуноферментном анализе подтверждено взаимодействие рекомбинантных белков с аутоАТ из сывороток крови пациентов с ДТЗ. Это подтверждает экспрессию фрагментов рТТГ клеточной линии СНО и позволит применять полученные препараты рекомбинантных белков, содержащие фрагменты внеклеточного домена рТТГ в создании высокочувствительных иммунохимических тестов нового поколения, для выявления специфических аутоантител в сыворотке крови пациентов с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы. Дальнейшие исследования в этом направлении будут направлены на изучение отдельных групп аутоантител (блокирующие, стимулирующие АТ), направленных к основному аутоантигену щитовидной железы – рецептору тиреотропного гормона. Это позволит детально картировать специфические участки внеклеточного домена рТТГ, вызывающие ответ иммунной системы на разных этапах развития аутоиммунной заболевания щитовидной железы для ранней персонализированной помощи пациентам с патологией щитовидной железы.

Литература

- Pastan I., Rot J.H., Macchia V. Binding of hormone to tissue: the first step in polypeptide hormone action // *Proc Natl Acad Sci USA*, 1966; 56(6):1802–1809.
- Furmaniak J., Sanders J., Núñez Miguel R., B. Rees Smith. Mechanisms of Action of TSHR Autoantibodies // *Horm Metab Res*, 2015; 47: 735–752.
- Parmentier M., Libert F., Maenhaut C., Lefort A., Gerard C., Perret J., Van Sande J., Dumont J.E., Vassart G. // *Molecular cloning of the thyrotropin receptor*. *Science*. 1989; 246 (4937): 1620–1622.
- Smith T.J. TSHR as a therapeutic target in Graves' disease. // *Expert Opin Ther Targets*. 2017; 21(4): 427–432.
- Rapoport B., McLachlan S.M. TSH receptor cleavage into subunits and shedding of the A-subunit; a molecular and clinical perspective. // *Endocrine Reviews*, 2016; 37(2): 114–34.
- Sanders J., Bolton J., Sanders P., Jeffreys J., Nakatake N., Richards T., Evans M., Kiddie A., Summerhayes S., Roberts E., Miguel R.N., Furmaniak J., Smith B.R. Effects of TSH receptor mutations on binding and biological activity of monoclonal antibodies and TSH. // *Thyroid*. 2007; 17(2): 1195–1206.
- Gardas A., Watson P.F., Hobby P., Smith A., Weetman A.P., Sutton, B.J. and Banga J.P. Human thyroid peroxidase: mapping of autoantibodies, conformational epitopes to the enzyme surface. // *Redox. Rep.*, 2000; 5, p. 237–241.

УДК 579.2

**РОЛЬ БЕЛКА ACDR В ТРАНСКРИПЦИОННОЙ РЕГУЛЯЦИИ АЦК-ДЕЗАМИНАЗЫ У
METHYLOBACTERIUM RADIOTOLERANS JCM2831****Г.А. Екимова***Пушчинский научный центр биологических исследований РАН (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН),
Россия*

Аэробные метилотрофные бактерии – обширная группа метилотрофных прокариот, использующих окисленные и замещенные производные метана в качестве источников углерода и энергии. В настоящее время известно, что многие аэробные метиловобактерии симбиотически связаны с растениями, колонизуя с высокой плотностью листовую поверхность, присутствуют в ризосфере и в семенах. Взаимосвязь растений с метилотрофами обусловлена, с одной стороны, тем, что растения выделяют в окружающую среду метанол, метан, формальдегид, формиат, метилированные амины, метилсернистые соединения и галометаны, которые активно потребляют метилотрофы. С другой стороны, метилотрофные бактерии стимулируют рост и развитие растений за счет биосинтеза фитогормонов (ауксинов, цитокининов, гиббереллинов), витаминов, повышают фотосинтетическую активность и устойчивость к фитопатогенам и тяжелым металлам, а также фиксируют молекулярный азот. Одним из способов воздействия бактерий на растения является повышение их устойчивости к неблагоприятным факторам, за счёт снижения уровня стрессового гормона этилена, посредством деградации его предшественника 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (АЦК) Бактериальный фермент АЦК-дезаминаза катализирует гидролиз АЦК до неактивных α -кетобутирата и ионов аммония. Ген АЦК-дезаминазы (*acdS*) и активность фермента обнаружены у многих бактерий различного таксономического положения, ассоциированных с растениями, в том числе у *Methylobacterium radiotolerans*, розовоокрашенного факультативного метилотрофа. Нами обнаружено, что выше структурного гена *acdS* дивергентно располагается ген *acdR*, кодирующий предположительный транскрипционный регулятор из LRP – семейства.

В настоящее время изучены гены и охарактеризованы АЦК-дезаминазы нескольких микроорганизмов, а транскрипционная регуляция гена *acdS* исследована только у *Pseudomonas putida* UW4, поэтому целью нашей работы стало изучение транскрипционной регуляции гена *acdS*, кодирующего АЦК-дезаминазу у *M. radiotolerans* JCM 2831.

Для детального изучения функций регуляторного белка ген *acdR* *M. radiotolerans* клонировали в экспрессионном векторе pHUE. При помощи гетерологичной экспрессии в клетках *E. coli* и последующей металл-хелатной хроматографии получили электрофоретически гомогенный препарат рекомбинантного белка AcdR. Молекулярная масса субъединицы AcdR составила примерно 18 кДа, что соответствует теоретически рассчитанной.

³²P-меченый ПЦР-фрагмент, содержащий регуляторный участок гена *acdS*, и очищенный рекомбинантный белок AcdR использовали в экспериментах по образованию комплексов AcdR-ДНК в присутствии АЦК. Установлено, что добавление рекомбинантного белка AcdR приводит к уменьшению электрофоретической подвижности специфического ПЦР-фрагмента в присутствии гетерологичной ДНК и АЦК. Показано, что АЦК служит низкомолекулярным эффектором белка-регулятора. Выявлено, что при низких концентрациях АЦК связывание происходит с кооперативным эффектом, свидетельствующим о том, что AcdR является мультимерным белком. Комплекс ДНК-AcdR-АЦК характеризовался довольно высокой стабильностью, поскольку он не разрушался в течение 30 минут, а время полураспада составило 1 час.

Для подтверждения участия AcdR в регуляции *acdS* получены делеционные и комплементированные мутанты по этим генам, которые были протестированы на наличие АЦК-дезаминазной активности. Активность фермента у делеционных мутантов по обоим генам не обнаружена, как и у штаммов, комплементированных исходной плазмидой. В случае комплементации плазмидами, несущими соответствующие гены, активность фермента восстановилась.

Таким образом, впервые показано, что белок AcdR является активатором транскрипции гена *acdS* у *M. radiotolerans* JCM2831 в присутствии эффектора АЦК.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТОМАТОВ, ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ *pRh6*, В БИОРЕМЕДИАЦИИ

З.Р. Вершинина, Л.Р. Хакимова, О.В. Чубукова

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

Фиторемедиация представляет собой устранение, обезвреживание или перевод в менее токсичную форму экополютантов с помощью растений. Данный метод достаточно часто применяют в случаях загрязнения почв тяжелыми металлами (ТМ), используя растения-гипераккумуляторы тяжелых металлов для восстановления биологической продуктивности экосистем. Фактором, который в наибольшей степени ограничивает эффективность фиторемедиации, является низкая доступность тяжелых металлов из почв. Эту проблему можно решить с помощью трансформации растений генами, которые могут способствовать накоплению тяжелых металлов в тканях, в частности это гены синтеза фитохелатинов, глутатиона и металлотионеинов. Известно, что γ -глутамилцистеинсинтетаза, глутатионсинтетаза, цистатионинсинтаза, АТФ-сульфилаза, серин-ацетилтрансфераза, глутатионредуктаза, фитохелатинсинтаза и глиоксалаза являются потенциальными кандидатами для обеспечения резистентности к тяжелым металлам. Сверхэкспрессия генов, кодирующих эти ферменты, способствовала повышению устойчивости разных растений и накоплению в них тяжелых металлов [1].

При воздействии тяжелых металлов на растения начинают синтезироваться особые небольшого размера пептиды, которые выполняют строго определенные функции, связывая ионы металлов и транспортируя их к месту назначения. Одними из таких металлсвязывающих пептидов являются фитохелатины. Первичная структура фитохелатинов представляет собой небольшой, богатый цистеином пептид, способный связывать ионы тяжелых металлов через SH-группы. Кроме того фитохелатины характеризуются наличием γ -пептидной связи, что усложняет их биосинтез в клетках. Ранее уже проводились эксперименты с химически синтезированными генами, кодирующими аналоги природных фитохелатинов с α -пептидной связью (псевдофитохелатины), что позволяло им синтезироваться с участием рибосомного аппарата клетки. Детальные эксперименты показали, что эти пептиды связывают различные металлы так же, как и природные фитохелатины и нарабатываются в клетках в большем количестве [2]. Ранее в нашей лаборатории был сконструирован вектор для трансформации растений с геном псевдофитохелатина *pRh6* с формулой $\text{Met}(\alpha\text{-Глу-Цис})_6\text{Гли}$ [3].

Томат (*Solanum lycopersicum* L.) является одной из важнейших овощных культур в сельском хозяйстве многих стран. В связи с распространением загрязнения почв ТМ, в последние годы стали популярны исследования, посвященные накоплению ТМ в растениях томата, а также потенциальному использованию томатов к фиторемедиации, в том числе совместно с бактериями или грибами – микросимбионтами. Интересно, что практически все популярные сельскохозяйственные культуры семейства Solanaceae оказались небезопасными для потребления в пищу из-за их способности к фитоэкстракции ТМ при выращивании на загрязненных почвах [4].

Целью работы было получение трансгенных по гену *pRh6* растений томата сорта Грунтовый Грибовский 1180 методом агробактериальной трансформации и анализ устойчивости полученных линий к воздействию кадмия.

Материалы и методы. Агробактериальную трансформацию томата осуществляли согласно статье [5]. В качестве эксплантов для трансформации были использованы семядоли недельных проростков.

Семена контрольных (нетрансгенных) и полученных гомозиготных по гену *pRh6* трансгенных линий для дальнейших экспериментов стерилизовали и проращивали в контейнерах с прокаленным вермикулитом при температуре 25 °C и 16-часовом световом дне в климатической камере KBW 240 (Binder). Проростки поливали раствором MS с 0,3 % сахарозы (масс.). В возрасте двух недель растения пересаживали в водную культуру в сосуды объемом 5 л (по 5 растений на сосуд), заполненные MS без сахарозы. Величину pH растворов поддерживали на уровне 5,7–5,8. Культивирование проводили в течение при температуре 25 °C и 16-часовом световом дне в климатической камере KBW 240 (Binder).

Эксперименты по воздействию Cd и проводили на растениях, достигших 3-недельного возраста. Проростки переносили на MS без сахарозы (сосуды объемом 5 л по 5 растений на сосуд, pH 5,7–5,8 при постоянной аэрации) с добавлением CdCl₂ согласно схеме опыта. Концентрации вносимого в растворы Cd²⁺ составили 0 (контроль), 5, 10, 15 и 20 мкМ, продолжительность эксперимента – 7 суток. По окончании эксперимента проводили сьем опыта. Растения разделяли на части – корни и побеги. Далее растительный материал фиксировали при 105 °С в течение 1 часа, высушивали при 70 °С в течение 24 часов до абсолютно сухого веса и взвешивали.

Результаты и их обсуждение. Эффективность использованного метода трансформации томата сорта Грунтовый Грибовский 1180 составила 2,5 %, было получено 5 независимых гомозиготных по гену *rph6* линий растений, экспрессирующих целевой псевдофитохетатин.

Для оценки эффективности использования *rph6* в качестве трансгена для фиторемедиации был проведен анализ биомассы контрольных и трансгенных линий растений при воздействии кадмия. Было показано, что биомасса всех изучаемых линий, в том числе и контрольных, в условиях отсутствия кадмия в почве не отличается. Похожий результат был получен и в экспериментах, где концентрация кадмия составляла 5 мкМ. При воздействии 10–20 мкМ кадмия трансгенные растения нарабатывали в среднем на 15 % большую биомассу надземной части, чем контрольные растения. При этом биомасса корней у растений, несущих *rph6*, была больше на 22 %, чем у нетрансформированных томатов. Внешне трансгенные растения выглядели более здоровыми – их листья были меньше признаков хлороза. Наилучшие результаты по устойчивости проростков к воздействию кадмия наблюдались для линий 1 и 3.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что линии трансгенных томатов 1 и 3 целесообразно использовать в дальнейших экспериментах по изучению накопления кадмия в растениях с целью повышения эффективности фиторемедиации почв, загрязненных тяжелыми металлами.

Работа была выполнена в рамках госзадания (№ гос. регистрации AAAA-A21-121011990120-7).

Литература

1. Wawrzyński A., Kopera E., Wawrzyńska A., Kamińska J., Bal W., Sirko A. Effects of simultaneous expression of heterologous genes involved in phytochelatin biosynthesis on thiol content and cadmium accumulation in tobacco plants // Journal of experimental botany. 2006. V. 57(10). P. 2173–2182.
2. Постригань Б.Н., Князев А.В., Кулуев Б.Р., Яхин О.И., Чемерис А.В. Клонирование и активность синтетического псевдофитохелатинового гена в модельных растениях табака // Физиология растений. Т. 59 (2). 2012. С. 303–308.
3. Вершинина З.Р., Хакимова Л.Р., Чубукова О.В. Трансгенные растения амаранта – аккумуляторы кадмия // Актуальная биотехнология. 2020. № 3 (34). С. 412–415.
4. Вершинина З.Р., Хакимова Л.Р., Лавина А.М., Каримова Л.Р., Федяев В.В., Баймиев Ан. Х., Баймиев Ал. Х. Взаимодействие томатов (*Solanum lycopersicum* L.), трансформированных RapA1, с бактериями *Pseudomonas* sp. 102, устойчивыми к высоким концентрациям кадмия, как основа эффективной симбиотической системы для фиторемедиации // Биотехнология. 2019. Т. 35. № 2. С. 38–48.
5. Хакимова Л.Р., Чубукова О.В., Вершинина З.Р. Получение трансформированных геном *rapA1* растений томатов // Biomix. 2021. Т.13(2). С. 153–158.

ПОИСК ОПТИМАЛЬНОГО СИГНАЛЬНОГО ПЕПТИДА ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ СЕКРЕЦИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ФИТАЗЫ ДРОЖЖАМИ *PICHIA PASTORIS*

Д.С. Бульмакова, А.Д. Сулейманова, М.Р. Шарипова

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

В полноценном питании животных и птиц особое значение имеет фосфор. Он является одним из основных структурных компонентов организма, входит в состав важнейших метаболитов, принимает активное участие во многих обменных, энергетических и регуляторных процессах. Фосфор семян растений, используемых в качестве кормов, недоступен для питания животных, поскольку основная его часть находится в неусвояемой форме фитатов. Помимо того, фитаты могут образовывать комплексы с белками и ионами металлов, что также снижает их биодоступность. Перспективной стратегией в решении данной проблемы является добавление в корма животных специфических микробных ферментов – фитаз, способных гидролизовать фитат. В свою очередь, использование ферментов в промышленности подразумевает масштабирование процессов их синтеза путем создания эффективных экспрессионных систем. Для получения многих рекомбинантных белков широко применяются дрожжи *Pichia pastoris*, характеризующиеся высоким уровнем экспрессии за счет сильных и регулируемых промоторов, а также подбора эффективных сигнальных пептидов. Цель работы – поиск оптимального сигнального пептида для эффективной секреции фитазы AgpP бактерии *Pantoea* sp. 3.5.1 дрожжами *Pichia pastoris*.

На первом этапе работы были получены генетические конструкции для внеклеточной продукции бактериальной фитазы дрожжами на основе низкокопийного дрожжевого вектора pPINK-LC с индуцибельным промотором AOX1 и набора сигнальных пептидов (генов α -амилазы *Aspergillus niger*, α -фактора *Saccharomyces cerevisiae* и инулиназы *Kluyveromyces fragilis*). Для трансформации полученных конструкций использовали штамм *Pichia pastoris* PichiaPink4, который является ауксотрофом по аденину и не способен расти при его отсутствии в среде. Интеграция в геном дрожжей экспрессионных конструкций позволяет ему расти на среде без аденина. Способность трансформированных штаммов *P. pastoris* экспрессировать и секретировать фитазу в культуральную жидкость оценивали с помощью иммуноблоттинга и анализа фитазной активности. Показано, что бактериальная фитаза AgpP экспрессируется в дрожжевых клетках на уровне трансляции и секретируются в культуральную жидкость. Для подбора оптимального для секреции белка сигнального пептида измеряли внутриклеточную и внеклеточную активность фитазы. У штаммов, трансформированных конструкцией, содержащей сигнальный пептид гена инулиназы, максимальное значение внеклеточной и минимальное значение внутриклеточной активности фитазы обнаружено на 36-й час культивирования и составило 3.8 ед./мл и 0.85 ед./мл, соответственно. Трансформанты с сигнальными пептидами генов α -амилазы и α -фактора максимального значения внеклеточной активности фермента достигли так же на 36-й час роста культуры, что составило 3.65 ед./мл и 2.86 ед./мл, соответственно. Внутриклеточная активность фитазы при этом составила 0.61 ед./мл и 0.52 ед./мл, соответственно. Полученные результаты о максимальных и минимальных значениях активности белка подтверждали иммуноблоттингом. Таким образом, наиболее эффективным сигнальным пептидом для секреции бактериальной гистидинової кислотной фитазы AgpP *Pantoea* sp. 3.5.1 дрожжами *P. pastoris* является сигнальный пептид гена инулиназы *Kluyveromyces fragilis*.

Работа выполнена при поддержке РФФИ № 16-16-04062.

УДК 577.212.3

СБОРКА И РЕДАКТИРОВАНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**И.А. Владимиров², О.А. Павлова^{2,3}, И.Н. Исаева¹, Д.И. Богомаз^{1,2}.**¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого (СПбПУ), Санкт-Петербург, Россия²ООО «Бигль», Санкт-Петербург, Россия³АО «Международный центр репродуктивной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Одним из ключевых методов современной молекулярной биотехнологии, генной инженерии и генетики является сборка генетических конструкций, применяемых затем для целей генной инженерии. Однако часто оказывается, что требуемые фрагменты конструкции невозможно или трудно получить путем амплификации ДНК из природных источников – природный источник последовательности может оказаться труднодоступен, опасен в обращении, последовательность может требовать слишком глубокой модификации, иметь протяженные синтетические вставки или не иметь природных аналогов вообще. В этих случаях последовательность ДНК синтезируется *de novo*.

Поскольку возможности химического синтеза ДНК ограничены по длине, существуют различные методы сборки длинных молекул из коротких синтетических олигонуклеотидов. Очень большой интерес представляет сборка целой последовательности с помощью ПЦР, где в качестве матрицы используется смесь перекрывающихся «черепицей» праймеров. Преимущества технологии очевидны – она относительно проста, может быть реализована с помощью обычных реактивов для ПЦР, используемые олигонуклеотиды не требуют никаких дополнительных модификаций, а их последовательности могут быть подобраны автоматически с помощью специальных программ.

Реальная верхняя граница метода находится где-то в районе 1000 п.н., что все равно ниже, чем потребная длина некоторых элементов генетических конструкций. Другой проблемой является наличие в получаемых молекулах ошибок (это ошибки синтеза и артефакты ПЦР), вероятность наличия которых, начиная с некоторой длины приближается к 100 %, что не позволяет отобрать не содержащий ошибок клон.

Нами предлагается методика сборки готовых последовательностей, позволяющая обойти эти две проблемы с использованием обычных реактивов и оборудования для ПЦР.

Суть метода заключается в том, что последовательность собирается из двух крупных (>500 п.н.) и сильно (>100 п.н) перекрывающихся одноцепочечных фрагментов, которые нарабатываются с помощью асимметричной ПЦР. Асимметричную ПЦР ставили с двадцатикратным избытком наружных праймеров, что приводило к преимущественной амплификации цепочек, которые в итоговой сборке направлены 3' – концом внутрь. При смешивании таких ПЦР-продуктов они комплементарно взаимодействуют перекрывающимися частями и достраиваются полимеразой до полной двухцепочечной матрицы, которую затем в достаточно чистом для клонирования виде получали с помощью ПЦР с фланкирующих праймеров.

Таким образом, фактически можно сращивать друг с другом два фрагмента произвольной последовательности вне зависимости от наличия / отсутствия на них рестрикционных сайтов. Это позволяет решить обе проблемы метода сборки – недостаточную для ряда задач предельную длину и наличие ошибок. В первом случае (когда требуется собрать слишком длинную последовательность) можно произвести сборку из олигонуклеотидов двух более коротких перекрывающихся фрагментов, и затем, после контроля их последовательности, срастить их одноцепочечные копии, наработанные асимметричной ПЦР. Во втором случае (исправление ошибок) можно выбрать клоны, содержащие ошибки в разных частях последовательности, и, амплифицировав «здоровые» части с помощью асимметричной ПЦР, собрать из двух содержащих ошибки клонов один «здоровый».

С помощью данной методики нами были успешно собраны гены длиной более 1200 п.н. Следует заметить, что происхождение последовательности, нарабатываемой с помощью асимметричной ПЦР, не имеет особого значения, что расширяет возможности метода: с помощью него можно сращивать фрагменты, собранные разными способами, пришивать природные последовательности к искусственным.

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ТЕРМОИНАКТИВАЦИИ ОКСИДАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ ИЗ ДРОЖЖЕЙ *OGATAEA PARAPOLYMORPHA* DL1

Д.Л. Апрошенко^{1,2}, М.Д. Шеломов^{1,2}, Ю.А. Ушакова¹, С.С. Савин¹, В.И. Тишков^{1,2}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Оксидаза D-аминокислот (DAAO) – это фермент, который катализирует окисление D-аминокислот в соответствующие α -кетокислоты с образованием пероксида водорода и иона аммония. DAAO играет важную роль как в прокариотах, так и эукариотах. В последних особая роль относится к регуляции нервной деятельности. Пониженный уровень D-Ser приводит к возникновению шизофрении. В случае таких тяжелых нейродегенеративных заболеваний как болезни Альцгеймера и Паркинсона, возрастает уровень D-аланина. Разработка высокочувствительных методов детекции этих D-аминокислот может быть использована для анализа возможности возникновения вышеуказанных нейродегенеративных заболеваний.

В пищевой биотехнологии уровень D-аминокислот можно использовать для определения качества пищевых продуктов. С увеличением времени хранения пищевых продуктов в основном происходит увеличение содержания D-Ala. Это связано с тем, что D-Ala является основной D-аминокислотой пептидогликана клеточной стенки бактерий.

Активно развивающимся подходом для определения уровня D-аминокислот является использование биосенсоров на основе оксидаз D-аминокислот, которые не взаимодействуют с L-аминокислотами. Биосенсоры просты в использовании, экспрессные и относительно дешевые. Основным препятствием стала широкая субстратная специфичность имеющихся DAAO (в первую очередь из почек свиньи, дрожжей *T.variabilis* и *R.gracilis*, которые с D-Ala и D-Ser имеют близкие кинетические параметры). Это особенно важно в случае определения D-Ala, концентрация которого в клетке примерно в 10 раз ниже концентрации D-Ser. Поэтому в настоящее время самой важной задачей является получение препаратов DAAO высокоспецифичных или к D-Ala, или к D-Ser. Нами была получена DAAO из дрожжей *Ogataea parapolymorpha* DL1, высокоспецифичная к D-Ala. Причем его удельная активность оказалась минимум в два раза выше по сравнению с другими DAAO, описанными в литературе.

Важным свойством для подбора условий реакции является температурная стабильность фермента. Детальные данные по кинетике инактивации и знание механизма инактивации фермента позволит подобрать оптимальные условия работы и хранения биосенсора. Кроме того, знание механизма инактивации необходимо при использовании методов рационального дизайна с целью повышения стабильности фермента.

В данной работе изучена термоинактивация OraDAAO1 в диапазоне температур 48–52 °C. Исследовано влияние начальной концентрации фермента и добавления дополнительных количеств молекулы FAD на кинетику термоинактивации. Исходя из полученных кинетических данных предположен механизм термоинактивации OraDAAO1, проанализирована советующая кинетическая схема и определены константы инактивации OraDAAO1.

Работа выполнена при поддержке Гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук и докторов наук (МК-6239.2021.1.4).

УДК 577.151.03

ПОЛУЧЕНИЕ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ В ПОСТГЕНОМНУЮ ЭПОХУ**В.И. Тишков^{1,2}, А.А. Пометун^{1,2}, Д.Л. Атрошенко^{1,2}, П.Д. Паришин¹, С.С. Савин^{1,2}**¹ *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*² *Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия*

Ферменты – это высокоэффективные природные катализаторы. Благодаря высокой регио- и стереоселективности они очень широко применяются в тонком органическом синтезе и фармацевтической промышленности. Однако высокая селективность часто является «слабым» местом, поскольку в ходе эволюции ферменты были оптимизированы по природные молекулы и поэтому они могут быть малоэффективными с синтетическими аналогами, которые часто и используются в качестве лекарственных препаратов. Другими важными факторами, ограничивающими применение биокатализа на практике, являются высокая стоимость получения, невысокая температурная и операционная стабильность, несовпадение оптимальных условий проведения процесса с оптимальными условиями функционирования самого фермента. Развитие методов рекомбинантных ДНК и белковой инженерии позволило снизить себестоимость получения и повысить стабильность, однако применение этих методов для изменения каталитических свойств и особенно селективности оказалось очень трудозатратным и часто не давало требуемого результата.

Появление методов высокоэффективного секвенирования позволило определить последовательности геномов тысяч организмов, особенно бактерий и архей. Современные секвенаторы за один цикл работы (несколько дней) позволяют секвенировать десятки геномов микроорганизмов. Развитие методов биоинформационного анализа и компьютерного моделирования дает возможность предсказания каталитических свойств и селективности ферментов. Основываясь на результатах биоинформационного анализа можно выбрать источник, в геноме которого имеется ген фермента со свойствами, которые наиболее близки к желаемым. В результате такого подхода (genome mining) были клонированы тысячи генов разных ферментов. В данном докладе будут представлены наши собственные данные по использованию данного подхода. В результате были получены новые формиаатдегидрогеназы (FDH) и оксидазы D-аминокислот (DAAO) с повышенной каталитической эффективностью и стабильностью. В случае DAAO были клонированы ферменты нового типа, которые ранее не были описаны.

Несмотря на очень высокую каталитическую эффективность, ферменты имеют свои для этих параметров предельные значения. Поэтому нельзя постоянно улучшать свойства отдельного биокатализатора. Если в процессе используется не один а два (или более) фермента, катализирующих сопряженные реакции эффективность биокатализа может быть повышена за счет получения гибридных молекул, в которых в одной полипептидной цепи находятся последовательности обоих ферментов (слитые белки, fusion enzymes). В этом случае путь молекул (продукта первой реакции и одновременно субстрата второй) от одного активного центра до другого резко сокращается. Нами с использованием данного подхода были получены два типа таких гибридных биокатализатора на основе в качестве первого фермента цитохрома P450 BM3 или фенилацетонмонооксигеназы (РАМО), а вторым ферментом была формиаатдегидрогеназа, которая обеспечивала регенерацию восстановленного NADPH, необходимого для осуществления первой реакции. Было проведено компьютерное моделирование структур таких гибридных белков с разной последовательностью расположения ферментов (например, P450BM3-FDH и наоборот). Были получены генно-инженерные конструкции, позволяющие экспрессировать эти гибридные ферменты в активной форме, получены варианты с разным полилинкером. Гибридные биокатализаторы были получены в очищенном виде и были изучены их каталитические свойства. Было показано, что такие гибриды в зависимости от типа субстрата обеспечивают ускорение процесса от 2 до 10 раз.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 20-04-00915а), РФФИ и Правительства Москвы в рамках научных проектов № 21-34-70040 мол_а_мос и 21-34-70046 мол_а_мос, Российского научного фонда (грант 18-74-0014), Грантов Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук и докторов наук (МД-349.2021.1.4 и МК-6239.2021.1.4), Фонда имени Александра фон Гумбольдта (стипендии В.И.Т., А.А.П.) и Германской службы академических обменов DAAD (стипендия П.Д.П.)

Секция 6. Инженерные аспекты биотехнологии

УДК 604.4:631.8

**ТЕХНОЛОГИЯ КОМПЛЕКСНОЙ УТИЛИЗАЦИИ ОТХОДОВ ПЕРЕРАБОТКИ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПРОДУКЦИИ С ПОЛУЧЕНИЕМ БИОЛОГИЧЕСКИ
АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ*****В.П. Молчанов, А.Д. Хамайдула, Ю.Ю. Косивцов, Ю.В. Луговой****Тверской государственный технический университет, Тверь, Россия*

Ограниченность ископаемых топлив, высокие цены на энергоносители и сопутствующие экологические проблемы подпитывают интерес к поиску альтернативных источников энергии. Сельскохозяйственные отходы растительной биомассы – возобновляемое и экологичное сырье, которое в перспективе может составить альтернативу традиционным энергоносителям.

Настоящая работа посвящена созданию технологии комплексной переработки отходов льнопроизводства, которая включает в себя биотехнологическую и термическую стадии. Основными продуктами переработки костры льна, согласно разрабатываемой технологии, являются аминокислоты, сахара, компоненты моторных масел, горючих газов, углеродные сорбенты и др. На первом этапе исследования был проведен ряд экспериментов для определения оптимальных условий биоконверсии костры льна при варьировании соотношения навоза, торфа и воды с целью получения ряда ценных аминокислот и моносахаридов. Оптимальными условиями проведения биотехнологической стадии являются температура компостирования 37°C, атмосферное давление и скорость подачи воздуха 5 л/мин при массе навески компоста 400 г. Оптимальное соотношение компонентов навоза, торфа, костры льна и воды, обуславливающее высокую эффективность проведения биоконверсии костры льна, соотносилось как 2:1:1:5 соответственно и позволяло достичь высокого выхода моносахаридов и аминокислот (около 0,8 % масс. от исходной массы субстрата). На втором этапе работ проводилось исследование процесса пиролиза исходной костры льна и образца костры, полученного путем компостирования при оптимальных условиях. На основе данных термогравиметрического анализа для проведения экспериментов была выбрана температура процесса 500°C.

Образец костры льна после стадии биоконверсии обладал большим содержанием лигнина, что приводило к большим значениям теплоты сгорания газообразных и жидких продуктов пиролиза. Это объясняется тем, что в процессе компостирования бактериями и грибами поглощается преимущественно целлюлоза, что подтверждается данными по компонентному составу изучаемых образцов. Таким образом, комплексная переработка костры льна позволяет увеличить выход ценных продуктов и повысить их качество, что приводит к росту эффективности использования исходного потенциала отходов растительной биомассы.

По результатам выполнения работы были решены следующие основные научно-технические задачи и сделаны соответствующие практические выводы:

- апробированы физико-химические методики лабораторных исследований и технические приемы утилизации отходов переработки льна, в том числе методика термогравиметрического анализа льняной костры, методика газовой хроматографии льняной костры, методика биологической ферментации костры льна, методика низкотемпературного каталитического пиролиза льняной костры с получением горючих газовых смесей, жидких топливных фракций и твердых углеродсодержащих сорбентов;
- подобраны оптимальные условия проведения технологических стадий процесса комплексной утилизации костры льна, состоящего из биоконверсионной и пиролизной стадий;
- проведены анализы и сопоставлены результаты термогравиметрического анализа исходного сырья и образцов костры льна, полученных в ходе ее биокаталитической обработки;
- выполнены комплексные физико-химические исследования продуктов пиролизной обработки костры льна, в том числе исследования образующихся горючих газовых смесей, жидких фракций и твердых углеродсодержащих сорбентов;
- сформулированы практические рекомендации по повышению эффективности технологий переработки и утилизации отходов льнопроизводства.

*Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований
(проект № 19-08-00188).*

ИНЖЕНЕРНЫЕ АСПЕКТЫ СИНТЕЗА БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ

В.В. Будаева, И.Н. Павлов, А.Е. Ситникова

Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения РАН, Бийск, Россия

Бактериальная наноцеллюлоза (БНЦ) относится к одному из трех видов целлюлозы с наноразмерной толщиной микрофибрилл, синтез которой осуществляется с помощью бактерии *Acetobacter xylinum*, переименованной позднее в *Glucoconacetobacter xylinum*, в 2012 году в *Komagataeibacter xylinus* [1, 2]. Синтез БНЦ является превосходным природным процессом получения наноразмерной целлюлозы, введение которой в композиционные продукты в иных случаях радикально меняет свойства и открывает горизонты для создания качественно новых продуктов и оказания жизненно необходимых услуг [3–6]. Ценность БНЦ дополнительно обусловлена возможностью получения из неё классической нанокристаллической целлюлозы, но при условии высокой степени кристалличности в нативной БНЦ. Кроме того, области применения БНЦ в виде гидрогеля и в сухом виде постоянно расширяются, включая все новые продукты [7].

Мировое научное сообщество обсуждало возможность создания крупного глобального производства БНЦ мощностью 504 тонны в год, которое могло бы стать не только базовым заводом для совершенствования производства, но и обеспечило потребности в БНЦ, в первую очередь при лечении обширных ран и ожогов в медицине катастроф [5, 8]. Но эта тема осталась на стадии пожеланий и обсуждения, поскольку расчетные капитальные вложения промышленного предприятия для 504 тонн БНЦ в год составляют около 13 млн долларов, стоимость производства БНЦ оценивается в 7,4 млн долларов в год, а чистая прибыль – 3,3 млн долларов в год [3,5]. Поэтому создание собственного производства БНЦ каждая страна рассматривает как острую необходимость в жизнеобеспечении своего населения. Но в РФ, несмотря на известные научные школы исследования БНЦ [9–13], нет собственного производства этого наукоемкого продукта.

Целью наших исследований являлась разработка инженерных аспектов синтеза БНЦ, опираясь на отечественное сырье, особенности географической зоны, уровень развития химии и биотехнологии в РФ, доступность реагентов и оборудования для масштабирования процесса, кадровые ресурсы.

Исследования были начаты в инициативном порядке, но с момента действия гранта РНФ (2017 г.) стали систематическим с нарастающей скоростью процессом, включающим в себя попытки масштабирования отдельных стадий биосинтеза, предоставление полученных образцов БНЦ всем организациям, проявившим интерес к продукту, и обязательную публичность полученных результатов. Пандемия в начале 2020 года внесла негативные корректировки в деятельность научной группы гранта РНФ, в частности, стало невозможно предоставлять БНЦ в медицинские университеты и центры, как следствие, отсутствуют новые результаты масштабного эксперимента на животных в РФ. Но неожиданно начали более активно рассматриваться технические области применения БНЦ, в частности в процессах получения наноуглерода.

Разработанные научной группой гранта РНФ инженерные аспекты синтеза БНЦ включают в себя следующие положения: использование доступных источников углерода, способных обеспечить промышленный биосинтез БНЦ; авторская технология получения питательных сред; стабильность продуцента при масштабировании биосинтеза; статический способ культивирования, как единственно возможный для получения многофункциональной БНЦ; допускаются разновидности статического культивирования БНЦ; возможность получения образцов БНЦ массой десятки кг на первоначальном этапе для оценки качества полупродуктов; последовательность стадий отражает схема аппаратно-технологической установки авторской технологии синтеза БНЦ (рисунок 1); технологическое обеспечение сроков хранения гелевой пленки БНЦ.

Краткое описание разработанной технологии приведено с указанием позиций оборудования (рисунок 1). В качестве источников сырья научно обоснованы и экспериментально подтверждены шелуха овса (промышленные целлюлозосодержащие отходы при производстве геркулеса из овса) [14, 15] и новый для РФ вид энергетических растений мискантус – многолетняя трава, произрастающая с высокой урожайностью в условиях Западной Сибири [16, 17].

Химическая предварительная обработка этих видов сырья (реактор 1, мерник 2, теплообменник 3, фильтр емкостной 4) предполагает получение качественных субстратов [18], ферментативный гидролиз которых (установка водоподготовки 7, 100-л ферментер 9, центрифуга 10) приводит к получению преимущественно глюкозных растворов [19]. Эти глюкозные растворы – основа питательных сред при синтезе БНЦ [20] (емкость культуральной среды 11, стерилизатор 12, инкубатор Binder KB 400 15, ванна промывки 16–19), в качестве продуцента используется симбиотическая культура *Medusomyces gisevii* Sa-12 [21]. Данная схема предполагает стерилизацию готовых образцов гель-пленки БНЦ и упаковку в контейнеры для транспортировки (стерилизатор паровой 20, контейнер 21, – ящик 22). Подробное описание технологии получения БНЦ из шелухи овса приведено в работе [22].

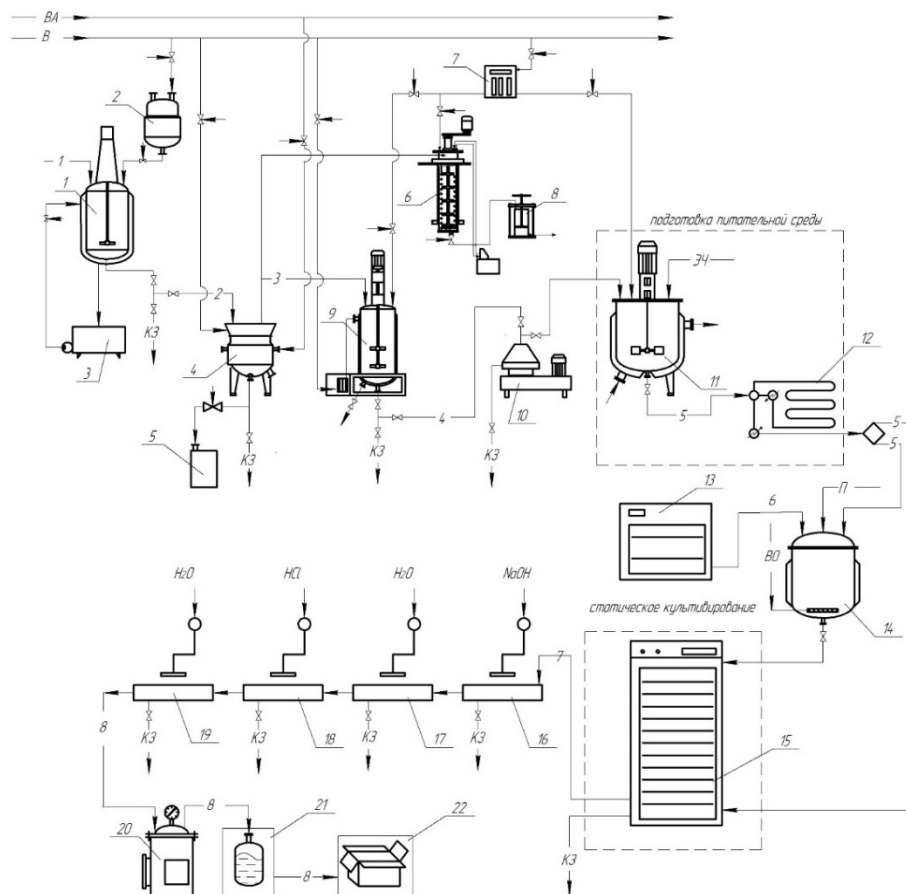


Рисунок 1 – Схема аппаратно-технологической установки технологии синтеза БНЦ: 1 – реактор, 2 – мерник, 3 – теплообменник, 4 – фильтр емкостной, 5 – сборник, 6 – 11-л ферментатор, 7 – установка водоподготовки, 8 – пресс корзиночный, 9 – 100-л ферментер, 10 – центрифуга, 11 – емкость культуральной среды, 12 – стерилизатор, 13 – термостат суховоздушный, 14 – смеситель, 15 – инкубатор Binder KB 400, 16–19 – ванна промывки, 20 – стерилизатор паровой, 21 – контейнер, 22 – ящик.

На полупродукты и целевой продукт БНЦ разработаны технические условия.

Следует подчеркнуть, что научно обоснованные и экспериментально подтвержденные инженерные аспекты синтеза БНЦ соответствуют мировому тренду, утверждающему конкурентоспособность производства БНЦ в отношении технологий выделения целлюлозы из растительного сырья с целью применения в определенных областях. Научоёмкость авторских технических решений обусловлена поиском источников сырья, выбором условий химической предварительной обработки, обоснованием продуцента и обоснованным статическим ведением синтеза БНЦ. Кроме того, проведенное в сжатые сроки масштабирование синтеза БНЦ с получением цельных образцов массой 17 кг, химическая модификация БНЦ в востребованные продукты дополнительно подтверждает лидирующее положение разработанной технологии [23–26].

По мнению автора [3] со ссылками на современные экономические источники рынок БНЦ составит 497,76 млн. долларов США в 2022 году и превысит 700 млн. долларов США в 2026 году. С учетом курса РФ на высокотехнологические производства, в стране имеются все условия для создания собственных заводов синтеза БНЦ.

Работа выполнялась при использовании приборной базы Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (ИПХЭТ СО РАН, г. Бийск).

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-19-01054)

Литература

1. Urbina L., Corcuera M.Á. et al. A review of bacterial cellulose: sustainable production from agricultural waste and applications in various fields // *Cellulose*. 2021. P. 1–25. <https://doi.org/10.1007/s10570-021-04020-4>.
2. Klemm D., Petzold-Welcke K. et al. Biotech nanocellulose: A review on progress in product design and today's state of technical and medical applications // *Carbohydr Polym*. 2021. 254. P. 117313. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117313>
3. Zhong C. Industrial-Scale Production and Applications of Bacterial Cellulose // *Front. Bioeng. Biotechnol*. 2020. 8. P. 605374. doi: 10.3389/fbioe.2020.605374.
4. Klemm, D., Cranston, E.D. et al. Nanocellulose as a natural source for groundbreaking applications in materials science: Today's state // *Mater. Today*. 2018. 21, P. 720–748. doi: 10.1016/j.mattod.2018.02.001.
5. Bacterial NanoCellulose from biotechnology to bio-economy / Edited by Gama M. et al. Elsevier. 2016. 240 p.
6. Anton-Sales I., Roig-Sanchez S. et al. In vivo soft tissue reinforcement with bacterial nanocellulose // *Biomater. Sci*. 2021. 9. P. 3040–3050. doi: 10.1039/d1bm00025j.
7. Gorgieva S. Bacterial cellulose as a versatile platform for research and development of biomedical materials // *Processes* 2020. 8. P. 624. doi: 10.3390/pr8050624.
8. Portela, R., Leal, C.R. et al. Bacterial cellulose: a versatile biopolymer for wound dressing applications // *Microb. Biotechnol*. 2019. 12. P. 586–610. doi: 10.1111/1751-7915.13392.
9. Khripunov A.K., Tkachenko A.A. et al. Formation of a composite from se0 nanoparticles stabilized with polyvinylpyrrolidone and Acetobacter xylinum cellulose gel films // *Russian Journal of Applied Chemistry*. 2007. T. 80. № 9. C. 1549–1557.
10. Volova, T.G., Shumilova, A.A. et al. Antibacterial properties of films of cellulose composites with silver nanoparticles and antibiotics // *Polym. Test*. 2018. 65, P. 54–68. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2017.10.023>.
11. Gromovykh, T.I., Pigaleva, M.A. et al. Structural organization of bacterial cellulose: The origin of anisotropy and layered structures // *Carbohydr Polym*. 2020. 237. P. 116140. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116140>.
12. Revin V., Liyaskina E. et al. Cost-effective production of bacterial cellulose using acidic food industry by-products // *Braz J Microbiol*. 2018. 49. P. 151–159. <https://doi.org/10.1016/J.BJM.2017.12.012>
13. Stepanov N., Efremenko E. «Deceived» concentrated immobilized cells as biocatalyst for intensive bacterial cellulose production from various sources // *Catalysts*. 2018. Vol. 8, № 1. P. 33. <https://doi.org/10.3390/catal8010033>.
14. Sakovich G.V., Skiba E.A. et al. Technological Fundamentals of Bacterial Nanocellulose Production from Zero Prime-Cost Feedstock // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2017. Vol. 477. P. 357–359. DOI: 10.1134/S1607672917060047.
15. Aleshina L.A. et al. X-ray Diffraction Study of Bacterial Nanocellulose Produced by the *Medusomyces Gisevii* Sa-12 Culture in Enzymatic Hydrolysates of Oat Hulls // *Crystallography Reports*. 2018. Vol. 63, No. 6. P. 955–960.
16. Aleshina L.A., Gladysheva E.K. et al. X-ray Diffraction Study of Bacterial Nanocellulose Produced by *Medusomyces Gisevii* Sa-12 Cultured in Enzymatic Hydrolysates of *Miscanthus* // *Crystallography Reports*. 2019. Vol. 64, No. 6. P. 914–919. doi: 10.1134/S1063774519060026.
17. Sakovich G.V., Skiba E.A. et al. *Miscanthus* is the feedstock for bacterial nanocellulose production // *Doklady Chemistry*. 2020. Vol. 495, Part 2. P. 205–208. DOI: 10.1134/S0012500820120034.
18. Kashcheyeva E.I., Gismatulina Y.A. et al. Pretreatments of Non-Woody Cellulosic Feedstocks for Bacterial Cellulose Synthesis // *Polymers*. 2019. 11(10). P. 1645. doi:10.3390/polym11101645.
19. Sakovich G.V., Skiba E.A. et al. Technological Fundamentals of Bacterial Nanocellulose Production from Zero Prime-Cost Feedstock // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2017. Vol. 477. P. 357–359. DOI: 10.1134/S1607672917060047.
20. Skiba E.A. et al. Self-standardization of quality of bacterial cellulose produced by *Medusomyces gisevii* in nutrient media derived from *Miscanthus* biomass // *Carbohydr Polym*. 2021. 252. P. 117178. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117178>.
21. Gladysheva E.K., Skiba E.A. et al. Study of the Conditions for the Biosynthesis of Bacterial Cellulose by the Producer *Medusomyces gisevii* Sa-12 // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2018. Vol. 54, No. 2. P. 179–187. DOI: 10.1134/S0003683818020035.
22. Skiba E.A., Budaeva V.V. et al. A technology for pilot production of bacterial cellulose from oat hulls // *Chem Eng J*. 2021. 383. P. 123128. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.123128>.
23. Gismatulina Yu. A., Gladysheva E.K. et al. Synthesis of bacterial cellulose nitrates // *Russ. Chem. Bull*. 2019. 68 P. 2130–2133. doi:10.1007/s11172-019-2678-x.
24. Budaeva V.V., Gismatulina Y.A. et al. Bacterial Nanocellulose Nitrates. *Nanomaterials*. 2019. 9. P. 1694. doi:10.3390/nano9121694.
25. Shavyrkina N.A., Budaeva V.V. et al. Scale-up of biosynthesis process of bacterial nanocellulose // *Polymers* 2021. 13(12). P. 1920. <https://doi.org/10.3390/polym13121920>.
26. Skiba E.A., Shavyrkina N.A. et al. Biosynthesis of Bacterial Cellulose by Extended Cultivation with Multiple Removal of BC Pellicles // *Polymers*. 2021. 13. P. 2118. <https://doi.org/10.3390/polym13132118>

УДК 577.15

ФЕРМЕНТЫ БИОСИНТЕЗА ОКСИЛИПИНОВ: ПОЛУЧЕНИЕ И БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА**С.С. Горина, Л.Ш. Мухтарова, Я.Ю. Топоркова, А.Н. Гречкин***Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия*

Окислительный метаболизм полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) дает начало обширной и разнообразной группе биологически активных соединений – оксилипинов. Они широко представлены в различных таксономических группах, включая животные, грибы, растения, бактерии, водоросли и др. [1, 2]. Среди оксилипинов млекопитающих наиболее изученной группой являются эйкозаноиды, играющие роль медиаторов воспалительных и инфекционных процессов [3]. Исследования оксилипинов растений в значительной степени сосредоточены на жасмонатах и их роли в регуляции процессов роста и развития, а также защиты при биотическом и абиотическом стрессе [4, 5]. Оксилипины других таксонов менее изучены по сравнению с таковыми растений и млекопитающих. Показано, что у грибов они могут выступать сигнальными молекулами при взаимодействии патоген / хозяин [6], координировать процессы развития, размножения и синтеза вторичных метаболитов [7]. Оксилипины водорослей могут обладать схожими функциями, участвуя в защитных механизмах в качестве сигнальных медиаторов [8] либо воздействуют напрямую на патогенные организмы [9].

Структурное разнообразие оксилипинов, наряду с не ферментативными преобразованиями, обусловлено координированным действием различных ферментов включающих липазы, липоксигеназы, циклооксигеназы, α -диоксигеназы, а также цитохромы P450, пероксигеназы, редуктазы и др. [10]. Наши работы в значительной степени были сосредоточены на изучении растительных цитохромов P450 семейства CYP74 (алленоксидсинтазах (АОС), гидропероксидлиазах (ГПЛ), дивинилэфирсинтазах (ДЭС), эпоксиалкогольсинтазах (ЭАС)) и синтезируемых при их участии оксилипинах. Нами были описаны первые 13-специфичные ДЭС [11, 12], обнаружены первые растительные ЭАС [13,14] и необычные дуалистичные ферменты [15], получены мутантные формы ферментов CYP74 с полной или частичной конверсией катализа [15, 16]. Ферменты CYP74 специализируются на метаболизме гидроперекисей ПНЖК и, в отличие от классических цитохромов P450, не требуют молекулярного кислорода или НАД(Ф)Н-зависимых редуктаз для протекания реакции, поскольку они используют гидроперекись в качестве субстрата и источника кислорода [17]. Интересно, что сходные по своей структуре оксилипины, продуцируемые при участии ферментов CYP74, были обнаружены у представителей беспозвоночных типа стрекающих и ряда патогенных грибов. Однако за их биосинтез отвечают не ферменты CYP74, а каталазы [18, 19], которые в основном известны своим участием в метаболизме перекиси водорода. Таким образом, объектом данного исследования были ферменты CYP74 растений (*Asparagus officinalis*, *Solanum tuberosum*, *Physcomitrella patens*), а также каталаза-подобные белки кораллов (*Dendronephthya gigantea*) и грибов (*Fusarium proliferatum*).

Для наработки соответствующих рекомбинантных белков открытые рамки считывания целевых генов были клонированы в вектор pET-23a (+) (Novagen, USA). Правильность сборки и отсутствие сдвигов рамки считывания полученных генетических конструкций проверяли с помощью ДНК-анализатора ga3130 (Applied Biosystems, США). Для отработки процедуры получения рекомбинантных белков и последующей их очистки, полученные генетические конструкции трансформировали в экспрессирующий штамм *E. coli* BL21(DE3)pLysS, обеспечивающий высокий выход белка при контролируемом уровне экспрессии, что осуществляется за счет делеции в гене *lacY1*, приводящей к ограничению активного транспорта лактозы (и, как следствие, изо-пропил- β -D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ) – аналога лактозы) в клетки с помощью *lac*-пермеазы. Таким образом, в ходе роста клеток в присутствии ИПТГ, обеспечивается его равномерное распределение и, следовательно, концентрационнонезависимый уровень индукции экспрессии целевого гена и синтез целевого белка. При этом наличие дополнительной плазмиды pLysS содержащей ген, кодирующий T7 лизоцим, позволяет подавить возмжность базальной экспрессии T7 РНК-полимеразы до внесения ИПТГ. Гетерологическую экспрессию проводили в смешанной среде содержащей равные части среды LB (1 % пептона, 0.5 % дрожжевого экстракта, 1 % NaCl) и M9 (0.6 % Na₂HPO₄, 0.3 % KH₂PO₄, 0.05 % NaCl, 0.1 % NH₄Cl). Наличие целевого белка, а также его количество оценивали по результатам электрофоретического разделения белков в полиакриламидном геле. Поскольку для наработки целевых белков использовался вектор pET-23a (+), то рекомбинантные белки имели на С-концах His-метки, позволяющие проводить очистку методом металл-аффинной хроматографии.

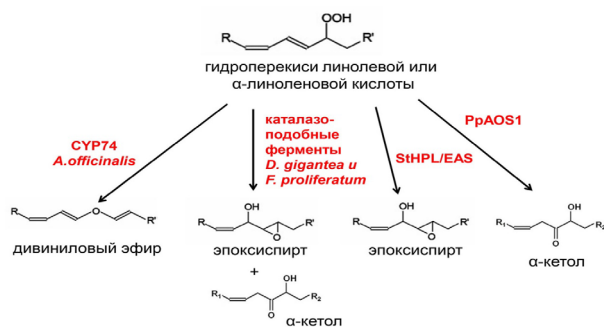


Рисунок. Схематическое изображение реакций, катализируемых целевыми ферментами *A. officinalis*, *D. gigantea*, *F. proliferatum*, а также StHPL/EAS и PpAOS1.

Синтезированные продукты были аналогичны оксипипинам, синтезируемым при участии рекомбинантных ферментов AOC *P. patens* (PpAOS1) и ГПЛ/ЭАС *S. tuberosum* (StHPL/EAS).

Работы по изучению каталазо-подобных ферментов выполнены при финансовой поддержке гранта РФФИ 20-04-01069-а. Работы по сравнительной биохимической характеристике ферментов *P. patens* и *S. tuberosum* проводились при финансовой поддержке гранта МК-903.2020.4. Биоинформационный анализ и моделирование праймеров для клонирования проводилось при финансовой поддержке государственного задания Федерального исследовательского центра "Казанский научный центр Российской академии наук".

Литература

- [1] Andreou A., Brodhun F., Feussner I. Biosynthesis of oxylipins in non-mammals. *Prog Lipid Res.* 2009. 48, 148–170.
- [2] Griffiths G. Biosynthesis and analysis of plant oxylipins. *Free Radic Res.* 2015. 49(5), 565–82.
- [3] Funk C.D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science.* 2001. 294, 1871–1875.
- [4] Wasternack C., Hause J. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany.* Ann Bot. 2013. 111, 1021–58.
- [5] Griffiths G. Jasmonates: biosynthesis, perception and signal transduction. *Essays Biochem.* 2020. 23, 501–512.
- [6] Christensen S.A., Kolomiets M.V. The lipid language of plant-fungal interactions. *Fungal Genet Biol.* 2011. 48(1), 4–14.
- [7] Gessler N.N., Filippovich S.Y., Bachurina G.P., Kharchenko E.A., Groza N.V., Belozerskaya T.A. Oxylipins and oxylipin synthesis pathways in fungi. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2017. 53, 628–639.
- [8] Bouarab K., Adas F., Gaquerel E., Kloareg B., Salaün J.P., Potin P. The Innate Immunity of a Marine Red Alga Involves Oxylipins from Both the Eicosanoid and Octadecanoid Pathways. *Plant Physiol.* 2004. 135(3), 1838–48.
- [9] Meyer N., Rettner J., Werner M., Werz O., Pohnert G. Algal Oxylipins Mediate the Resistance of Diatoms against Algicidal Bacteria. *Mar Drugs.* 2018. 16(12), 486.
- [10] Feussner I., Wasternack C. The Lipooxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology.* 2002. 53, 275–297.
- [11] Gorina S.S., Toporkova Y.Y., Mukhtarova L.S., Chechetkin I.R., Khairutdinov B.I., Gogolev Y.V., Grechkin A.N. Detection and molecular cloning of CYP74Q1 gene: identification of *Ranunculus acris* leaf divinyl ether synthase. *Biochim Biophys Acta.* 2014. 1841(9), 1227–33.
- [12] Gorina S.S., Toporkova Y.Y., Mukhtarova L.S., Smirnova E.O., Chechetkin I.R., Khairutdinov B.I., Gogolev Y.V., Grechkin A.N. Oxylipin biosynthesis in spikemoss *Selaginella moellendorffii*: Molecular cloning and identification of divinyl ether synthases CYP74M1 and CYP74M3. *Biochim Biophys Acta.* 2016. 1861(4), 301–309.
- [13] Toporkova Y.Y., Fatykhova V.S., Gorina S.S., Mukhtarova L.S., Grechkin A.N. Epoxycalcohol Synthase RjEAS (CYP74A88) from the Japanese Buttercup (*Ranunculus japonicus*): Cloning and Characterization of Catalytic Properties. *Biochemistry (Mosc).* 2019. 84(2), 171–180.
- [14] Toporkova Y.Y., Smirnova E.O., Gorina S.S., Mukhtarova L.S., Grechkin A.N. Detection of the first higher plant epoxycalcohol synthase: Molecular cloning and characterisation of the CYP74M2 enzyme of spikemoss *Selaginella moellendorffii*. *Phytochemistry.* 2018. 156, 73–82.
- [15] Toporkova Y.Y., Gorina S.S., Bessolitsyna E.K., Smirnova E.O., Fatykhova V.S., Brühlmann F., Ilyina T.M., Mukhtarova L.S., Grechkin A.N. Double function hydroperoxide lyases / epoxycalcohol synthases (CYP74C) of higher plants: identification and conversion into allene oxide synthases by site-directed mutagenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2018. 1863(4), 369–378.
- [16] Toporkova Y.Y., Ermilova V.S., Gorina S.S., Mukhtarova L.S., Osipova E.V., Gogolev Y.V., Grechkin A.N. Structure-function relationship in the CYP74 family: conversion of divinyl ether synthases into allene oxide synthases by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett.* 2013. 587(16), 2552–2558.
- [17] Brash A.R. Mechanistic aspects of CYP74 allene oxide synthases and related cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry.* 2009. 70, 1522–1531.
- [18] Boeglin W.E., Brash A.R. Cytochrome P450-type Hydroxylation and Epoxidation in a Tyrosine-liganded Hemoprotein, Catalase-related Allene Oxide Synthase *J Biol Chem.* 2012. 287, 24139–24147.
- [19] Oliu E.H., Hamberg M. An allene oxide and 12-oxophytodienoic acid are key intermediates in jasmonic acid biosynthesis by *Fusarium oxysporum* *J Lipid Res.* 2017. 58(8), 1670–1680.

УДК 504.1:674.8:633/635

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СТИМУЛЯТОРОВ РОСТА ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ
В БИОЛОГИЧЕСКОМ ЦИКЛЕ РЕКУЛЬТИВАЦИИ ПОЛИГОНОВ ТБО****А.Б. Дягилева, А.И. Смирнова, Е.В. Иванова***Санкт-Петербургский государственный университет промышленных технологий и дизайна, Санкт-Петербург, Россия*

Введение. Проблема регулирования обращения с отходами сегодня остается наиболее острой для большинства регионов России. Улучшение качества жизни населения приводит к увеличению потребительского спроса, и вместе с тем растет объем отходов вокруг населенных пунктов. Система селективного сбора позволяет решать часть проблем с оборотом вторичных ресурсов, но, к сожалению, в настоящее время уже накоплен значительный экологический ущерб окружающей среде от нерационального использования территорий различного назначения в виде полигонов бытовых отходов как организованных, так и неорганизованных. И все эти объекты требуют обязательного процесса рекультивации, который предполагает организацию работ по восстановлению нарушенных земель для последующего их целевого использования. Как показывает практика экспертной деятельности, значительная часть объектов в виде полигонов, которые в настоящее время идут на рекультивацию по программе Экология «Чистая страна», длительный период эксплуатировались без разработанной технической документации [1] с нарушением требований эксплуатации и режимов выхода на рекультивацию.

Сегодня процесс организации полигонов регламентируется постановлением правительства РФ [2], сводом правил СП 320.1325800.2017, и для реализации процессов эксплуатации и рекультивации используют материалы информационно-технического справочника (ИТС 17–2016), в котором приведены наилучшие доступные технологии (НДТ) в этой сфере деятельности.

Рекультивацию полигонов принято проводить в 2 этапа. Технический этап предполагает выбор и обоснование конкретных технических решений из перечня НДТ на основе комплекса результатов инженерных изысканий, которые проводятся специализированными аккредитованными организациями. Технический этап – самый трудоемкий и дорогой в процессе рекультивации. Биологический этап – завершающий этап рекультивации территории, в который входит комплекс агротехнических, ландшафтных, мелиорационных мероприятий, направленных на восстановление функции территории. Проведение этих работ предполагает восстановление поврежденного почвогрунта, засевание его определенными травосмесями, внесение удобрений, преимущественно минеральных, как предусмотрено в ИТС. Процесс восстановления почвогрунта достаточно длительный, но он может быть более продуктивным и эффективным по накоплению гумуса в период рекультивации при использовании специфических стимуляторов роста и новых реагентов. Для обработки почв, содержащих нефтепродукты эффективны реагенты, содержащие углеводородокисляющие биопрепараты [3]. Однако наибольшее предпочтение в технологии биологической рекультивации разработчики проектов отдают традиционным минеральным удобрениям, таким как калийные, азотные, фосфорные или комплексные, содержащие несколько видов минеральных компонентов. Большинство минеральных удобрений хорошо растворяется в воде [4], и при контакте с ливневыми водами в процессе инфильтрации эти компоненты приобретают значительную подвижность и могут вымываться по изолирующему слою в зону разгрузки потока воды. Это приводит к загрязнению ливневых сточных вод с поверхности рекультивируемого объекта особенно в начальный период биологической стадии. Поэтому важно создать естественный барьер в почвенном слое за счет стимуляции роста посевного материала с накоплением корневой биомассы культур, используемых для целей биологической рекультивации. Важным качеством новых стимуляторов роста должно является то, что они активно способствуют развитию биомассы растений и в тоже время не проявляют токсичности по отношению к биоте вновь сформированного почвенного слоя и водным экосистемам при возможном их смыывании по уклону рекультивируемого объекта.

Композиционный состав травосмесей определяется видом и особенностями территории рекультивации. Различают газонные травосмеси, луговые, для засоленных почв, болотистых грунтов для северных регионов и средней полосы России. В зависимости от климатических условий региона применяют многолетние травы, причем для рекультивации земель Северо-Западного региона принято использовать волоснец сибирский, клевер красный, мятлик луговой, мятлик обыкновенный, овсяницу луговую, тимофеевку луговую.

Целью данного этапа исследования оригинальных стимуляторов роста [5], которые потенциально могут быть использованы для биологической рекультивации, является оценка их токсичного воздействия по отношению к зоо- и фитопланктону и сравнение ростостимулирующей активности этих реагентов по развитию корневой системы высших растений, которые используются для биологической рекультивации.

Материалы и методы. В данной работе использовался реагент, полученный на основе запатентованного способа [5] получения стимуляторов роста из водной вытяжки коросодержащей массы. Основные характеристики рабочего раствора стимулятора роста модификации М₄₀₀ с длительным сроком хранения более 400 суток определялись по стандартным методикам, которые приняты в практике контроля за производственными средами и используются в аккредитованных лабораториях: ХПК 316 мгО₂/дм³, БПК 158 мгО₂/дм³, рН рабочего раствора – 6.9, насыщенность кислородом 6.9 О₂/дм³, зольность 0.06 мас.%, цветность 665⁰ КППШ. Анализ цветности проводили спектрофотометрическим методом (СФ-46М) и с помощью фотоэлектроколориметра ИПС-03, полученные результаты анализа позволили адаптировать методику по определению токсичности по отношению к объектам *Chlorella vulgaris* Beijer [6] для этих приборов, на основе полученных результатов был определен диапазон кратности разбавления рабочего раствора М₄₀₀, который укладывается в гигиенические нормативы.

Изучение токсичности стимуляторов роста проводили методом биотестирования на основе методики [7], основанной на определении смертности и изменений в плодовитости рачков *Daphnia magna* Straus. Биотестирование сегодня довольно активно используется в исследовательской практике для оценки токсичности водных объектов и водных вытяжек из отходов производства [8].

Для оценки ростостимулирующей активности использовали клевер красный (ГОСТ Р 523225 – 2005), партия 506, и овсяницу луговую. Исследования проводились согласно методики [9].

Результаты и обсуждение. На первом этапе работы были установлены необходимые кратности разбавления водных растворов стимулятора роста М₄₀₀. С помощью многоцветного культиватора KBM-05 получали результаты для оценки качества роста водорослей хлорелла. Прибор позволил минимизировать систематическую погрешность исследования за счет соблюдения одинаковых и контролируемых условий процесса: температура среды 36 °С, средняя интенсивность света 60 Вт/м², снабжение СО₂, равномерное перемешивание при одновременном выращивании 24 проб культуры водорослей. За период проведения исследования (22 часа) отмечалось значительное увеличение оптической плотности исследованных систем. За обозначенный промежуток времени действие раствора стимулятора роста М₄₀₀ отобразилось на пяти поколениях выбранных объектов.

Полученные экспериментальные данные соответствовали гигиеническому нормативу - 30 %>I<+20 %, излишний прирост или угнетение простейших не были зафиксированы при всех исследованных кратностях разбавления в диапазоне от 0 до 81. Согласно полученным данным следует, что растворы стимулятора роста М₄₀₀ укладываются в диапазон гигиенического норматива, и его воздействие не оказывает отрицательного влияния на выбранный объект окружающей среды. Исследованные растворы можно рассматривать как субстраты для получения биомассы *Chlorella vulgaris* Beijer. В последнее время к одноклеточным фотосинтезирующим организмам возникает практический интерес, связанный с потенциальными возможностями их использования как продуцентов ценных метаболитов, витаминов и ряда других органических соединений, которые сегодня востребованы [10].

Следующим этапом исследования являлось определение острой токсичности без разбавления пробы. При биотестировании на острую токсичность модификации стимуляторов роста М₄₀₀ использовали синхронизированную культуру *Daphnia magna*, полученную от одной особи путем ациклического партеногенеза в третьем поколении. Таким образом, была получена генетически однородная культура с близкими характеристиками устойчивости к токсичным веществам. Для отбора одновозрастных *Daphnia magna* использовали фильтрацию через комплект сит, для взрослых тест-объектов – сито с размером ячеек 1000–2200 мкм, для мелких – 450–560 мкм. Молоди к биотестированию не допускались.

Объекты исследования *Daphnia magna* кормили комбинированным дрожжи-водорослевым питанием с использованием *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Selenastrum*. На достоверность полученных результатов оказывает важное значение режим кормления тест-объектов: избыточное кормление приводит к снижению чувствительности и уменьшает концентрацию растворенного кислорода; недостаток питательных компонентов приводит к неадекватной реакции организма на исследуемый новый реагент. Режим питания и питательные растворы готовили согласно методики [7].

Исследование острой токсичности M_{400} на основе коросодержащего потока проводили при концентрации исходной исследуемой водной вытяжки от 1 до 100 %. С начала опыта учет смертности оценивали через час в течение 12 часов, в последующие дни – 2 раза в сутки. Если особь не двигалась в течение 15 секунд после покачивания стакана, она оценивалась как погибшая.

Хроническую токсичность проверяли на серии разбавлений, которые не вызвали острого токсического действия. Продолжительность хронического эксперимента составляла 10 суток. Учет смертности и родившейся молоди в опыте и контроле проводили один раз в сутки ежедневно. Как правило, этот эксперимент имеет продолжительность 24 суток, однако по объективным причинам его длительность пришлось сократить, поэтому последние данные являются промежуточными и требуют дополнительного исследования.

На основе полученных результатов были построены зависимости острой и хронической токсичности по выживаемости исследуемых тест-объектов от времени воздействия при различных разбавлениях рабочего раствора M_{400} . В качестве примера на рис. 1 приведены зависимости острой (1) и хронической (2) токсичности при соответствующей выживаемости тест-объектов при концентрации (%) исходного раствора M_{400} соответственно 100 и 50.

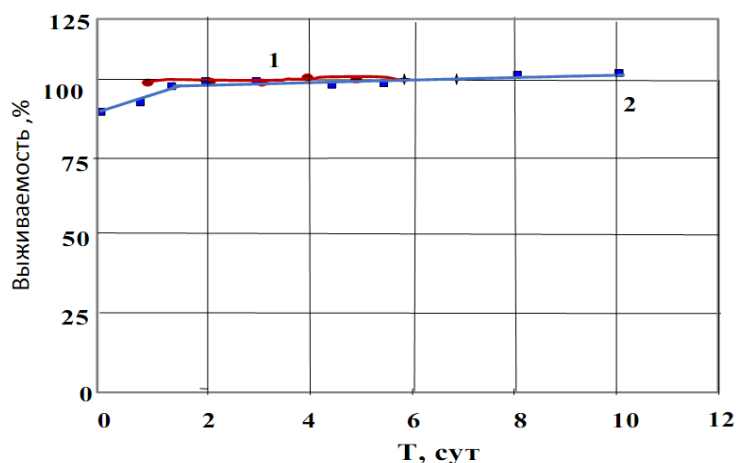


Рис. 1. Зависимость выживаемости тест-объектов от времени воздействия при оценке острой (1) и хронической (2) токсичности стимулятора роста M_{400} .

Исследования ростостимулирующей активности M_{400} на овсянице и клевере показали существенный прирост биомассы растений (более чем на 35–42 %) по сравнению с контрольными образцами, что еще раз свидетельствует о благоприятном влиянии этой модификации стимуляторов роста для высших растений [7], которые с успехом могут быть использованы для подготовки семенного материала для биологического этапа рекультивации полигонов и при этом не будут оказывать токсичного влияния на экосистемы.

Заключение. Таким образом, специально подготовленные водные экстракты из коры при переработке древесины даже после длительного

хранения в виде модификации M_{400} могут быть использованы для обработки семян, которые применяются на стадии биологической рекультивации ТБО и для восстановления продуктивности нарушенного почвогрунта.

Установлено, что исследованные водные растворы стимуляторов роста не обладают фито- и зоотоксичностью и могут быть безопасно использованы для ускорения периода биологической рекультивации. Информация об отсутствии острой и хронической токсичности на тест-объекты *Daphnia magna* Straus семейства *Daphniidae* позволяет сделать вывод, что исследованная модификация стимулятора роста M_{400} может быть охарактеризована как продукт, не несущий нагрузку на экосистему. На примере клевера и овсяницы, которые широко распространены в практике биологической рекультивации полигонов ТКО показано, что при обработке посевного материала отмечается существенный прирост биомассы растений в сравнении с контрольными образцами. Показан на качественном уровне позитивный эффект активного развития биомассы высших растений на примере клевера и овсяницы, которые широко распространены в практике биологической рекультивации полигонов ТКО.

Литература

Инструкция по проектированию, эксплуатации и рекультивации полигонов для твердых бытовых отходов. Постановление Министра России от 05.11.1996.

Дегтярева И.А. Создание и применение биоудобрения на основе эффективного консорциума микроорганизмов-деструкторов углеводов для рекультивации нефтезагрязненных почв Республики Татарстан // Нефтяное хозяйство. 2017, № 5. С. 100–103.

Най П.Х., Тинкер П.Б. Движение растворов в системе почва-растение, М., Колос, 1980, 368 с.

ГОСТ Р 59057–2020 Охрана окружающей среды. ЗЕМЛИ. Общие требования по рекультивации нарушенных земель

Патент № 2734634 RU

ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10–04. Токсикологические методы контроля. Методика измерений оптической плотности культуры водоросли хлорелла для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления. Москва: Стандартинформ. 2018. – IV. 7.

ФР.1.39.2007.03222 «Методика вод определение токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных, отходов по смертности и изменение плодовитостей дафней».

Олькова А.С., Фокина А.И. *Daphnia magna* Straus в битестировании природных и техногенных сред // Успехи современной биологии, 2015, Т.135, № 4, с. 380–389.

ГОСТ 12038–84 1986–07–01 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести. Текст: электронный // Электронный фонд правовой и нормативно-технической документации (сайт). 2003. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200023365> (дата обращения 20.04.2019).

Лукьянов В.А., Стифеев А.И., Горбунова С.Ю. Микроводоросль *Chlorellavulgaris* Beijer – высокопродуктивный штамм для сельского хозяйства // Научно-методический электронный журнал «Концепт». – 2015. – Т. 13. – С. 1576–1580. – URL: <http://e-koncept.ru/2015/85316.htm>.

УДК 579.66

БАКТЕРИИ СОДОВОГО ШЛАМОХРАНИЛИЩА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРОДУЦЕНТЫ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ С УНИКАЛЬНЫМИ СВОЙСТВАМИ**А.Ю. Максимов^{1,2}, А.В. Шилова¹, В.В. Егорова¹, В.А. Щетко³, Ю.Г. Максимова^{1,2}**¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь, Россия²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Россия³Государственное научное учреждение «Институт микробиологии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

Введение. Экстремофильные микроорганизмы и продуцируемые ими соединения в настоящее время находятся в центре внимания исследователей. Уникальные физиологические и метаболические адаптации этих микроорганизмов позволяют производить с их помощью широкий спектр химических соединений, которые находят применение в пищевой и сельскохозяйственной промышленности, медицине, фармакологии, полимерной, текстильной, бумажной, горнодобывающей и других отраслях [1–7]. Поиск и разработка новых ферментов, функционирующих в экстремальных условиях окружающей среды, в последние годы привлекают пристальное внимание научных сообществ.

Микроорганизмы, процветающие в условиях высокой щелочности, повсеместно распространены и населяют различные экологические ниши на Земле. Щелочная среда, подходящая для сообществ таких микроорганизмов, может быть создана определенными геологическими процессами или деятельностью человека. Экстремофильные бактерии, растущие при высоких pH, называются алкалофилами. Данные микроорганизмы интересны с фундаментальной точки зрения, в плане изучения механизмов адаптации бактерий к экстремальным значениям pH и взаимодействий в экосистеме, а также перспективны для биотехнологического применения.

Как упоминалось ранее, помимо природных процессов, деятельность человека также может создавать щелочную среду для обитания алкалофильных микроорганизмов. Однако работы, посвященные изучению микробиома таких искусственных щелочных биоценозов, немногочисленны [8]. Антропогенная среда эволюционирует в течение нескольких лет или десятилетий, что дает возможность наблюдать, как микробные сообщества быстро адаптируются к происходящим изменениям в окружающей среде.

Ферменты, синтезируемые данными микроорганизмами, как правило, обладают повышенной активностью и стабильностью в различных неблагоприятных условиях, в том числе при защелачивании и при высоких концентрациях соли [9–10]. Гидролитические ферменты, устойчивые к экстремальным условиям, представляют большой интерес для промышленности. В настоящее время широко применяемым классом гидролитических ферментов являются амилазы (КФ 3.2.1.1) [11–14]. Они используются преимущественно в пищевой промышленности: в хлебопечении, в переработке фруктовых соков, а также в обработке бумаги и текстиля, составляя около 25 % объема используемых промышленных ферментов. Щелочные амилазы сохраняют активность в диапазоне pH 8–11 и применяются в производстве моющих средств [15]. Помимо амилаз также возрастает практическое значение липаз (КФ 3.1.1). В последние несколько десятилетий липазы привлекают внимание учёных благодаря возможности получения с их помощью различных продуктов, представляющих интерес в промышленности. Они активны по отношению к широкому ряду субстратов, стабильны в органических растворителях, не требуют присутствия кофакторов. Липазы широко используются в биотехнологии, включая синтез биополимеров, биодизельного топлива, фармацевтических препаратов и других соединений, а также биодеструкцию техногенных загрязнителей [16]. Липазы, устойчивые к щелочной среде, востребованы в производстве моющих средств [17].

Таким образом, экстремофилы представляют большой биотехнологический интерес, обусловленный продукцией ферментов в широком диапазоне экстремальных условий. Актуальность исследования также обусловлена недостаточной изученностью бактерий щелочных антропогенных сред.

Цель исследования: изучить влияние кислотности среды и различных концентраций хлорида натрия на активность гидролитических ферментов наиболее перспективных штаммов, выделенных из содового шламохранилища, с оценкой их перспективности для биотехнологии.

Материалы и методы. Объектом исследования являлись микроорганизмы, выделенные из содового шламохранилища АО «Березниковский содовый завод», расположенного на северо-западной окраине г. Березники Пермского края, на левом берегу Камского водохранилища (59.439618, 56.715197–59.427038, 56.746573). «Березниковский содовый завод» – российское предприятие химической промышленности, крупнейший производитель кальцинированной соды по методу Сольве. Твердые отходы и промышленные сточные воды, которые образуются при производстве, поступают в шламовый коллектор и в виде пульпы подаются в отстойник – шламонакопитель. Данная система имеет щелочную реакцию среды и высокую степень минерализации за счет содержания растворенных ионов (хлориды, сульфаты, натрий, калий, аммоний).

Для исследования использовали образцы водной среды, донных отложений и прибрежного грунта содового озера техногенного происхождения. Также исследованы образцы техногенного почвоподобного образования с территории старого шламохранилища, на которой происходит естественное восстановление плодородного слоя и растительного покрова. Последние образцы отбирали с поверхности, а также с глубины 5 и 10 см.

Выделение и учет численности алкалофильных и алкалотолерантных бактерий с активностью амилазы и липазы проводили методом предельных разведений на селективных средах в отсутствие экстремальных значений pH и на богатой среде при pH 11. Высев на среде с селективными субстратами в слабощелочных условиях (pH 8) создает условия для преимущественного роста гидролитически активных бактерий с амилазной и липазной активностью.

Пробы высевали на агаризованную среду Пфеннига следующего состава (г/л): NH_4Cl – 0.3, KH_2PO_4 – 0.3, MgCl_2 – 0.3, CaCl_2 – 0.03, дрожжевой экстракт – 0.5, раствор микроэлементов по Липперту-Витману – 1 мл [18]. В качестве субстратов вносили до концентрации 1.5 %: крахмал растворимый ЗАО «ННПЦ ГИП», (Оболensk, Россия) для выделения амилаolitikов, твин-80 «FERAK», (Германия) – для липolitikов. Кислотность среды доводили 1 М раствором NaOH до 8 и инкубировали чашки при 30 °C.

Культуры, устойчивые к экстремальному защелачиванию среды, выделяли без селективных субстратов на богатой среде следующего состава (г/л): пептон – 10, глюкоза – 10, дрожжевой экстракт – 5, K_2HPO_4 – 1, Na_2CO_3 – 10, pH 11 [19].

Идентификацию изолятов до вида проводили методом секвенирования фрагмента гена 16S рПНК, амплифицированного в ПЦР-реакции с использованием универсальных праймеров 27F 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' и 1492R 5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'. Температурный цикл состоял из начальной денатурации при 95 °C в течение 3 мин, 35 циклов амплификации (денатурация при 94 °C в течение 30 с, отжиг при 54 °C в течение 30 с и элонгация при 72 °C в течение 60 с) и окончательно элонгация при 72 °C в течение 3 мин. ПЦР-ампликоны анализировали электрофоретически в 1 % агарозном геле в трис-боратном буфере при напряженности поля 5 В/см. Для оценки молекулярной массы фрагментов ДНК использовали маркеры 1 kb, ООО («СибЭнзим», Новосибирск). Визуализацию полос осуществляли путем окрашивания бромистым этидием с последующим документированием с использованием системы гелъдокументации BioDocAnalyze («Biometra», Германия). Очистку ПЦР-продукта перед секвенированием осуществляли с использованием смеси ферментов ExoSAPMix («Thermo Fisher Scientific», США). Секвенирующую реакцию проводили с праймером 27F и набором Big Dye Terminator v 3.1 («Thermo Fisher Scientific», США), в соответствии с инструкцией производителя. Анализ проводили на приборе Genetic Analyzer 3500xl («Applied Biosystems», США). Сравнение полученных нуклеотидных последовательностей генов 16S рПНК проводили с использованием он-лайн сервиса EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>).

Для определения липолитической активности изолятов, выращенных на селективной среде с твин-80, проводили биохимическую реакцию с p-нитрофениллауратом, который под действием липазы расщеплялся с образованием окрашенного продукта p-нитрофенола. Активность липазы определяли по приросту оптической плотности среды при λ 405 нм, измеренной на спектрофотометре Ultraspec 3000 («GE Healthcare», США).

Активность амилазы оценивали с помощью коммерческого набора реактивов для определения амилазы Альфа-Амилаза-Ольвекс ООО («Ольвекс Диагностикум», Россия). Реакция основана на гидролизе синтетического субстрата этилиден-р-нитрофенилмальтогептазиды с образованием нитрофенилмальтозидов, которые подвергаются дальнейшему расщеплению альфа-глюкозидазой до глюкозы и окрашенного продукта р-нитрофенола.

Активность фермента определяли по изменению оптической плотности среды при λ 405 нм на планшетном ридере Infinite M1000 («Тесан», Швейцария) в течение пяти циклов с интервалом в 1 минуту.

Для оценки влияния концентрации хлорида натрия и pH на рост и активность наиболее перспективных изолятов варьировали pH среды Пфеннига, содержащей соответствующий источник углерода, в диапазоне от 6 до 11. Добавляли NaCl до концентрации 0.5; 5; 50; 100; 200 г./л, 4 мл среды инокулировали 50 мкл культуры (ОП540 1.0). О росте бактерий судили по увеличению биомассы (мг/мл), которую определяли гравиметрически. Для этого центрифугировали суспензию клеток, полученный осадок высушивали до постоянной массы в сушильном шкафу при температуре 70 °C и взвешивали на аналитических весах. Выживаемость бактерий оценивали методом КОЕ при высеве из десятикратных разведений.

Результаты и обсуждение. Из образцов материала содового шламохранилища изолированы чистые культуры алкалофильных и алкалотолерантных микроорганизмов, обладающих гидролитической активностью в отношении полисахаридов и липидов. Проведен скрининг на амилолитическую и липолитическую активность изолятов, выделенных на среде с pH 11 и pH 8. Бактерии, обладающие активностью липазы, выделены из всех образцов. Максимальная их численность установлена в образцах техногенных поверхностных образований шламохранилища (5.7×10^9 КОЕ/г), что связано с использованием поверхностно-активных веществ в цикле производства соды и их попаданием в промывные воды. Высокая липолитическая активность отмечена у культур бактерий *Pseudomonas peli*, *Pseudoxanthomonas mexicana* и *Pseudoxanthomonas putridarboris*, максимальная активность установлена для вида *P. peli*. Для данного изолята изучено влияние различных pH и концентраций NaCl в среде на ростовые характеристики и липолитическую активность.

Установлено, что данная культура активно растёт в диапазоне pH 7–10 и 0.5–50 г./л NaCl. Несмотря на устойчивость к экстремальным условиям, максимальное накопление биомассы культуры (1.2×10^6 КОЕ/г) отмечено при pH 7 и 5 г/л NaCl, что говорит об экстремотолерантности данной культуры. Однако при одновременном воздействии различных pH и концентраций хлорида натрия активность внеклеточной липазы росла с их увеличением и достигала максимального значения 12.6 мкмоль/л/мин при pH 11 (рис. 1).

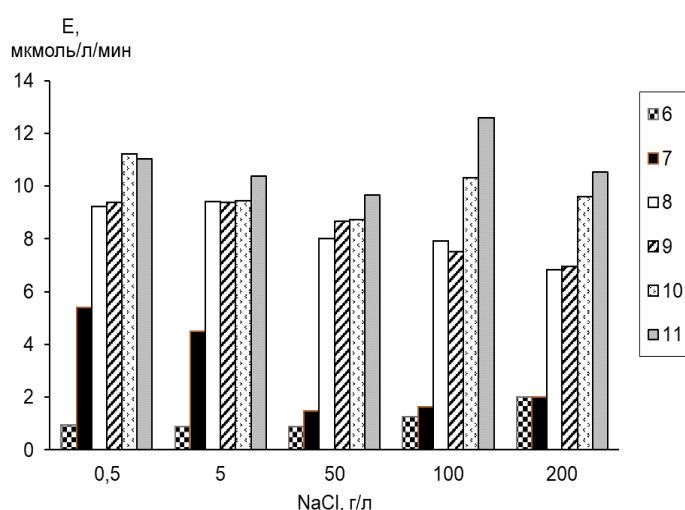


Рис. 1. Влияние pH и различных концентраций хлорида натрия на активность внеклеточных липаз *P. peli*

Также в этих средах обнаружено высокое содержание бактерий, утилизирующих полисахариды. Максимальная их численность установлена в образцах, отобранных с глубины 5 см (pH 8) с территории старого содового озера, имеющего растительный покров. Количество амилолитиков составило 3.31×10^9 КОЕ/г. Максимальная активность внеклеточной амилазы обнаружена у изолята 16-ДБ, идентифицированного как *Microbacterium kitamiense*, выделенного на богатой среде с pH 11. Активность амилазы этого штамма составляла 23.15 мкмоль/л/мин. Для данного изолята было изучено влияние pH и различных концентраций хлорида натрия на рост и амилазную активность. Диапазон роста данного изолята находился в пределах pH 7–11 и 0.5–100 г./л NaCl.

Исследована жизнеспособность *M. kitamiense* при разных значениях pH и концентрации NaCl. Максимальное количество жизнеспособных клеток выявляли при 5 г/л NaCl и pH 10 (рис. 2, а). Определена активность внеклеточных амилаз *M. kitamiense* при разных значениях pH и с различными концентрациями соли (рис. 2, б). Наибольшая активность амилазы (48.21 мкмоль/л/мин) была отмечена в культуре, выращенной при 100 г./л NaCl и pH 11.

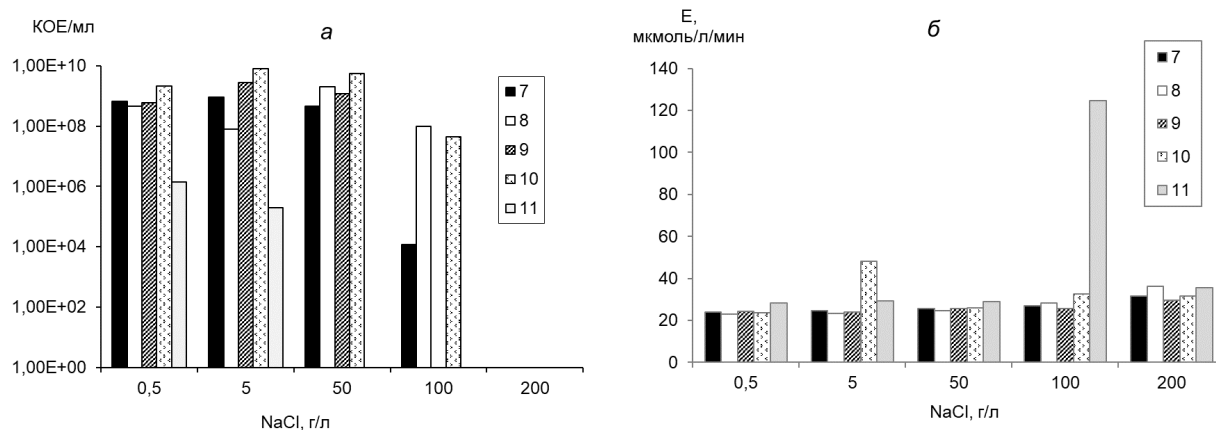


Рис. 2. Влияние pH и различных концентраций хлорида натрия на жизнеспособность (а) и активность внеклеточных амилаз (б) *M. kitamiense*

Таким образом, максимальная активность липазы была обнаружена у гамма-протеобактерий родов *Pseudomonas* и *Pseudoxanthomonas*. Липолитическая активность штамма *Pseudomonas peli* проявляется в интервале концентраций соли в среде от 0,5 до 200 г./л и изменяется незначительно. Показано, что высокая активность проявляется в широком интервале pH: от 8 до 11 с максимумом при pH 11. При этом для роста *P. peli* оптимальным значением pH было 10. Это согласуется с данными литературы, из которых известно, что липазы псевдомонад, как правило, наиболее активны в щелочной среде [20].

Лучшими продуцентами щелочной амилазы являлись актинобактерии рода *Microbacterium* – *M. kitamiense*. Их практическая значимость возрастает в связи с тем, что большинство известных амилаз наиболее активны в нейтральной и кислой среде [21, 22]. Однако ранее описаны амилазы, активные в щелочной среде, характерные также для представителя рода *Microbacterium*. В частности, у *Microbacterium foliorum* также была обнаружена амилаза с максимумом активности в щелочной области – при pH 9 [23]. Интересными и полезными особенностями культуры *M. kitamiense*, селекционированной в нашей работе, являются проявление высокой активности внеклеточной амилазы в диапазоне pH от 7 до 11, в широком диапазоне концентрации соли (до 200 г./л), с максимумом при pH 11 и концентрации соли 100 г./л. Интересным фактом является повышенная выживаемость бактерий при сочетании высокой концентрации соли и pH 10, что может быть связано с активацией мембранных транспортных процессов в щелочной среде.

Заключение. Таким образом, из образцов содового шламохранилища г. Березники были выделены и идентифицированы бактерии-продуценты гидролитических ферментов. Изолированные культуры проявляли свойства алкалотолерантных бактерий, хорошо растущих в интервале pH от 7 до 11 и алкалофилов, максимум роста которых наблюдался при pH около 10. Показано, что в техногенных щелочных средах с высокой степенью минерализации развиваются гетерогенные бактерии – продуценты гидролаз, адаптированные к уникальным экстремальным условиям среды. Селекционированы перспективные культуры алкалотолерантных бактерий, обладающие гидролазными активностями, способные активно расти в широком диапазоне pH, при этом их ферменты устойчивы в щелочной среде, характерной для многих производственных процессов. Данные культуры представляют интерес для биотехнологии как продуценты ферментов, устойчивых к высоким значениям pH и минерализации среды.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Правительства Пермского края в рамках научного проекта № С-26/507.

Литература

- Margesin R and Schinner F 2001 Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology *Extremophiles* **5**(2) 73–83
- Litchfield C D 2011 Potential for industrial products from the halophilic Archaea *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **38**(10) 1635–1647
- Yin J, Chen J C, Wu Q and Chen G Q 2015 Halophiles, coming stars for industrial biotechnology *Biotechnology advances* **33**(7) 1433–1442
- Charlesworth J C and Burns B P 2015 Untapped resources: biotechnological potential of peptides and secondary metabolites in archaea *Archaea* 1–7
- Waditee-Sirisattha R, Kageyama H and Takabe T 2016 Halophilic microorganism resources and their applications in industrial and environmental biotechnology *AIMS Microbiol* **2**(1) 42–54
- Singh A and Singh A K 2017 Haloarchaea: worth exploring for their biotechnological potential *Biotechnology letters* **39**(12) 1793–1800
- Zhang X, Lin Y and Chen G Q 2018 Halophiles as chassis for bioproduction *Advanced Biosystems* **2**(11) 1–12
- Kevbrin VV 2019 Isolation and cultivation of alkaliphiles vol 172, ed G Mamo, B Mattiasson Ed. by Mamo G., Mattiasson B. (Cham: Springer) p 53–84
- Morozkina E V, Slutskaya E S, Fedorova T V, Tugay T I, Golubeva L I and Koroleva O V 2010 Extremophilic microorganisms: biochemical adaptation and biotechnological applications *App. biochemistry and microbiology* **46**(1) 5–20
- Oren A 2010 Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms *Environ. Technol* **31**(8–9) 825–834
- Paula M and Perola O 2010 Application of microbial α -amylase in industry *Brazilian Journal of Microbiology* **4** (41) 850–861
- Yen Y C, Chun S C, Ummirul M K and Kavitha M 2013 Application of Statistical Experimental Design for Optimization of Novel α -amylase Production by *Anoxybacillus* Species *Journal of Biological Science* **7**(13) 605–613
- Serebrova S Yu 2006 Prospects for the use of enzyme preparations in gastroenterology *Russian medical journal "Diseases of organs digestion"* **1** 23–26
- Fariha H 2006 Industrial applications of microbial lipases *Enzyme and Microbial Technology* **2**(39) 235–251
- Sarethy I P, Saxena Y, Kapoor A, Sharma M, Sharma S K, Gupta V and Gupta S 2011 Alkaliphilic bacteria: applications in industrial biotechnology *Microbiol. Biotechnol.* **38**(7) 69–790
- Bezborodov A M and Zagustina N A 2014 Lipases in Catalysis Reactions in Organic Synthesis (Review) *Prikl. biochemistry and microbiology* **50**(4) 347–373
- Hasan F, Shah A A, Javed S and Hameed A. 2010 Enzymes used in detergents: lipases *Afr. J. Biotechnol* **9**(31) 4836–4844
- Randagurueva A A and Lavrentyeva E V 2009 Extracellular protease activity in natural samples of thermal springs in the Baikal region *Bulletin of the Irkutsk State University. Ser. Earth sciences* **2**(2) 162–166
- Atlas R.M. 1993 *Handbook of Microbiological Media* ed L C Parks (USA: CRC press) p 1079
- Rios N S, Pinheiro B B, Pinheiro M P, Bezerra R M, Sousa dos Santos J C and Gonçalves LRB 2018 Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: Sources, properties and applications *Process Biochem* **75** 99–120
- Mc Tighe M A, Kelly C T, Doyle E M, Fogarty W M 1995 The alkaline amylase of the alkalophilic *Bacillus* sp. IMD 370 *Enzyme Microb. Technol.* **17**(6) 570–573
- Febriani, Rayyana, Ulya M, Oesman F, Akhmaloka and Iqbalsyah T M 2019 Low molecular weight alkaline thermostable α -amylase from *Geobacillus* sp. nov. *Heliyon* **5** e02171
- Kuddus M, Roohi, Saima, and Ahmad I Z 2012 Cold-active extracellular α -amylase production from novel bacteria *Microbacterium foliorum* GA2 and *Bacillus cereus* GA6 isolated from Gangotri glacier, Western Himalaya *J. Gen. Engineer. Biotechnol* **10** (1) 151–159

ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

Ю.Г. Максимова^{1,2}, А.С. Зорина¹, Е.М. Мочалова¹, А.Ю. Максимов^{1,2}, В.А. Щетко³

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь, Россия

²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Россия

³Государственное научное учреждение «Институт микробиологии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

Иммобилизация бактериальных клеток является одним из этапов биотехнологического процесса, направленным на улучшение технических характеристик его протекания, увеличение времени эксплуатации и стабилизацию активности биокатализатора (Eş, Vieira, Amaral, 2015). При этом для каждого процесса существуют свои требования к иммобилизованным клеткам. Такие клетки микроорганизмов используют как биокатализатор трансформации органических веществ, вносят в системы очистки сточных вод для увеличения биodeградационного потенциала микробиоты или вводят в состав биофильтра, а также иммобилизованные на различных носителях микроорганизмы-биодеструкторы интродуцируют в загрязненные почвы или другие среды. В этом случае реализуется биокаталитический потенциал микробной клетки, а с помощью иммобилизации достигаются различные цели: стабилизируется ферментативная активность, увеличивается время эксплуатации биокатализатора, реализуются непрерывные процессы, упрощаются процедуры отделения продукта от реакционной среды, снижается количество отходов в виде отработанного биокатализатора. Иммобилизованные клетки в составе биосенсора служат биоселективным элементом этого устройства, и в этом случае необходимо сохранение ферментативной активности и возможность многократного и долговременного использования этого прибора. Биопрепараты для различных целей: биodeградации загрязнителей, улучшения плодородия почв, как кормовая добавка для сельскохозяйственных животных, также могут содержать в своем составе иммобилизованные микробные клетки. В этом случае важна нетоксичность, биосовместимость и сохранение ферментативной активности.

Создание иммобилизованного препарата на основе бактериальных клеток – процесс эмпирический, требующий подбора методов, носителей, условий иммобилизации, причем в зависимости от процесса, в котором этот препарат будет использоваться, требования могут отличаться. Так, для процессов биокатализа, биodeградации, биосенсорных технологий и получения сельскохозяйственных препаратов важны свои критерии (табл. 1).

Табл. 1. Значимость различных критериев для создания иммобилизованного препарата

Критерии	Биокатализ (синтез органических веществ)	Биodeградация (очистка окружающей среды)	Биосенсорные технологии	Биопрепараты
Низкая стоимость	+	++	+	++
Возможность получения больших объемов	+	++	+	++
Нетоксичность	-	+	+	++
Высокая ферментативная активность клеток	++	++	++	++
Высокая стабильность	++	++	++	+

Примечание: ++ существенно, + желательно, – необязательно

Для создания иммобилизованного биокатализатора необходимо выполнить ряд экспериментов, которые позволят сделать вывод об эффективности полученного препарата (рис. 1). Во-первых, если осуществляется адгезия клеток на носителе, важно, чтобы поверхность носителя совпадала по степени гидрофобности с поверхностью клетки. Кроме того, как было подтверждено нашими данными, величина адгезии клеток бактерий больше на высокодисперсном, макропористом материале с шероховатой поверхностью (Максимова и др., 2019).

Во-вторых, необходимо сохранение ферментативной активности и возможность многократного использования биокатализатора, которая может быть выражена через понятие "операционная стабильность" и оценена по количеству последовательных циклов реакции, в которых сохраняется не менее 50 % ферментативной активности. Для непрерывных процессов это понятие может включать в себя время функционирования реактора без снижения его продуктивности.

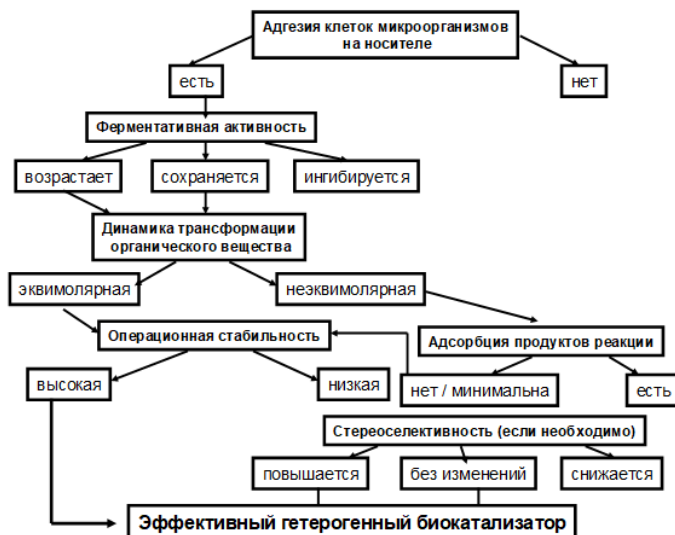


Рис. 1. Алгоритм разработки гетерогенного биокатализатора на основе адгезированных клеток микроорганизмов

Способы иммобилизации бактериальных клеток могут быть разделены условно на 2 большие группы: 1) иммобилизация на поверхности материала носителя, которая может происходить путем адсорбции (адгезии) и ковалентной сшивкой макромолекул поверхности клеток с молекулами материала носителя; 2) иммобилизация в структуре материала носителя, которая может обеспечиваться включением в гель и инкапсуляцией (Кощеенко, 1981; Еф, Vieira, Amaral, 2015). Биопленки как самоиммобилизованные сообщества могут также являться гетерогенным биокатализатором, и использоваться в процессах синтеза органических веществ, например, спиртов и органических кислот (Qureshi et al., 2005; Halan et al., 2012), в системах очистки стоков (Плакунов, Николаев, 2018), в качестве биоселектирующего агента биосенсора, например, для определения

показателя биологического потребления кислорода (Chappell, Freemont, 2011; Пономарева и др., 2011). Биопрепараты тоже могут быть приготовлены в виде иммобилизованных клеток.

Исходя из требований различных процессов, такой способ иммобилизации бактериальных клеток, как включение в материал носителя, пригоден для разработки биоселектирующего агента в биосенсорах, получения биопрепаратов, в некоторых случаях для биокатализа, но за редким исключением мало пригоден для крупномасштабных процессов биоочистки и биodeградации из-за высокой стоимости (табл. 2). Получение биопленок возможно для всех перечисленных процессов, а адгезия из выращенной культуры подходит для биокатализа, биodeградации и получения биопрепаратов, тогда как в биосенсорах этот метод может быть неэффективен из-за потери клеток в процессе многократного использования.

Табл. 2. Наиболее предпочтительные методы иммобилизации микробных клеток в биотехнологических процессах

Методы Процессы	Включение в структуру геля или инкапсуляция	Адгезия выращенных клеток	Биопленки
Биокатализ	+	+	+
Биodeградация	-	+	+
Биосенсоры	+	-	+
Биопрепараты	+	+	+

Иммобилизованные клетки имеют преимущество перед свободными в процессах биокатализа и биodeградации. В лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии "ИЭГМ УрО РАН" были разработаны иммобилизованные биокатализаторы на основе клеток нитрилгидролизующих бактерий для синтеза акриламида и акриловой кислоты из акрилонитрила (Максимова и др., 2010), а также как основа биоселектирующего элемента биосенсора для определения акриламида в виде клеток *Alcaligenes faecalis* 2 и *Rhodococcus erythropolis* 4-1, иммобилизованных в структуре геля альгината бария и агарозы (Мочалова, Максимова, 2020). Начаты разработки бактериальных препаратов на основе клеток *Pseudomonas peli* с липазной активностью, включенных в структуру различных гелей.

Примеры использования иммобилизованных клеток бактерий в очистке окружающей среды разнообразны и отличаются по способу иммобилизации, используемому носителю, очищаемой среде (вода, почва, воздух) и токсичному веществу, от которого производится очистка. Наиболее широкое применение иммобилизованные клетки нашли в очистке вод различных производственных процессов. Для биodeградации поллютантов, присутствующих в сточных водах, в том числе представляющих собой трудноокисляемые и токсичные вещества, применяются клетки микроорганизмов, адсорбированные на нерастворимых носителях и иммобилизованные в структуре гелей (Кобызева и др., 2009; Chen et al., 2010). Для детоксикации паров акрилонитрила, цианидов, цианатов и тиоцианатов используют клетки с нитрилгидролизующей активностью, иммобилизованные в структуре геля (Cantarella et al., 2010). Мембранные технологии достаточно распространены и применяются для удаления из сточных вод загрязняющих веществ: фармацевтических препаратов, стероидных гормонов, фитоэстрогенов, пестицидов, фосфора (Kelly, He, 2014; Wijekoon et al., 2013). Также иммобилизованные микроорганизмы (био пленки) эффективно удаляют азот из сточных вод (Вдовина и др., 2020), используются для детоксикации определенных загрязнителей, например, нитрилов в биофильтрах (Зорина, Максимова, 2015). Известен положительный опыт применения иммобилизованных алканотрофных микроорганизмов для нефтяной ремедиации (Ившина и др., 2018), в анаэробной очистке сточных вод, сопровождающейся метаногенезом (Сенько, Ефременко, 2018).

В настоящее время иммобилизация клеток становится привлекательным способом интеграции цельных клеток в биосенсоры для поддержания долговременной жизнеспособности клеток и повышения воспроизводимости реакции. Также иммобилизация позволяет избежать попадания генетически модифицированных организмов в окружающую среду при использовании аналитических приборов в полевых условиях (Michelini, Roda, 2012). Повышение надежности и чувствительности микробных биосенсоров зависит от способа иммобилизации клеток. Чрезвычайно перспективным является использование новых материалов, в том числе наночастиц золота, углеродных нанотрубок или квантовых точек (Сазыкина, Мирина, Сазыкин, 2015). Микробные биосенсоры могут быть "био пленочного" типа, например, биосенсоры для определения биохимического потребления кислорода в водных образцах. Для них характерно наличие слоя цельноклеточной микробной пленки в качестве биологического распознающего элемента между пористой и газопроницаемой мембранами кислородного электрода (Понаморева и др., 2011; Каманин и др., 2012). Среди методов иммобилизации микробных клеток в биосенсорах и топливных элементах можно упомянуть адсорбцию, ковалентное связывание, перекрестную сшивку, инкапсуляцию и захват в структуре гелей (Решетилов, Плеханова, 2018; Michelini, Roda, 2012). Несмотря на то, что метод адсорбции считается популярным, простым и дешевым в применении, для него характерно постепенное вымывание клеточной биомассы с матрицы носителя в результате многократного использования биокатализатора (Velkova et al., 2018).

В целом, иммобилизация клеток может быть успешна для трансформации простых субстратов, тогда как конверсия иммобилизованными клетками соединений, обладающих сложной пространственной структурой, имеющих ароматические кольца в своем составе, может быть неэффективной из-за диффузионных затруднений. Таким образом, чем сложнее соединение, тем труднее достичь эффективности трансформации вещества, наблюдаемой для свободных клеток. Так, при конверсии ароматических нитрилов активность иммобилизованных клеток в сравнении с суспензией была в 1,5–4 раза ниже (Максимова и др., 2013), тогда как при конверсии алифатических субстратов активность даже превышала таковую свободных клеток (Максимова и др., 2010). Попытки конверсии сложных в пространственном отношении веществ часто не достигают успеха.

Таким образом, для создания иммобилизованного биокатализатора следует проанализировать ряд параметров, среди которых: величина адгезии клеток на носителе (в случае, если используют метод иммобилизации на поверхности), сохранение ферментативной активности и операционная стабильность биокатализатора. Знание ряда закономерностей получения эффективного иммобилизованного биокатализатора позволяет интенсифицировать процесс и сократить количество экспериментов, необходимых для его оценки.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Правительства Пермского края в рамках научного проекта № С-26/507.

Литература

- Eş I., Vieira J.D.G., Amaral A.C. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015. № 99. P. 2065–2082.
- Макимова Ю.Г., Максимов А.Ю., Демаков В.А. Адгезия бактериальных клеток на углеродных носителях: характеристики процесса и применение в биотехнологии // *Вестник Пермского федерального исследовательского центра.* 2019. № 3. С. 86–93.
- Кощеев К.А. Живые иммобилизованные клетки как биокатализаторы процессов трансформации и биосинтеза органических соединений // *Прикладная биохимия и микробиология.* 1981. Т. 17. Вып. 4. С. 477–493.
- Qureshi N., Annous B.A., Ezeji T.C., Karcher P., Maddox I.S. Biofilm reactors for industrial bioconversion processes: employing potential of enhanced reaction rates // *Microb Cell Fact.* 2005. V. 4:24.
- Halan B., Buehler K., Schmid A. Biofilms as living catalysts in continuous chemical syntheses // *Trends Biotechnol.* 2012. V. 30. N. 9. P. 453–465.
- Плакунов В.К., Николаев Ю.А. Микробные биопленки: перспективы использования при очистке сточных вод // *Вода: химия и экология.* 2008. № 2. С. 11–13.
- Chappell J., Freemont P.S. Synthetic biology – a new generation of biofilm biosensors // *In Book: The Science and Applications of Synthetic and System Biology.* The National Academies Press, Washington DC, 2011. P. 159–178.
- Понаморева О.Н., Арляпов В.А., Алфёров В.А., Решетиллов А.Н. Микробные биосенсоры для определения биологического потребления кислорода (обзор) // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2011. Т. 47, № 1. С. 5–15.
- Макимова Ю.Г., Максимов А.Ю., Демаков В.А., Козлов С.В., Овечкина Г.В., Олонцев В.Ф. Гидролиз акрилонитрила клетками нитрилконвертирующих бактерий, иммобилизованными на волокнистых углеродных адсорбентах // *Биотехнология.* 2010. № 4. С. 51–58.
- Мочалова Е.М., Макимова Ю.Г. Иммобилизация клеток нитрилгидролизующих бактерий *Rhodococcus erythropolis* 4–1 и *Alcaligenes faecalis* 2 с использованием термотропных и ионотропных гелей // *Вестник Пермского университета. Серия биология.* 2020. Вып. 1. С. 26–32.
- Кобызева Н.В., Гатауллин А.Г., Силищев Н.Н., Логинов О.Н. Разработка технологии очистки сточной воды с использованием иммобилизованной микрофлоры // *Вестник ОГУ.* 2009. № 1. С. 104–107.
- Chen C.Y., Chen S.C., Fingas M., Kao C.M. Biodegradation of propionitrile by *Klebsiella oxytoca* immobilized in alginate and cellulose triacetate gel // *Journal of Hazardous Materials.* 2010. V. 177. P. 856–863.
- Cantarella L., Gallifuoco A., Malandra A., Martinkova L., Pasquarelli F., Spera A., Cantarella M. Application of continuous stirred membrane reactor to 3-цианопиридин биоconversion using the nitrile hydratase–amidase cascade system of *M. imperiale* CBS 498–74 // *Enzyme and Microbial Technology.* 2010. V. 47. P. 64–70.
- Kelly P.T., He Z. Nutrients removal and recovery in bioelectrochemical systems: A review // *Bioresource Technology.* 2014. V. 153. P. 351–360.
- Wijekoon K.C., Hai F.I., Kang J., Price W.E., Guo W., Ngo H.N., Nghiem L.D. The fate of pharmaceuticals, steroid hormones, phytoestrogens, UV-filters and pesticides during MBR treatment // *Bioresource Technology.* 2013. V. 144. P. 247–254.
- Вдовина Т.В., Сироткин А.С., Кобелева И.В., Горшкова Е.С. Биоаугментация нитрифицирующих микроорганизмов для повышения эффективности окисления соединений азота в процессе биофильтрации сточных вод // *Биотехнология.* 2020. Т. 36, № 2. С. 99–107.
- Зорина А.С., Макимова Ю.Г. Иммобилизованные нитрилгидролизующие бактерии для систем биофильтрации // *Российский иммунологический журнал.* 2015. Т. 9(18), № 2(1). С. 733–735.
- Ившина И.Б., Куюкина М.С., Криворучко А.В. Иммобилизация углеводородокисляющих родококков как фактор усиления нефтяной ремедиации // В книге: *Иммобилизованные клетки: биокатализаторы и процессы.* Под ред. Е.Н. Ефременко. М.: РИОР, 2018. С. 409–428.
- Сенько О.В., Ефременко Е.Н. Иммобилизованные биокатализаторы в системах получения биогаза и анаэробной очистки сточных вод // В книге: *Иммобилизованные клетки: биокатализаторы и процессы.* Под ред. Е.Н. Ефременко. М.: РИОР, 2018. С. 429–459.
- Michelini E., Roda A. Staying alive: new perspectives on cell immobilization for biosensing purposes // *Anal. Bioanal. Chem.* 2012. № 402. P. 1785–1797.
- Сазыкина М.А., Мирина Е.А., Сазыкин И.С. Использование биосенсоров для детекции антропогенного загрязнения природных вод // *Вода: Химия и Экология.* 2015. № 10. С. 64–74.
- Каманин С.С., Арляпов В.А., Понаморева О.Н., Алфёров В.А., Решетиллов А.Н. БПК-биосенсор на основе ассоциации дрожжевых штаммов // *Вода: Химия и Экология.* 2012. № 3. С. 74–81.
- Решетиллов А.Н., Плеханова Ю.В. Биосенсорные системы и топливные элементы на основе микробных клеток // В книге: *Иммобилизованные клетки: биокатализаторы и процессы.* Под ред. Е.Н. Ефременко. М.: РИОР, 2018. С. 211–256.
- Velkova Z., Kirova G., Stoytcheva M., Kostadinova S., Todorova K., Gochev V. Immobilized microbial biosorbents for heavy metals removal // *Eng. Life Sci.* 2018. V. 18. P. 871–881.
- Макимова Ю.Г., Васильев Д.М., Овечкина Г.В., Максимов А.Ю., Демаков В.А. Трансформация 2- и 4-цианопиридинов свободными и иммобилизованными клетками нитрилгидролизующих бактерий // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2013. Т. 49, № 4. С. 358–363.

**ОСОБЕННОСТИ БИОСИНТЕЗА БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ
ИНДИВИДУАЛЬНЫМИ ШТАММАМИ KOMAGATAEIBACTER XYLINUS
НА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ ИЗ ЛЕГКОВОЗОБНОВЛЯЕМОГО
ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ**

Г.Ф. Миронова, Е.А. Скиба

Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения РАН, Бийск, Россия

Идея получения высокоценной бактериальной наноцеллюлозы (БНЦ) из низкостоймостного легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья параллельно развивается в разных странах и достигнуты хорошие результаты. Такой подход нацелен на снижение затрат, так как известно, что около 65 % от себестоимости БНЦ приходится на питательную среду. Ключевыми моментами этого подхода являются: (1) выбор подходящего сырья, (2) технология трансформации сырья в раствор сахаров, (3) оптимизация условий биосинтеза и (4) выбор либо генетическое конструирование штамма [1, 2].

Ранее нами были выбраны в качестве сырьевых источников мискантус и плодовые оболочки овса (ПОО) и разработаны фундаментальные основы технологии трансформации сырья в глюкозные гидролизаты. Было показано, что для последующего получения БНЦ самой эффективной технологией является двухстадийная обработка сырья разбавленными растворами сначала азотной кислоты, а затем гидроксида натрия [3, 4]. Затем полученные субстраты подвергаются ферментативному гидролизу, и полученные среды стандартизируются по концентрации редуцирующих веществ (РВ) – 20 г./л. Подробно методика изложена в работе [4]. Биосинтез БНЦ проводился с помощью симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12.

В данной работе впервые биосинтез БНЦ был осуществлен с помощью индивидуальных штаммов *Komagataeibacter xylinus* коллекции ВКПМ. Были протестированы штаммы *Komagataeibacter xylinus* B-11240, *Komagataeibacter xylinus sucrofermentans* B-12428, *Komagataeibacter xylinus* B-12429, *Komagataeibacter xylinus* B-12431.

На первом этапе проводилась реактивация штаммов. Для этого использовалась среда Хестрина-Шремма [5]: глюкоза – 2 %, пептон – 0,5 %, дрожжевой экстракт – 0,5 %, Na_2HPO_4 – 0,27 %, лимонная кислота – 0,115 %, pH 6,0; для установления активной кислотности использовались HCl и NaOH. Для штаммов *Komagataeibacter xylinus* B-11240 и *Komagataeibacter xylinus sucrofermentans* B-12428 образование гель-пленки и помутнение среды не наблюдалось. При нескольких пересевах также образование гель-пленки и помутнение среды не наблюдалось. Можно сделать заключение, что штаммы были доставлены нежизнеспособными.

На втором этапе изучались трофические предпочтения штаммов B-12429 и B-12431. Для этого биосинтез БНЦ осуществлялся на трёх средах: среде Хестрина-Шремма, среде с мелом для уксуснокислых бактерий (глюкоза – 100,0 г/л; дрожжевой экстракт – 10,0 г/л; CaCO_3 – 20,0 г/л; pH 6,8) и глюкозной полусинтетической среде (глюкоза – 20 г./л; сухой чёрный чай – 10 г./л, после приготовления среда фильтровалась). Результаты показали, что среда с экстрактивными веществами чёрного чая оказалась непригодной для биосинтеза БНЦ штаммами B-12429 и B-12431, так как БНЦ на ней не синтезировалась. На среде Хестрина-Шремма выход БНЦ выше, чем на среде с мелом в 7,1 раза для штамма B-12429 и в 9,5 раза – для штамма B-12431. Можно сделать вывод, что предпочтительной оказалась среда Хестрина-Шремма. Именно она была использована в качестве контрольной среды в дальнейших экспериментах.

На третьем этапе изучался биосинтез БНЦ с помощью штаммов B-12429 и B-12431 на питательных средах из легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья. Использовались три питательных среды: опытные среды, полученные из мискантуса и из ПОО согласно [4] и контрольная синтетическая среда Хестрина-Шремма. Оказалось, что на нативных гидролизных средах и на гидролизных средах с внесением экстрактивных веществ чёрного чая индивидуальные штаммы не способны продуцировать БНЦ. Поэтому было принято решение внести в гидролизные среды питательные вещества аналогично составу среды Хестрина-Шремма (кроме глюкозы). Кроме того, при биосинтезе БНЦ с помощью симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12, питательные среды подвергались пастеризации при 100 °C без выдержки, что при использовании индивидуальных штаммов *Komagataeibacter xylinus* оказалось неприемлемым, и наблюдалась контаминация посторонней микрофлорой.

Поэтому проводилось автоклавирование питательных сред при 0,5 атм 30 минут. После проверки стерильности в среды вносилось по 10 % инокулята, предварительно адаптированного на исследуемой среде, биосинтез проводился статически в течение 14 суток при температуре 28 °С. Емкости сверху накрывались стерильной бумагой. Работа выполнялась при использовании приборной базы Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (ИПХЭТ СО РАН, г. Бийск).

Кривые изменения РВ в процессе биосинтеза БНЦ представлены на рис. 1. Основная убыль РВ наблюдается в первые 7 суток биосинтеза, далее кривые выходят на плато. Для штамма В-12429 остаточная концентрация веществ составляет 7 г/л, для штамма В-12431 – 4–5 г/л.

Кривые изменения рН приведены на рис. 2. Особенностью штамма В-12429 является наблюдаемый минимум рН 3,5 на 4-е сутки биосинтеза, после чего рН постепенно повышается до 3,9–4,3. Для штамма В-12431 рН снижается до 3,6–3,9 на 3–5 сутки биосинтеза и остаётся на этом уровне до конца эксперимента.

Кривые изменения численности уксуснокислых бактерий приведены на рис. 3. Из графиков видно, что при культивировании не наблюдается длительной лаг-фазы, вероятно это связано с предварительной адаптацией продуцентов на используемой среде. Со 2-х по 14-е сутки наблюдается стационарная фаза. Количество бактерий при культивировании на гидролизатах на 7-е сутки выше в 3–4 раза, чем при культивировании на синтетической среде. Для штамма В-12431 на всех питательных средах численность бактерий несколько выше, чем для штамма В-12429. Известно, что численность уксуснокислых бактерий служит маркером синтеза БНЦ: чем выше концентрация бактерий, тем выше выход БНЦ [6, 7]. Поэтому самый высокий выход БНЦ можно ожидать для штамма В-12431 на среде ферментативного гидролизата ПОО.

На рис. 4 представлены кривые изменения выхода БНЦ в зависимости от вида питательной среды и используемого штамма. Наибольший выход БНЦ был получен на среде ферментативного гидролизата ПОО: 3,5 % для штамма В-12429, 4,1 % – для В-12429. Интересно, что в опыте со штаммом В-12429 выход БНЦ на среде из мискантуса был близок к выходу на среде из ПОО, а в опыте со штаммом В-12431 наблюдается большой разрыв между кривыми выхода. По-разному прошёл биосинтез БНЦ и на средах Хестрина-Шремма: если в опыте со штаммом В-12429 выход продолжал увеличиваться спустя 14 суток, то в опыте со штаммом В-12431 – начал снижаться уже спустя 7 суток.

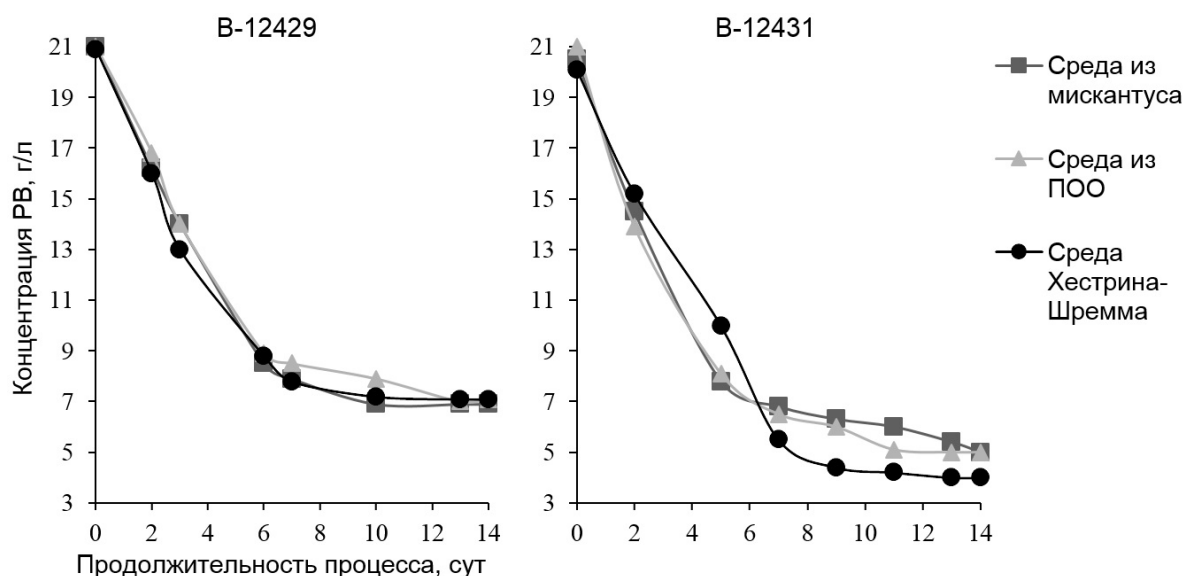


Рисунок 1 – Изменение концентрации РВ в процессе биосинтеза БНЦ штаммами *Komagataeibacter xylinus* В-12429 и В-12431

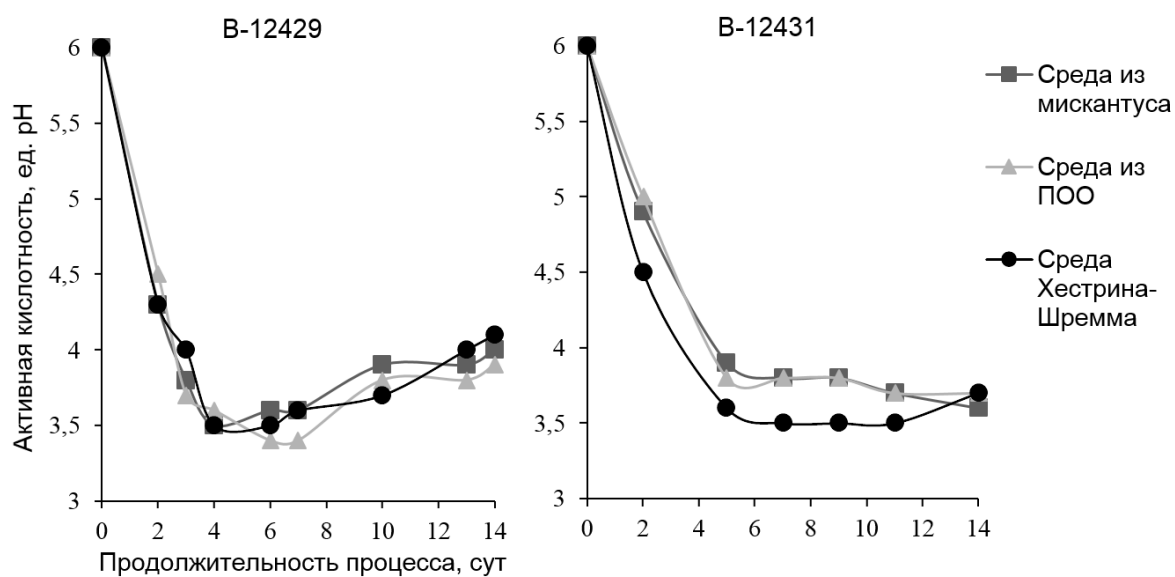


Рисунок 2 – Изменение активной кислотности в процессе биосинтеза БНЦ штаммами *Komagataeibacter xylinus* B-12429 и B-12431

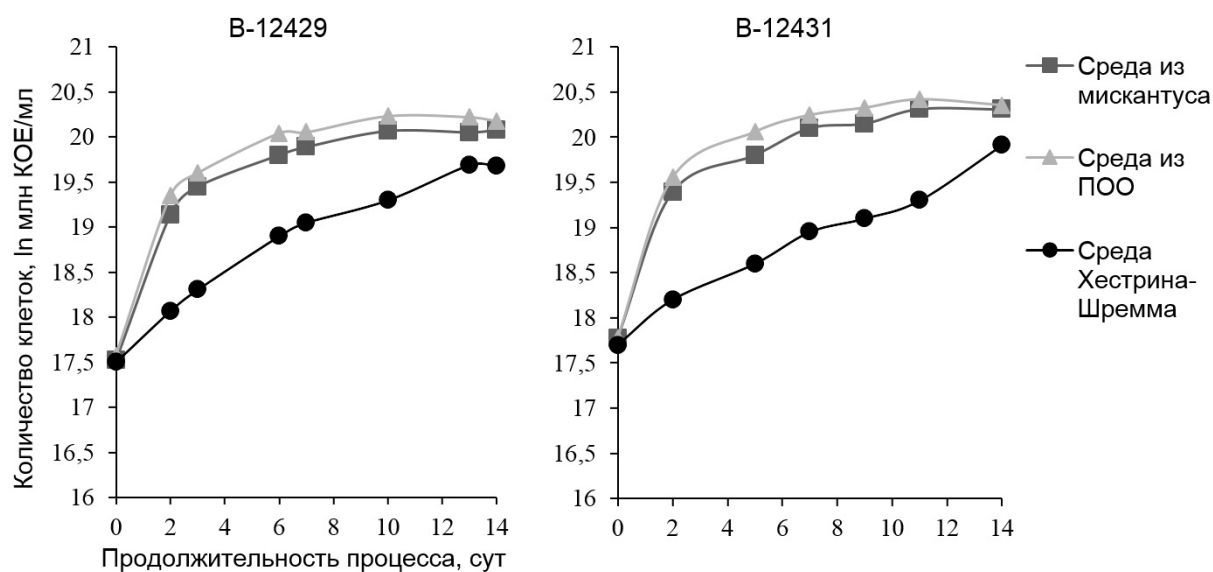


Рисунок 3 – Изменение количества клеток *Komagataeibacter xylinus* B-12429 и B-12431 в процессе биосинтеза БНЦ

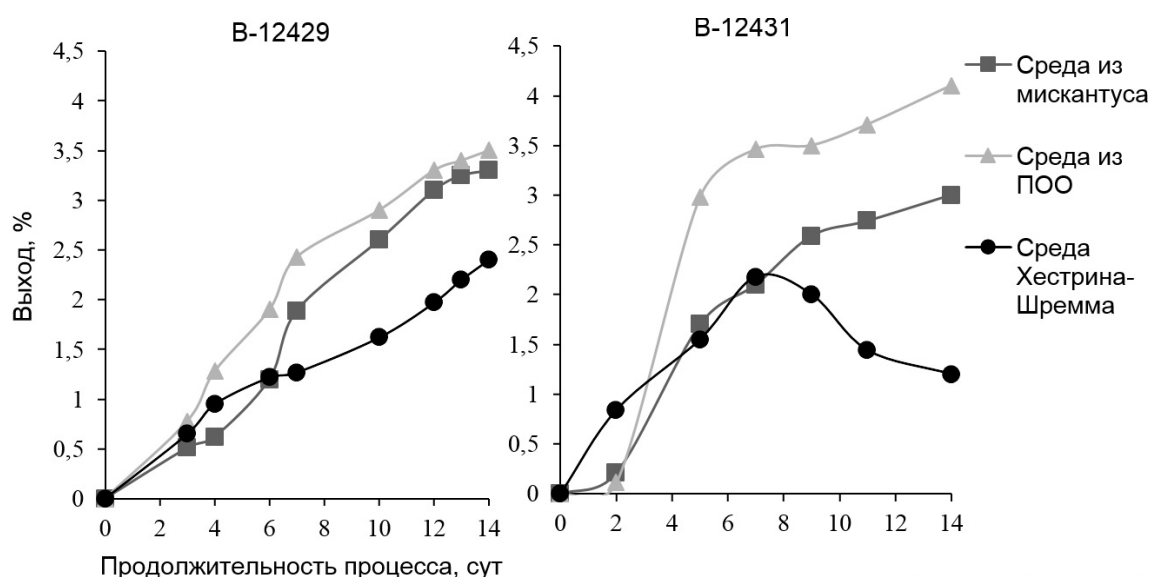


Рисунок 4 – Изменение выхода БНЦ в процессе биосинтеза штаммами *Komagataeibacter xylinus* B-12429 и B-12431

Показано, что на средах ферментативных гидролизатов синтезируется БНЦ с большим выходом, чем на средах Хестрина-Шремма. Повышение выхода БНЦ на средах из легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья по сравнению с синтетическими средами неоднократно описано в литературе [1, 2]. Это может быть связано с присутствием в гидролизатах растворимых целлоолигосахаридов, которые могут утилизироваться штаммами, имеющими эндо – 1,4-β-глюканазу [8].

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-19-01054)

Литература

1. Velásquez-Riaño M., Bojacá V. Production of bacterial cellulose from alternative low-cost substrates // *Cellulose*. 2017. Vol. 24(7). P. 2677–2698. <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1309-7>.
2. Urbina L., Corcuera M.Á. et al. A review of bacterial cellulose: sustainable production from agricultural waste and applications in various fields // *Cellulose*. 2021. P. 1–25. <https://doi.org/10.1007/s10570-021-04020-4>.
3. Skiba E.A., Budaeva V.V. et al. A technology for pilot production of bacterial cellulose from oat hulls // *Chem Eng J*. 2021. № 383. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.123128>.
4. Skiba E.A., Gladysheva E.K. et al. Self-standardization of quality of bacterial cellulose produced by *Medusomyces gisevii* in nutrient media derived from *Miscanthus* biomass // *Carbohydr Polym*. 2021. № 252. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117178>.
5. Hestrin S., Schramm M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*: II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose // *Biochem J*. 1954. Vol. 58 (2). P. 345–352.
6. Stepanov N., Efremenko E. «Deceived» concentrated immobilized cells as biocatalyst for intensive bacterial cellulose production from various sources // *Catalysts*. 2018. Vol. 8, № 1. P. 33. <https://doi.org/10.3390/catal8010033>.
7. Römling U., Galperin M.Y. Bacterial cellulose biosynthesis: Diversity of operons, subunits, products, and functions // *Trends in Microbiology*. 2015. Vol. 23. P. 545–557. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.05.005>.
8. Hong F., Guo X. et al. Bacterial cellulose production from cotton-based waste textiles: Enzymatic saccharification enhanced by ionic liquid pretreatment // *Bioresour Technol*. 2012. Vol. 104, P. 503–508. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.028>.

РАЗРАБОТКА БИОПРЕПАРАТА ДЛЯ ДЕСТРУКЦИИ ЛИГНИНСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ

Е.А. Мотина, С.Ф. Яковлева, Н.А. Матвиенко, Е.А. Пименова, В.В. Кутузова

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

В различных регионах России в последнее десятилетие остро стоит проблема, связанная с утилизацией отходов целлюлозно-бумажной промышленности. По данным Управления охраны окружающей среды ежегодный объем отходов данного производства по России достигает нескольких сотен миллионов тонн. Накапливаясь, промышленные отходы занимают значительные земельные территории, выступают источником загрязнения окружающей среды, вызывая ухудшение условий жизни человека и среды обитания живых организмов. В связи с необходимостью сохранения целлюлозно-бумажной и деревообрабатывающей промышленности и их переводов в ранг экологически безопасных, активно разрабатываются новые способы переработки древесины, очистки стоков и отходящих газов с использованием микроорганизмов.

Роль древесины как возобновляемого растительного сырья всё более возрастает в связи с все возрастающим потреблением и неизбежным истощением природных ископаемых ресурсов. Биотрансформация древесины микроорганизмами – естественный процесс, за счет которого происходит круговорот углерода в природе. Разложение древесины осуществляется ассоциациями микроорганизмов, которые могут разрушать преимущественно лигнин. Лигнин, являясь составной частью древесины, представляет собой наиболее трудно утилизируемый материал, образующийся при ее химической переработке на целлюлозно-бумажных и гидролизных предприятиях, может выступать в роли потенциального сырьевого ресурса для синтеза новых продуктов.

Следует отметить, что в настоящее время отсутствуют исчерпывающие технические решения по утилизации технических лигнинов, хотя обзор научной литературы последних лет свидетельствует о возрастающем интересе исследователей к этому сырьевому ресурсу. Биотехнологические препараты, созданные на основе консорциумов эффективных микроорганизмов, способных осуществлять утилизацию лигнинсодержащих отходов являются актуальными и широко востребованными. В связи с вышесказанным остро стоит вопрос по разработке биологических препаратов, утилизирующих древесные отходы.

Объектами исследования являются штаммы микро- и макромицетов, обладающие деструктивной способностью по отношению к лигнинсодержащему сырью, выделенных из древесины, подвергшаяся микробиологическому разрушению. Источником данных микроорганизмов является древесина, подвергшаяся микробиологическому разрушению. Для выделения микроорганизмов использовались следующие питательные среды: сусло-агар, Чапека, Сабуро, МПА. Для выявления деструктивной способности по отношению к лигнинсодержащему сырью, были определены лакказная, тирозиназная, целлюлазная, лигнинпероксидазная активности. На основе полученных данных был подобран консорциум микроорганизмов, состоящий из грибов рода *Penicillium* *sizovae*, *Trichoderma* *viride*, *Coniophora* *puteana*. Сформированное сообщество, обладает наиболее широким спектром ферментативной активности, что предполагает их способность к эффективной деструкции лигнинсодержащего сырья. Оптимальной температурой для консорциума является 25–27 °С. Важное значение имеет кислотность среды. Оптимальная кислотность среды для выбранного консорциума составляет 6,5. На следующем этапе было проведено определение убыли лигнина при твердофазном культивировании отобранных штаммов микроорганизмов поотдельности и в качестве консорциума. Наибольшая убыль лигнина наблюдалась не у отдельных микроорганизмов, а консорциума микроорганизмов. В результате культивирования установлено, что оптимальная убыль лигнина достигается на 13 сутки. Дальнейшее культивирование микроорганизмов на лигнинсодержащем субстрате не увеличивало убыль лигнина, поэтому целесообразно считать оптимальным временем культивирования 13 сутки, что коррелируется с литературными данными. Таким образом, в результате исследования были подобраны микроорганизмы, на основе которых может быть получен биопрепарат.

УДК 615.322:664

ПОТЕНЦИАЛ ФЛАВОНОИДОВ В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ**Е.В. Аверьянова, А.А. Вашурина***Бийский технологический институт (филиал) «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова», Бийск, Россия*

Современные технологии, применяемые при производстве отечественных продуктов питания, основаны на мировых трендах пищевой индустрии «в унисон с иммунитетом», «современная ностальгия», «подлинная аутентичность», которые предполагают использование в составе продукта исключительно натуральных ингредиентов. При этом существенной проблемой является непродолжительный срок хранения, который ограничен развитием микробиологических процессов и загрязнением посторонней микрофлорой, как следствие изменением качества продукта [1]. Интенсивность развития микробиологических и биохимических процессов в продуктах питания связана с их составом и свойствами. Технологические приемы лишь в незначительной степени способствуют увеличению срока хранения пищевых продуктов. Большую эффективность имеет использование консервирующих добавок, которые, как правило, синтетического происхождения. Эти ингредиенты улучшают внешний вид продукции, обеспечивают надлежащее санитарное состояние в течение установленного срока хранения, однако могут вызывать аллергические реакции и другие нежелательные эффекты [2].

Решением этой проблемы может стать поиск природных полифункциональных веществ, обеспечивающих длительное время хранения продукции, замедление автолитических и окислительных процессов, подавление развития посторонней микрофлоры в продукте при этом не оказывая негативного воздействия на организм человека. Наиболее перспективными для использования в пищевой промышленности натуральными консервантами является вторичные метаболиты растительного сырья фенольного характера, так называемые флавоноиды [3, 4].

Возрастающий интерес к использованию флавоноидов в профилактическом и специализированном питании как таковых или в составе микроингредиентов и сырьевых полуфабрикатов подтверждается результатами многочисленных исследований российских и зарубежных ученых, доказывающих разностороннюю биологическую активность и безопасность их применения. Вместе с тем пероральная биодоступность подавляющего большинства флавоноидов является довольно низкой и убывает в ряду: изофлавоны < мономерные катехины < флаваноны < флавонолы < проантоцианидины < антоцианины. Что объясняется лабильностью флавоноидов в агрессивной среде желудочно-кишечного тракта и ограничивает их использование в нутрициологии и фармацевтике. В связи с этим, терапевтическая эффективность флавоноидов зависит не только от подтвержденной *in vitro* и *in vivo* биологической активности, но и от их стабильности в ЖКТ и эффективности всасывания. В этой связи целесообразно рассмотреть возможность использования флавоноидов в пищевой промышленности на примере существующих и перспективных составов продуктов питания.

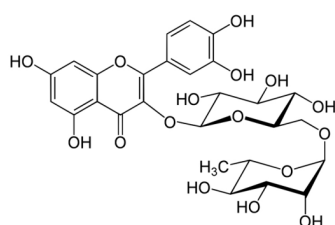
Для предупреждения процессов окисления и повышения биологической ценности продуктов питания в их состав вводят пищевые добавки антиоксидантного действия. Роль последних заключается в дезактивации катализаторов окисления, или в нейтрализации активных форм кислорода, что приводит к обрыву цепей окисления и образованию неактивных продуктов. К настоящему времени известен ряд синтетических антиоксидантов. Однако большое значение придается исследованиям антиокислительных свойств природных соединений, в том числе полифенольных, которые объединяют несколько групп соединений по наличию 1,3 – дифенилпропанового скелета С6-С3-С6: катехины, лейкоантоцианы, антоцианы, флавононы, флавоны, флавонолы, халконы [2, 5]. Структурное разнообразие флавоноидов – производных бензо-γ-пирона (хромона) – предполагает широкий спектр их биологической активности, наиболее изученной является антиоксидантная [6]. Антиоксидантная активность флавоноидов зависит от расположения функциональных групп в структуре ядра. Конфигурация, общее количество и положение гидроксильных групп в ароматическом кольце влияют, как на способность улавливать свободные радикалы, так и на механизм их связывания [7, 8]. Биологическая активность флавоноидов проявляется в подавлении перекисных процессов уже на начальной стадии. Они играют роль «ловушек» супероксид-радикала и перекиси водорода, являются «ловушками» вторичных активных форм кислорода: пероксинитрита, перекисей липидов и свободных радикалов, образующихся под воздействием на организм токсикантов. При этом синергетический эффект флавоноидов проявляется в их совместном действии с витаминами С и Е.

Наиболее распространенными источниками флавоноидов являются такие растения как зверобой (лат. *Hypericum*), ромашка (лат. *Matricaria*), череда (лат. *Bidens*), в перспективе рассматриваются софора (лат. *Styphnolobium*) каштан (лат. *Castanea*) и др. (таблица 1).

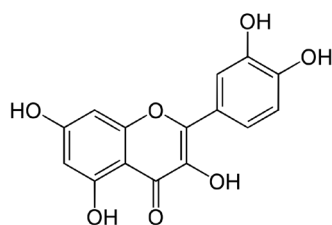
Анализ данных, приведенных в таблице 1, показывает, что наиболее часто в составе полифенольного комплекса растительного сырья встречаются флавоноиды: рутин, кверцетин и дигидрокверцетин, структуры которых представлены на рисунке 1.

Таблица 1 – Растительные источники флавоноидов, используемых в качестве микроингредиентов пищи

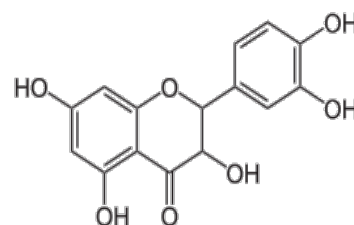
Наименование растения	Состав флавоноидов	Биологическая активность
Зверобой продырявленный (лат. <i>Hypericum</i>)	рутин (0,50–0,70 %), кверцитрин (0,40–0,50 %), изокверцитрин (1,20 %), гиперин (0,60–1,80 %) [9]	выраженное антимикробное действие на большинство микроорганизмы
Ромашка аптечная (лат. <i>Matricaria</i>)	аигенина (0,9 %), кверцетин (0,9 %), лютеолина (0,9 %) [10]	умеренное спазмолитическое действие
Череда трехраздельная (лат. <i>Bidens</i>)	рутин (не менее 0,5 %), другие флавоноиды: битеин, сульфуретин, сульфуретин, лютеолин, цинарозид и др. (от 1 до 3 %) [9]	желчегонное действие
Софора японская (лат. <i>Styphnolobium</i>)	рутин (не менее 16 %, в бутонах до 20 %), кемпферол, кверцетин [9]	предупреждают образование тромбов, способствуют сохранению эластичности и прочности кровеносных сосудов
Каштан посевной (лат. <i>Castanea</i>)	спиреозид, би- и триозиды кверцетина и кемпферола (не менее 1 %) [9]	повышают прочность сосудистых стенок, оказывают желчегонное действие
Лиственница сибирская (лат. <i>Larix sibirica</i>)	дигидрокверцетин, нарингенин, изорамнетин	антиоксидантное действие, ангиопротекторное действие



Рутин



Кверцетин (агликон рутина)



Дигидрокверцетин

Рисунок 1 – Структурные формулы флавоноидов

Согласно данным аналитических исследований отдельные флавоноиды и их комплексы нашли применение в молочной, масложировой, мясной, хлебопекарной и других отраслях пищевой промышленности (рисунок 2).

Согласно проведенному аналитическому исследованию выявлено, что в промышленных масштабах получения пищевых продуктов нашли применение в основном два флавоноида – рутин и дигидрокверцетин. Это, по-видимому, связано с доступностью сырья и отработанной технологией их получения, в том числе в масштабах производства. Особенностью использования флавоноидов в пищевой промышленности является их доказанная эффективность с одной стороны в качестве пищевой добавки консервирующего действия, которая позволяет увеличить срок годности продукта за счет подавления развития микробиологических процессов [11], а с другой – в качестве микроингредиента для создания продуктов функционального назначения. Так, например, применение дигидрокверцетина, выделенного из комлевой части лиственницы сибирской, в мясной, рыбной и молочной продукции обусловлено тем, что он увеличивает срок хранения продуктов примерно в два с половиной раза и не влияет на органолептические и стоимостные характеристики конечной продукции [12].

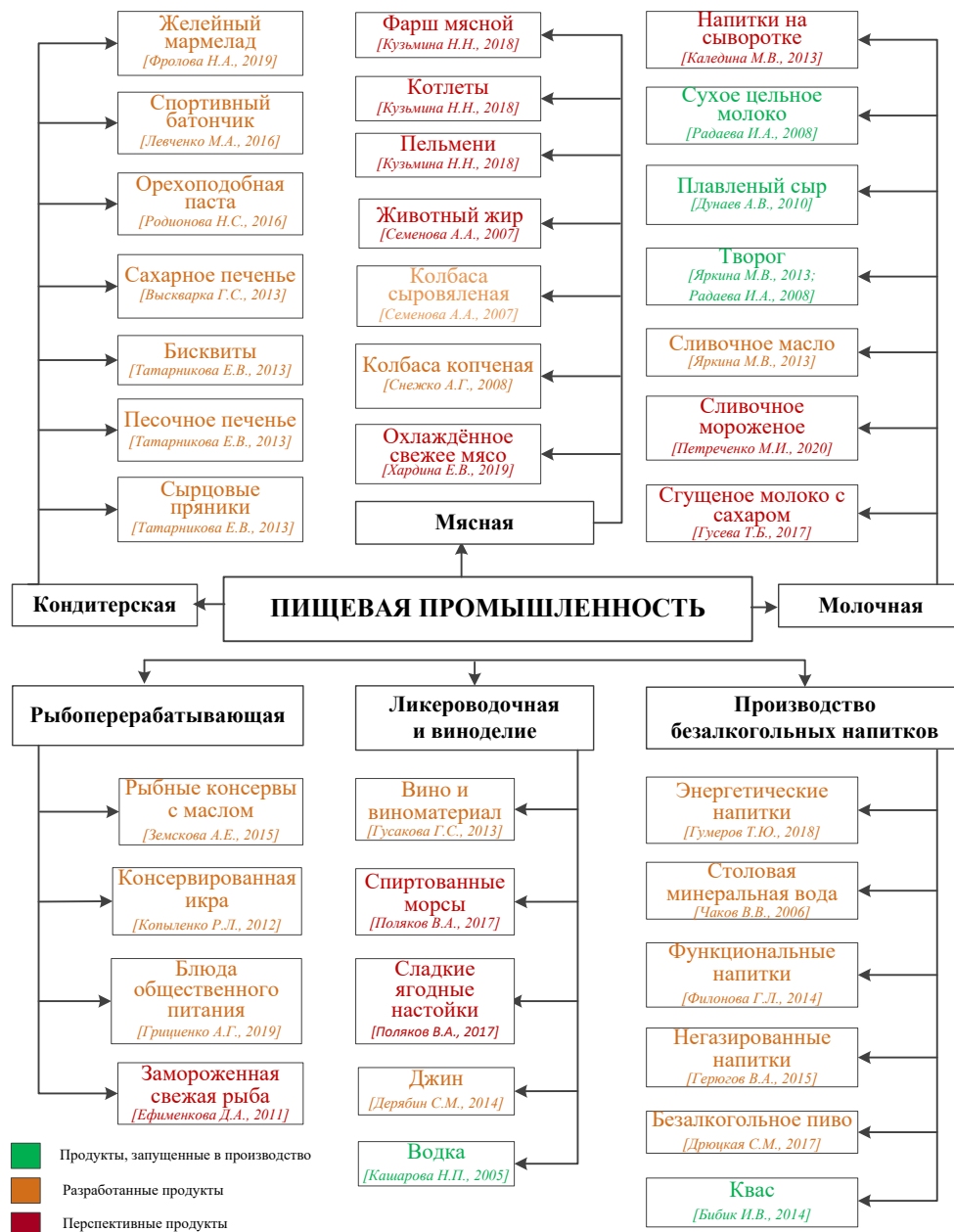


Рисунок 2 – Направления использования флавоноидов в пищевой промышленности

Флавоноиды нашли применение и в качестве добавки в корма животных. При их использовании на птицефабриках для кормления цыплят-бройлеров, на питание которых в современных условиях обращается особое внимание, внесение биологически активных веществ обогащает рацион и создает условия для замены части антибиотиков на природные фитобиотические ингредиенты, к числу которых относится дигидрокверцетин – составляющий компонент кормовой добавки Экостимул-2. Этот премикс не только улучшает переваримость основных питательных веществ в организме птицы, но и позволяет повысить качество продуктов питания, приготовленных из мяса кур [13].

Для животных жиров, которые содержатся и в молочных изделиях, характерно проявление со временем «салистого» вкуса за счет образования продуктов их окисления, из-за чего при употреблении таких продуктов в пищу могут возникать пищевые отравления вплоть до патологических состояний.

Поэтому в масложировой и молочной промышленности в качестве антиокислителя используются флавоноиды, которые предотвращают появление «салистого» вкуса и увеличивают срок годности пищевых продуктов. Исследования показали, что природные флавоноиды не проявляют аллергизирующих, эмбриотоксичных, иммунотоксичных и мутагенных свойств, оказывая противовоспалительное, гиполипидемическое, капилляроукрепляющее, гастропротекторное и радиопротекторное действие в составе продуктов питания [14].

Использование флавоноидов в хлебопекарной промышленности показано на примере экстракта зеленого чая. Установлено, что при потреблении 300 г. хлебобулочных изделий, которые обогащены экстрактом зеленого чая, на 31,6 % обеспечивается потребность человека в его активном компоненте. Однако рецептурный состав и способ выпечки влияют на сохранность флавоноидов. Наибольшее содержание флавоноидов отмечается у подовых изделий с большими корками, которые относятся к малому развесу [15].

В качестве защиты от окисления жиров выступают и естественные антиокислители, присутствующие в пищевом сырье, – токоферол, ретинол, аскорбиновая кислота, каротиноиды и некоторые аминокислоты. Однако их количество колеблется, а активность в процессе тепловой обработки, особенно при пастеризации и стерилизации, снижается, поэтому вводятся антиокислители. Известно, что к умеренным температурным (до 90 °C) и механическим воздействиям устойчивы агликоны флавоноидов. Так, например, образование активных радикалов в сливочном масле после внесения ди-гидрохверцетина замедляется и даже через 8 месяцев хранения количество перекисей в жировой фракции находится в допустимых пределах [14].

Активно используются флавоноиды и в других отраслях пищевой промышленности: ликероводочной и виноделии, кондитерской и в производстве безалкогольных напитков и др. [16–17].

Литература

Тренды в пищевой индустрии [Электронный ресурс] // Веб-сайт компании «AUSPICE» – URL: <https://auspice.ru/trendy-v-pishhevoj-industrii-2021/>.

Наумова, Н.Л. О пищевой ценности растительного сырья, используемого в производстве макаронных изделий / Н.Л. Наумова, Д.Г. Лигостаев // АПК России. – 2017. – № 24. – С. 154–159.

Касьянов, Д.Г. Получение флавоноидов для обогащения продуктов питания людей с малоподвижным образом жизни / Д.Г. Касьянов, В.С. Гринченко // Современные аспекты производства и переработки сельскохозяйственной продукции. – 2020. – С. 528–536.

Базарнова, Ю.Г. Исследование состава биологически активных веществ экстрактов дикорастущих растений / Ю.Г. Базарнова, О.Б. Иванченко // Вопросы питания. – 2016. – Т. 85. – № 5. – С. 100–107.

Наумова, Н.Л. Современный взгляд на проблему исследования антиоксидантной активности пищевых продуктов / Н.Л. Наумова // Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Пищевые и биотехнологии. – 2014. – Т. 2. № 1. – С. 5–8.

Куркин, В.А. Флавоноиды лекарственных растений: прогноз антиоксидантной активности / В.А. Куркин, В.В. Поройков, А.В. Куркина, Е.В. Авдеева, О.Е. Правдивцева // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 2–2. – С. 517–517.

Эргашев, Н.А. Антирадикальная активность некоторых флавоноидов / Н.А. Эргашев, У.Г. Гайилов, Э.Д. Комилов и др. // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. – 2019. – С. 128–132.

Волков, В.А. Антиоксиданты растительного происхождения: содержание, структура, активность / В.А. Волков // Сборник трудов международной конференции молодых ученых «Окисление, окислительный стресс, антиоксиданты», 28–30 октября 2019 года, г. Москва. – Москва: Издательство: Российский университет дружбы народов (РУДН), 2019. – С. 154–178.

Государственной фармакопеи СССР XI издания (ГФ XI). Выпуск 2 «Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье»

Тихонов, Б.Б. Комплексная экстракция гликанов и флавоноидов из растительного сырья / Б.Б. Тихонов, А.И. Сидоров, Э.М. Сульман // Вестник ТвГТУ. – 2011. – № 19. – С. 57–63.

Школьников, М.Н. Исследование антибактериальной активности флавоноидов облепихового шрота / М.Н. Школьников, Е.В. Аверьянова, Е.Д. Рожнов, Е.С. Баташов // Индустрия питания. – 2020. – Т. 5. – № 3. – С. 61–69.

Филиппов, С.В. Натуральные ингредиенты для производства функциональных продуктов / С.В. Филиппов, О.С. Козлова // Переработка молока. – 2010. – № 7. – С. 20–21.

Минченко, В.Н. Влияние биологически активных веществ на морфофункциональные показатели цыплят-бройлеров / В.Н. Минченко, П.П. Донских, Е.С. Бас // Агроконсультант. – 2017. – № 6. – С. 17–24.

Токаев, Э.С. Сравнительная характеристика антиоксидантной активности растительных экстрактов / Э.С. Токаев, Г.Г. Манукьян // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2009. – № 9. – С. 36–39.

Жамукова, Ж.М. Экстракт зеленого чая для теста из пшеничной муки / Ж.М. Жамукова, Л.И. Пучкова, Т.Г. Богатырева // Хлебопродукты. – 2006. – № 2. – С. 38–40.

Зорина, Н.В. Применение ди-гидрохверцетина в пищевой промышленности / Н.В. Зорина // Приоритетные научные направления: от теории к практике. – 2013. – № 8. – С. 162–165.

Бакулина, О.Н. Развитие пищевых технологий: использование растительных экстрактов / О.Н. Бакулина // Пищевая промышленность. – 2007. – № 5. – С. 32–33.

УДК 577.151.62

ПОЛУЧЕНИЕ БИФЕРМЕНТНЫХ СШИТЫХ АГРЕГАТОВ КАТАЛАЗЫ И СУПЕРОКСИДИДИСМУТАЗЫ НА ОСНОВЕ ВАТЕРИТНОЙ МАТРИЦЫ

М.А. Тагирова, Н.Л. Еремеев, Н.Г. Балабушевич, Н.Л. Клячко

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

В последнее время иммобилизованные мультиферментные системы пользуются большим спросом в биотехнологии. К преимуществам таких систем можно отнести их способность предотвращать накопление нестабильных промежуточных продуктов, снижение вторичных нежелательных реакций и достижение работы двух и более ферментов в реакционных процессах [1].

Биферментные комплексы каталазы и супероксиддисмутазы представляют собой выгодный подход к подготовке одношагового этапа, вместо многоступенчатых реакционных процессов, направленных на нейтрализацию АФК, образующихся после травм [2].

Одним из подходов, направленных на получение микросфер антиоксидантных ферментов сферической формы с узким распределением по размерам и с высокой остаточной активностью ферментов, является включение их в ватеритную матрицу, с последующим её растворением хелатирующими агентами.

Целью данной работы является разработка технологически простого способа инкапсулирования (на основе ватеритной матрицы с последующим ее растворением) антиоксидантных ферментов каталазы и супероксиддисмутазы, обеспечивающего длительное время стабильности и сохранением ферментативной активности биферментного поперечно-сшитого агрегата.

Микросферы ватерита с соосажденными биферментами (продукт СС-СОД/Cat) были получены сливанием растворов солей CaCl_2 и Na_2CO_3 в присутствии ферментов каталазы и супероксиддисмутазы. После промывки образовавшихся частиц от не связавшихся ферментов была проведена их обработка глутаровым альдегидом с последующей промывкой от избытка непрореагировавшего бифункционального агента (продукт СС-СОД/Cat-GA) и растворением карбонатной матрицы раствором 0,1 М ЭДТА дробным добавлением (СОД/Cat-CLEAs).

Полученные СОД/Cat-CLEAs имели сферическую форму диаметром $2,5 \pm 1,5$ мкм. Одновременное включение супероксиддисмутазы и каталазы не приводит к изменению формы ватерита, однако с введением второго фермента диаметр получаемых биферментных combi-CLEAs СОД/Cat значительно уменьшается и становится неравномерным.

Количество частиц СОД/Cat-CLEAs в разных буферных растворах оценивали с помощью оптической микроскопии (табл. 1). Теоретически рассчитали потенциальное количество микросфер СОД-CLEAs (исходя из среднего диаметра частиц, плотности и выхода синтеза СОД/Cat-CLEAs) и, что важно отметить, теоретические расчеты достаточно хорошо совпадали с экспериментальными данными для СС-СОД/Cat и СОД/Cat-CLEAs в разных буферных растворах.

Таблица 1. Общее количество частиц СС-СОД/Cat и СОД/Cat-CLEAs в разных буферных растворах.

	Теоретич. кол-во	СС-СОД/Cat	СОД/Cat-CLEAs (ЭДТА)	СОД/Cat-CLEAs (Трис – 8,0)	СОД/Cat-CLEAs (PBS – 7,4)
Кол-во ч-ц, шт.	$3,46 \cdot 10^9$	$(1,68 \pm 0,13) \cdot 10^9$	$(6,4 \pm 0,1) \cdot 10^8$	$(4,7 \pm 0,14) \cdot 10^8$	$(3,2 \pm 1,07) \cdot 10^8$

Работа выполнена при финансовой поддержке Госрегистрационной темы АААА-А21-121011290089-4.

Использовано оборудование, закупленное по Программе развития МГУ имени М.В. Ломоносова.

Литература

- S. Lozano et al. Cross-linked enzyme aggregates (CLEA) in enzyme improvement – a review. Biocatalysis, 2015, V.1, P.166–177.
C.E. Hulsebosch. Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. Adv. Physiol. Educ., 2002, V.26, P.238–255.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РОБОТИЗИРОВАННОЙ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ НАКОПЛЕНИЯ БИОМАССЫ ФИБРОБЛАСТОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ЦЕЛЯХ

Ф.А. Фадеев, О.В. Мадиярова, А.Д. Никанорова

ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Россия

Дермальные фибробласты человека широко применяются в регенеративной медицине, в первую очередь, для ускорения заживления ран и предотвращения образования рубцов и контрактур, а также для коррекции возрастных изменений кожи [1]. Клинический эффект применения фибробластов обусловлен секрецией ими компонентов внеклеточного матрикса (коллаген, фибронектин, ламинин, эластин), а также цитокинов, влияющих на пролиферацию и миграцию собственных клеток кожи пациента (IL-6, bFGF, KGF, EGF и других) [2]. Основными проблемами получения фибробластов для клинического применения являются трудоемкость процесса культивирования, высокая зависимость объема и свойств получаемого клеточного материала от квалификации и индивидуальных особенностей работы сотрудников, высокий риск микробной контаминации.

Использование автоматизированных систем для культивирования клеток позволяет минимизировать эти проблемы. В настоящее время для высокопроизводительного культивирования адгезивных клеточных линий используются системы биореакторного типа и роботизированные системы, имитирующие работу человека с культуральными флаконами. Нами была оценена пригодность роботизированной системы CompacT SelecT (Sartorius, Великобритания) для культивирования фибробластов кожи человека и было проведено сравнение скорости пролиферации и секреторной активности клеток при «ручном» и автоматизированном культивировании с использованием роботизированной станции.

В работе были использованы дермальные фибробласты, выделенные из донорской кожи после получения от доноров информированного согласия. Культивирование клеток вручную и на CompacT SelecT осуществляли в течение 4 пассажей с использованием однотипных культуральных флаконов, ростовых сред и диссоциирующих растворов. Последовательность действий при ручном культивировании также максимально повторяла протокол операций, выполняемый CompacT SelecT.

Клетки, получаемые автоматизированно, не имели морфологических отличий от выращиваемых вручную. В то же время, количество клеток во флаконах, культивируемых в CompacT SelecT, на всех 4 пассажах было достоверно (в 1,3–1,5 раза) выше, чем во флаконах при ручном культивировании. При этом коэффициенты вариации по параметрам плотности клеточного монослоя и по размеру клеток были ниже при автоматизированном культивировании, что свидетельствует о большей стабильности условий автоматизированного культивирования и более высокой гомогенности получаемого клеточного материала.

В то же время, культивируемые на CompacT SelecT фибробласты секретировали меньшие количества (в пересчете на 1 клетку) цитокинов (IL-6, CXCL8) и про-коллагена I. Причиной может являться негативное влияние более высокой плотности клеток при автоматизированном культивировании на их секреторную активность [3].

Таким образом, нами была продемонстрирована возможность длительного культивирования фибробластов с помощью автоматической роботизированной платформы. Полученные таким способом фибробласты сохраняют типичную морфологию, высокую пролиферативную и секреторную активность, что делает возможным их дальнейшее использование в различных сферах, в том числе для клеточной терапии.

Литература

- Yeh, S. – W. and M. – Y. Huang (2013) Autologous fibroblast therapy of the scar: A preclinical report. *Dermatologica Sinica*. 31: 159–160.
- Wong T., J.A. McGrath, and H. Navsaria (2007) The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. *Br. J. Dermatol*. 156: 1149–1155.
- Aumailley M., T. Krieg, G. Razaka, P.K. Müller, and H. Bricaud (1982) Influence of cell density on collagen biosynthesis in fibroblast cultures. *Biochem. J.* 206(3): 505–510.

УДК 579.0

ОСОБЕННОСТИ ЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА СПОРЫ *BACILLUS SUBTILIS*

Е.С. Яценко, Л.В. Затонская, В.А. Петухов, П.В. Лыков, И.А. Халявин

Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

Bacillus subtilis является одним из представителей вида аэробных спорообразующих почвенных бактерий. Спорообразование бактерий – сложный многостадийный процесс. Интенсивность спорообразования культур зависит от способа культивирования, состава питательных сред, условий выращивания культуры [1]. Необходимо наличие в питательной среде минеральных солей, содержащих ионы Ca, Mg, K, Mn, Fe, Zn, Cu и других металлов. В отсутствии некоторых из них, прежде всего Ca, Mg, Mn, спорообразование может происходить замедленно или же вообще не наблюдаться [2].

Цель работы – проанализировать элементный состав спор *Bacillus subtilis*.

Культивирование микроорганизмов проводилось глубинным методом, использованием питательной среды в состав которой входили следующие соли: дигидрофосфат натрия, гидрофосфат калия, сульфат магния, сульфат марганца, хлорид натрия, хлорид кальция, сульфат железа (II). После культивирования споры были лиофилизированы. Затем, навеску спор 1 г. добавляли 20 мл концентрированной азотной и 10 мл концентрированной фтористоводородной кислоты, перемешивали и нагревали до 100° С. Пробу охлаждали. Переносили в колбу на 50 мл, до метки дистиллированной водой. Элементный состав определялся на спектрофотометре с индуктивно связанной плазмой эмиссионном Optima. По ПНДФ 16.1:2.3:3.11–98. Методика выполнения измерений содержания металлов в твердых объектах методом спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. Элементный состав спор *Bacillus subtilis*.

Исследуемый ингредиент	Концентрация в мг/кг							Среднее значение
	<i>Bacillus subtilis</i> B-2918	<i>Bacillus subtilis</i> B – 1323	<i>Bacillus subtilis</i> B – 4828	<i>Bacillus subtilis</i> B – 5449	<i>Bacillus subtilis</i> B-12079	<i>Bacillus subtilis</i> B – 2895	<i>Bacillus subtilis</i> B – 2896	
Ca	6585	13280	24340	18280	21340	22150	14690	17238
P	6323	13160	15200	9298	12580	13500	10200	11466
K	12800	10140	7794	5254	6940	5858	7459	8035
Na	15600	4371	3958	4256	2403	3247	2427	5180
Mg	1423	2544	2727	1803	2497	2591	1669	2179
Fe	113	800	2134	619	983	1300	899	978
Cu	5	516	314	4	348	514	338	291
Zn	58	157	147	110	161	191	102	132
Cr	45	57	30	31	36	30	34	38
Среднее значение	4313	4689	5681	4157	4865	5176	4223	

Выявлено, что самое большое содержания в споре кальция и фосфора. Содержание калия, натрия, магния, также высокое. Концентрация алюминия, бария, кобальта, селена, ванадия, бора и стронция в споре от 1 до 30 мг/кг. Концентрация титана, никеля, мышьяка свинца, кадмия менее 1 мг/кг. Концентрация серебра, олова и сурьмы во всех пробах равна нулю. Самое большое содержание исследуемых элементов обнаружено в штамме *Bacillus subtilis* B – 4828.

Литература

1. Романовская Т.В. Интенсификация спорообразования бактерий рода *Bacillus* как основа повышения эффективности биопестицидов. [Электронный ресурс].-режим доступа <https://elib.belstu.by/bitstream/> (дата обращения 04.07.21.)
2. Лиморенко А.П. Разработка технологии глубинного способа культивирования микроорганизмов *B. subtilis* и *B. licheniformis* для производства пробиотиков. [Электронный ресурс].-режим доступа <https://www.dissercat.com/content/> (дата обращения 04.07.21.)

Секция 7. Промышленная биотехнология и производство БАВ

УДК 637.146.33

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ КЕДРОВОГО МАСЛА НА РОСТ ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

Ф.П. Балдынова, Е.В. Михалева, А. А Шенаршеева, Б.Ж. Ламаханова

Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления, Улан-Удэ, Россия

В косметической промышленности широко применяют кедровое масло. По своим полезным свойствам кедровое масло подходит для любого типа кожи. В кедровом масле содержатся такие вещества, как стеариновая, линоленовая и пальмитиновая кислоты, которые замедляют процесс старения и восстанавливают структуру клеток. А также всем известный своим эффективным действием витамин Е: он омолаживает эпидермис (особенно результат виден на коже вокруг глаз), смягчает и разлаживает кожу [1].

Из опубликованных литературных данных известно, что сочетание полиненасыщенных жирных кислот кедрового масла и пробиотических микроорганизмов стимулирует интенсивное накопление биомассы и обеспечивает наиболее высокое количество жизнеспособных клеток [2].

Цель нашей работы – исследование влияния кедрового масла на рост пропионовокислых бактерий *Propionibacterium shermanii* в осветленной творожной сыворотке

Исследование микробиологических показателей ферментированной творожной сыворотки с добавлением кедрового масла чистой закваской *Propionibacterium shermanii* проводили в два этапа. Первым этапом при приготовлении ферментированных продуктов является проверка кедрового масла на присутствие посторонней микрофлоры. Масло кедровое пресованное нерафинированное ТУ 914–001–73225681–2005 было приобретено в компании Байкалкопродукт, ООО, Улан-Удэ (Россия).

Следующий этап – внесение кедрового масла разной концентрации в стерилизованную осветленную творожную сыворотку. Затем ферментировали глубинно при температуре 28°C в течение 7 суток. В качестве контроля использовали творожную сыворотку с чистой культурой *Propionibacterium shermanii*.

Для определения влияния кедрового масла на рост пропионовокислых бактерий кедровое масло вносили в концентрации 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 5 % от объема питательной среды. Для определения динамики роста через определённые промежутки времени проводили количественный учёт клеток.

По результатам исследования построили кривые роста (рис. 1).

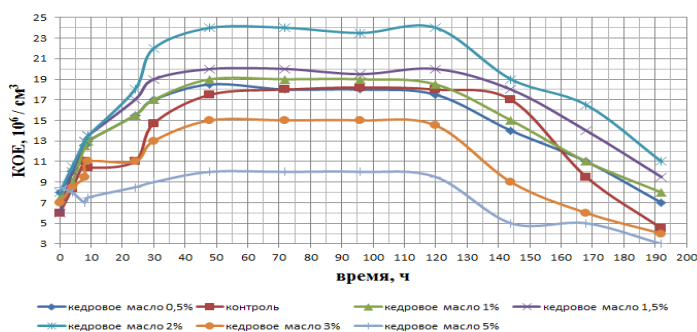


Рисунок 1. Динамика роста культуры *Propionibacterium shermanii* при внесении разной концентрации кедрового масла

Анализ динамики роста пропионовокислых бактерий показал, что максимальный прирост биомассы наблюдается через 48 часов культивирования. При этом наиболее хороший рост бактерий наблюдается при внесении 2 % кедрового масла от объема питательной среды. При внесении 3 и 5 % кедрового масла от объема питательной среды рост биомассы пропионовокислых бактерий меньше, а 0,5; 1,0 и 1,5 % кедрового масла от объема питательной среды количество клеток больше, чем в контрольной пробе.

Таким образом, внесение кедрового масла в количестве 2,0 % от объема питательной среды является наиболее оптимальной дозой для роста пропионовокислых бактерий.

Следует отметить, что в процессе культивирования пропионовокислых бактерий в сочетании с кедровым маслом среда обогащается не только полиненасыщенными кислотами, но и метаболитами пропионовокислых бактерий. Для дальнейших исследований по разработке ферментированных косметических средств целесообразно использовать культуральную жидкость с добавлением 2 % кедрового масла от объема питательной среды.

Литература

- Кедровое масло в косметологии // Электронный ресурс.: [https:// www.russianhunt.ru](https://www.russianhunt.ru) (24.06.20015 г.).
Хамагаева И.С., Замбалова Н.А., Буянтуева Л.В. Качество и конкурентоспособность пробиотической биологически активной добавки, содержащей омега-3 и омега-6 жирные кислоты // Вестник ВСГУТУ. – 2015. – № 3. – С. 62–67.

СИНТЕЗ МАГНИТНЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ НА ОСНОВЕ ФЕРМЕНТОВ КЛАССА ОКСИДОРЕДУКТАЗ

О.В. Гребенникова, А.М. Сульман, Е.И. Шиманская, В.Г. Матвеева

Тверской государственный технический университет, Тверь, Россия

Использование биокатализа в промышленных процессах по сравнению с традиционными синтетическими путями имеет некоторые преимущества. Например, благодаря ферментативным процессам, производится меньше отходов, ферментативные процессы являются более энергоэффективными и обеспечивают получение продуктов с высокой чистотой. Однако, использование ферментов в растворимой форме часто затрудняется их ценой, нестабильностью и трудностью в их восстановлении и повторном использовании [1]. Эти недостатки устраняются путем иммобилизации фермента на твердые носители, поскольку иммобилизованный биокатализатор показывает улучшенную стабильность при хранении и эксплуатации, его можно легко отделить от продуктов в реакционной смеси и повторно использовать [2]. Использование магнитных наночастиц в качестве носителей иммобилизации ферментов, за счёт их уникальных свойств, таких как контролируемый размер частиц, большая площадь поверхности, модифицируемая поверхность и легкое восстановление путем приложения магнитного поля, позволяют повторно использовать их для каталитических процессов [3].

В данной работе был проведён синтез двух магнитных катализаторов на основе иммобилизованной пероксидазы корня хрена (HRP). Магнитные наночастицы, синтезировались с помощью метода соосаждения. Первый биокатализатор синтезировался с использованием 3-аминопропилтриэтоксисилана (АПТС) и глутарового альдегида (ГА) в качестве сшивающего агента. Модифицированные и активированные частицы Fe_3O_4 обрабатывали HRP. Полученный катализатор обозначался как $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{АПТС}/\text{ГА}/\text{HRP}$. Второй биокатализатор синтезировался, используя тетраэтоксисилан (ТЭОС). Носитель, так же, модифицировали и активировали с помощью АПТС, ГА и HRP. Полученный катализатор обозначался как $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{АПТС}/\text{ГА}/\text{HRP}$.

В качестве окисляемого субстрата был выбран 2,2'-азино-бис (3 этилбензотиазолин-6-сульфонат) аммония, который при окислении пероксида водорода в присутствии HRP дает голубое окрашивание.

В ходе экспериментов выяснилось, что наибольшую активность показал катализатор $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{АПТС}/\text{ГА}/\text{HRP}$. Эксперименты по подбору оптимальной температуры показали, что температурный оптимум данной биокаталитической системы достигается при 45 °С. Эксперименты по многократному использованию иммобилизованной пероксидазы показали, что ее активность снижается с каждым последующим циклом не более чем на 2–3 %, что позволяет эффективно и многократно использовать данный биокатализатор в процессах окисления фенольных соединений [4].

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда содействия инновациям (программа У.М.Н.И.К., договор 16434ГУ/2021 от 28.05.2021)

Литература

- Grosu E.F., Carja G., Froidevaux R. Development of horseradish peroxidase/layered double hydroxide hybrid catalysts for phenol degradation // *Res Chem Intermed.* 2018. vol. 44, P. 7731–7752.
- Thompson M.P., Peñafiel I., Cosgrove S.C., Turner N.J., Biocatalysis Using Immobilized Enzymes in Continuous Flow for the Synthesis of Fine Chemicals // *Organic Process Research & Development.* 2019. vol. 23/issue 1. P 9–18.
- Sahare P., Ayala M., Vazquez-Duhalt R., Agrawal V. Immobilization of peroxidase enzyme onto the porous silicon structure for enhancing its activity and stability [Электронный ресурс] // *Nanoscale Research Letters.* 2014.
- Grebennikova O., Sulman A., Matveeva V., Sulman M. Biocatalyst for the environmentally friendly synthesis of vitamin E intermediate. *Clean Techn Environ Policy* (2021). <https://doi.org/10.1007/s10098-021-02093-0>

УДК 678.554

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ АЛЬГИНАТА НАТРИЯ НА МОРФОЛОГИЮ МИКРОЧАСТИЦ, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ ВНУТРЕННЕГО ГЕЛЕОБРАЗОВАНИЯ**П.Ю. Стадольникова, Б.Б. Тихонов, А.И. Сидоров, М.Г. Сульман***ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет, Тверь, Россия»*

Среди всех известных полимерных микрочастиц именно альгинатные микросферы являются одними из наиболее широко распространенных систем для инкапсуляции различных биологически активных веществ и иммобилизации ферментов и клеток благодаря их небольшому размеру и эффективным характеристикам носителя, таким как дешевизна, биосовместимость, направленность на специфические связывающие сайты, высвобождение инкапсулированного препарата заданным образом, нетоксичность и биоразлагаемость в пределах приемлемого периода времени [1, 2]. Термин «альгинатные микросферы» часто используется в литературе как синоним для обозначения альгинатных микрогелей, микрокапсул, микрочастиц или микрошариков [1]. Микросферы имеют сферическую форму частиц в размерном диапазоне от 1 до 1000 мкм [2].

Для получения микросфер с желаемыми параметрами необходим выбор нужного, хорошо продуманного метода синтеза. Ряд параметров синтеза (концентрация альгината, масляная фаза, поверхностно-активное вещество, концентрации сшивающего агента и время сшивки, скорость перемешивания, морфология частиц, свойства и эффективность инкапсуляции) оказывает влияние на физические, химические и биологические свойства альгинатных микрочастиц. Альгинатные микросферы получают с помощью трех основных способов: распылительной сушки, экструзии и метода эмульгирования / гелеобразования. Техника эмульгирования / гелеобразования позволяет изготавливать микросферы в микромасштабе, при этом размер частиц может быть менее 100 мкм, имеет при этом низкую стоимость и относительно простое экспериментальное оборудование. Обычно метод включает в себя два этапа: образование стабильных полимерных капель в эмульсионной системе вода-в-масле и последующее затвердевание (гелеобразование) этих капель. Согласно этому методу, гелеобразование происходит, когда раствор альгината взаимодействует с ионами сшивающего агента. Существует два типа гелеобразования: внутреннее и внешнее [2]. Метод внутреннего гелеобразования позволяет формировать частицы в субмиллиметровом диапазоне размеров, что снижает ограничения массопереноса с возможностью получения таких бусин в промышленном масштабе (м³/ч) [3]. Реакционная среда при использовании метода внутреннего гелеобразования для получения альгинатных микрочастиц содержит, кроме альгината натрия, масло, нерастворимый кальциевый комплекс, поверхностно-активное вещество и органическую кислоту. Внутреннее гелеобразование (желирование диспергированных в масляной фазе альгинатных капель) может быть инициировано высвобождением катионов кальция из нерастворимого комплекса (соли кальция, такой как карбонат) посредством понижения pH с использованием органической кислоты (чаще всего ледяной уксусной). Контролируя условия, при которых происходит образование водно-масляной дисперсии, размер микрошариков можно регулировать [4, 5].

Концентрация альгината считается наиболее важным фактором, влияющим на характеристики альгинатных микросфер, такие как морфология и размер частиц. Увеличение концентрации альгината приводит к увеличению вязкости альгинатного раствора, что увеличивает межфазное натяжение между каплями альгината и масляной фазой. Следовательно, должны образовываться более крупные микросферы [2]. В рамках данной работы будет рассмотрено влияние именно этого фактора на размер и морфологию микрочастиц, получаемых методом внутреннего гелеобразования.

Материалы и методы. Альгинатные микросферы были получены с помощью модифицированного метода внутреннего гелеобразования раствора альгината натрия, превращенного в эмульсию в растительном масле [3, 5]. Нерастворимый в воде карбонат кальция равномерно распределяется в растворе альгината натрия, после чего добавляется растительное масло, содержащее поверхностно-активное вещество, и полученная смесь интенсивно перемешивается для образования водно-масляной эмульсии. Гелеобразование начинается с добавления органической кислоты, таким образом, сдвиг pH в диапазон низких значений провоцирует высвобождение ионов кальция из нерастворимой его соли. Кальций-альгинатные шарики формируются в процессе контактирования ионов Ca²⁺ и альгината посредством образования ионного комплекса. Полученные микросферы осаждаются из масляной фазы раствором хлорида кальция.

0,08 г. микрокристаллического порошка карбоната кальция CaCO_3 добавляется в 20 г. раствора альгината разной концентрации (1 %; 1,5 %; 2 %; 2,5 %; 3 %; 3,5 %) при постоянном перемешивании. Полученная суспензия диспергируется в 40 мл подсолнечного масла, содержащего Span 80 (2 % об.) и интенсивно перемешивается в течение 2 минут. После эмульгирования в смесь добавляется 30 мл подсолнечного масла, содержащего 2 % (об.) Span 80 и 0,2 мл ледяной уксусной кислоты. Интенсивное перемешивание продолжается в течение 10 минут. Далее в смесь добавляется 150 мл дистиллированной воды, перемешивание продолжается при умеренной интенсивности в течение 30 минут. Для отделения образовавшихся гелевых кальций-альгинатных шариков от масляной фазы добавляется 250 мл осаждающего раствора 0,05М хлорида кальция, содержащего 1 % (об.) Tween 80. Полученные микросферы осаждаются из масляной фазы, которая удаляется из системы путем последующей декантации. Далее осадок альгинатных микросфер промывается 0,05 М раствора хлорида кальция, содержащего 1 % (об.) Tween 80. Микрочастицы отмываются несколько раз водой до полного удаления следов масла, что контролируется наблюдением в оптический микроскоп. Полученные частицы наблюдаются в световом поле оптического микроскопа (Digital microscope Inskam-315 12MP 1000X). Размер микрочастиц и кластеров оценивался с помощью размерной сетки камеры Горяева (сторона малого квадрата $0,05 \pm 0,001$ мм, сторона большого квадрата $0,2 \pm 0,001$ мм).

Результаты и обсуждение. Морфология микросфер визуально оценивалась с помощью метода оптической микроскопии. Полученные в результате внутреннего гелеобразования кальций-альгинатные гелевые частицы после отделения от масляной эмульсии и промывки дистиллированной водой сгруппированы в отдельные кластеры, представляющие собой определенным образом скомпонованные микросферы внутри прозрачных оболочек, образованных сурфактантом Tween 80.

Внешние свойства кластеров кальций-альгинатных микросфер и масштабная сетка камеры Горяева представлены на рисунках 1–3. Средние размеры микрочастиц и их оболочек в видимом поле микроскопа приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Размеры частиц в видимом поле микроскопа при варьировании концентрации альгината натрия

Концентрация альгината, %	Средний диаметр микросфер, мкм	Средний диаметр оболочки, мкм
1 %	$12,23 \pm 1$	$58,15 \pm 1$
1,5 %	$14,47 \pm 1$	$84,78 \pm 1$
2 %	$14,98 \pm 1$	$129,28 \pm 1$
2,5 %	$15,31 \pm 1$	$164,85 \pm 1$
3 %	$8,68 \pm 1$	$178,034 \pm 1$
3,5 %	$9,38 \pm 1$	$312,31 \pm 1$

Концентрация альгината натрия 1 % приводит к образованию небольших кластеров, наблюдается преимущественное количество разрозненных и стремящихся к обособленности частиц (рисунок 1, а и б). В выбранном диапазоне концентраций полимера размер оболочек и средний диаметр микросфер являются минимальными именно при данной концентрации альгината натрия. При увеличении концентрации альгината до 1,5 %, наблюдаются малые и средние скопления четкой оформленной структуры, подобные друг другу (рисунок 1, в и г). Количество частиц внутри оболочек увеличивается, и в основном микросферы располагаются упорядоченно скученно, формируя кластеры характерного вида.

Дальнейший рост концентрации полимера приводит к росту диаметра микросфер и образуемых ими скоплений (рисунок 2). При концентрации альгината, начиная с 2,5 %, наблюдается появление пустых оболочечных структур. Присутствует очень плотная упаковка частиц внутри более крупных сфер и небольших оболочек, которые, в свою очередь, входят в состав более крупных скоплений (черные пятна на рисунке 2, в) и г) – следствие недостаточной разрешающей способности микроскопа). Распределение микросфер в кластерах становится все более неупорядоченным, скопления теряют свой характерный вид.

С увеличением концентрации альгината до 3–3,5 % кластеры становятся все менее компактными, увеличивается размер и плотность оболочек, происходит их деформация, а сгруппированные внутри них микросферы теряют упорядоченность упаковки и становятся неравномерно распределенными по площади оболочки (наблюдается тенденция к неупорядоченной скученности и неравномерному заполнению пространства частицами внутри скоплений) (рисунок 3).

Оболочки становятся настолько крупными, что захватывают более мелкие оболочки с частицами. Скопления представляют собой крупные частицы в окружении россыпи более мелких микросфер, т. е. частицы становятся все более неоднородными в размерном распределении. Средний диаметр микросфер, несмотря на увеличение максимального диаметра частиц, уменьшается, что может быть объяснено неравномерным распределением зерен карбоната кальция в растворе альгината повышенной вязкости и невозможностью равномерной гомогенизации такого раствора.

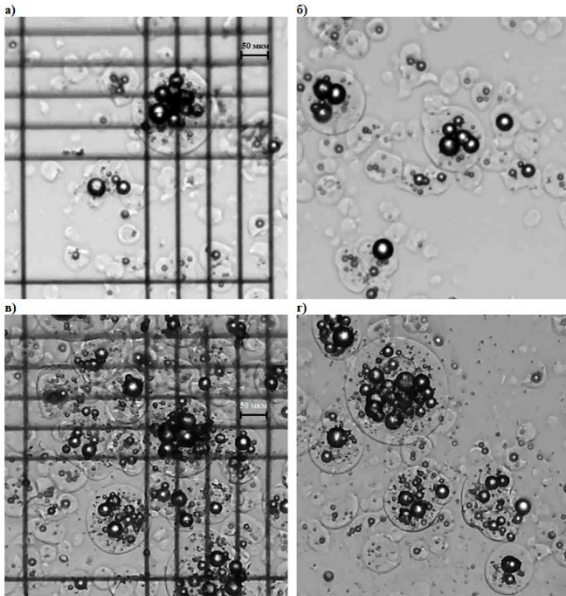


Рисунок 1 – Морфология микросфер при концентрации альгината 1 % (рисунки а и б) и 1,5 % (рисунки в и г)

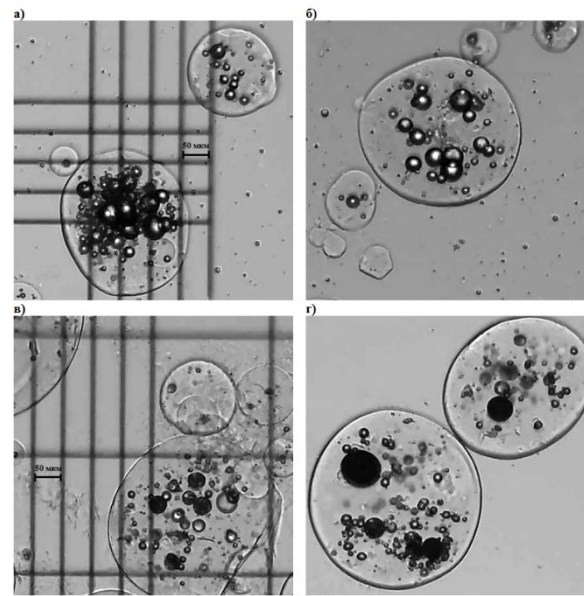


Рисунок 2 – Морфология микросфер при концентрации альгината 2 % (рисунки а и б) и 2,5 % (рисунки в и г)

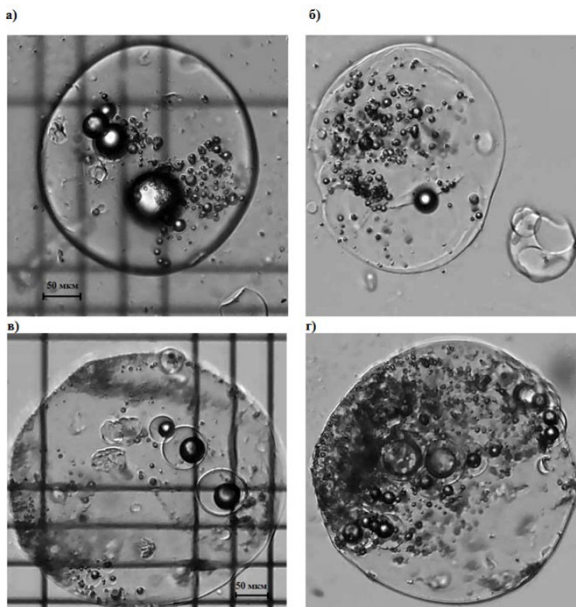


Рисунок 3 – Морфология микросфер при концентрации альгината 3 % (рисунки а и б) и 3,5 % (рисунки в и г)

Наблюдаемые изменения в структуре кластеров объясняются тем, что чем выше концентрация альгината, тем более вязкой становится дисперсия вода-в-масле, образуются более крупные альгинатные капли и, следовательно, в результате получаются более крупные микросферы, в свою очередь сбивающиеся в более крупные агрегаты. Также повышенная вязкость раствора приводит к технологическим трудностям, в частности, к невозможности достигнуть постоянства перемешивания, и, как следствие, к плохой гомогенизации эмульсии и худшему распределению карбоната кальция в растворе полимера в масляной эмульсии, что ведет к деформации капель полимера и неравномерному распределению частиц по размерам, а также к деформации оболочек. Таким образом, чем выше концентрация альгината, тем более вязкой становится дисперсия, которая образует более крупные альгинатные капли и, следовательно, более крупные микросферы.

Заключение. С помощью модифицированной методики внутреннего гелеобразования были получены альгинатные микросферы. Было проведено изучение влияния концентрации важного компонента синтеза – альгината натрия – на размер, форму и морфологию полученных частиц. Морфология, расположение, наличие и форма агрегатов визуально оценивались с помощью оптического микроскопа. Таким образом, оптимальной концентрацией альгината, позволяющей получать компактные правильно организованные структуры, однородные в своей массе, с четко прослеживающимися закономерностями и свойствами, является концентрация 1,5 %.

Литература

- Dhamecha N.T.T., Movsas R., Sano U., Menon J.U. Applications of alginate microspheres in therapeutics delivery and cell culture: Past, present and future // *International Journal of Pharmaceutics*. 2019. Vol. 569. P. 1–13.
- Uyen D., Movsas R., Hamid Z.A.A., Tram N.X.T., Ahmad N.B. Fabrication of alginate microspheres for drug delivery: a review // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019. Vol. 153. P. 1035–1046.
- Poncellet D., Lencki R., Beaulieu C., Halle J.P., Neufeld R.J., Fournier A. Production of alginate beads by emulsification/internal gelation: Methodology // *Appl. Microbiol. Biot.* 1992. Vol. 38. P. 39–45.
- Ahmed M.M., Abd El-Rasoul S., Auda S.H., Ibrahim M.A. Emulsification/internal gelation as a method for preparation of diclofenac sodium–sodium alginate microparticles // *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2013. Vol. 21. P. 61–69.
- Wang X., Zhu K. – X., Zhou H. – M. Immobilization of Glucose Oxidase in Alginate-Chitosan Microcapsules // *International Journal of Molecular Sciences*. 2011. Vol. 12. P. 3042–3054.

УДК 663.1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ ГРУППЫ В В ФЕРМЕНТАЦИОННОМ БУЛЬОНЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Н.Ю. Хромова, Ю.М. Епишкина, Н.В. Хабибулина, И.В. Шакир, В.И. Панфилов

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

Введение. В настоящее время концепция пробиотиков продолжает стремительно развиваться. Положительное влияние пробиотических бактерий на организм человека и животных все больше подтверждается с помощью лабораторных и клинических исследований [1]. Одним из перспективных направлений, связанных с пробиотиками, является поиск штаммов среди лакто- и бифидобактерий, обладающих способностью синтезировать витамины группы В. В-гиповитаминозы среди населения России встречаются чаще всего [2]. Недостаток витаминов группы В у человека приводит к нарушениям в работе нервной и сердечно-сосудистой системы, иммунного гомеостаза, микробиоты, когнитивных функций, гормональной системы витамина D [2–4]. У животных дефицит витаминов группы В приводит к нарушению воспроизводительной способности и обмена веществ, потере веса и его низкому приросту, дерматитам, снижению производительности и резистентности организма, рождению нежизнеспособного потомства и развитию злокачественной анемии. Нередко В-гиповитаминозы осложняются поражениями желудочно-кишечного тракта [5]. Разумный выбор пробиотических штаммов для производства различных добавок и ферментированных продуктов позволит получить синергетический эффект, который будет заключаться не только в широком спектре полезных пробиотических свойств, но и способствовать частичному восполнению дефицита витаминов В. Пробиотические штаммы, обладающие способностью синтезировать витамины В, могут стать потенциальными кандидатами для их производства *in situ* после колонизации в кишечнике, т. е. будут выступать в качестве их поставщиков [6].

Традиционными методами для идентификации и количественного определения водорастворимых витаминов группы В в препаратах, премиксах и пищевых продуктах являются высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), фотометрия и флуориметрия. Преимуществом ВЭЖХ в отличие от фото- и флуориметрических методов является одновременное определение контролируемых компонентов.

В последнее время для определения витаминов все чаще используется метод капиллярного электрофореза (КЭ), который помимо одновременного анализа всех компонентов, обладает рядом преимуществ перед хроматографическими методами: не требует наличия хроматографических колонок, для проведения анализа необходимо небольшое количество реактивов, что является экономически выгодным, а также капиллярный электрофорез обеспечивает высокую эффективность разделения биологически активных веществ [7].

Таким образом, цель работы заключалась в исследовании способности штаммов пробиотических бактерий *Lactobacillus casei* (ВКПМ В-2873) и *Bifidobacterium breve* (ВКПМ АС-1911) продуцировать витамины группы В на основе анализа их ферментационных бульонов методом капиллярного электрофореза.

Материалы и методы. В качестве объектов исследования использовали штаммы пробиотических бактерий *Lactobacillus casei* (ВКПМ В-2873) и *Bifidobacterium breve* (ВКПМ АС-1911), предоставленные в лиофилизированной форме Всероссийской коллекцией промышленных микроорганизмов (ВКПМ, Москва, Россия). Для получения инокулята лактобактерии культивировали в питательной среде Man–Rogosa–Sharpe (MRS) при 37 °С в течение 24 ч, бифидобактерии – в бифидум-среде при 37 °С в течение 24 ч. Для получения образцов для исследования витаминов группы В лакто- и бифидобактерии культивировали в различных питательных средах при 37 °С в течение 24 ч.

Для определения способности штаммов пробиотических бактерий продуцировать водорастворимые витамины группы В использовали различные варианты питательных сред в зависимости от культуры микроорганизмов: для лактобактерий: 1) стандартная среда MRS; 2) питательная среда для определения фолиевой кислоты; для бифидобактерий: 1) бифидум-среда; 2) питательная среда для определения фолиевой кислоты.

Питательная среда для определения фолиевой кислоты была составлена на основе среды для анализа фолиевой кислоты (Difco™, США) с некоторыми модификациями в составе (приблизительная формула на литр): казаминовые кислоты (триптон) – 12.0 г.; глюкоза – 40.0 г.; цитрат натрия – 20.0 г.; L-цистин – 0.2 г.; DL-триптофан – 0.2 г.; сульфат аденина – 20.0 мг; гуанина – 20.0 мг; уридин – 20.0 мг; тиамина гидрохлорид – 2.0 мг; пиридоксина гидрохлорид – 4.0 мг; рибофлавин – 2.0 мг; ниацин – 2.0 мг; p-аминобензойная кислота – 200.0 мкг; биотин – 0.8 мкг; дикалийфосфат – 1.0 г.; монокалийфосфат – 1.0 г.; сульфат магния – 0.4 г.; хлорид натрия – 20.0 мг; сульфат железа – 20.0 мг; сульфат марганца – 20.0 мг (pH 7.0).

Анализ свободных форм водорастворимых витаминов группы В и их количественное определение в ферментационном бульоне пробиотических бактерий проводили на системе капиллярного электрофореза «Капель – 105М» «Люмэкс» (Россия) с положительной полярностью, оснащенной кварцевым капилляром со специальной геометрией, аналогичной аминокислотному (внутренний диаметр пор 50 мкм, общая / эффективная длина 75/65 см)) и специализированным программным обеспечением. Подготовка проб для проведения исследований состояла в осаждении клеток микроорганизмов с помощью центрифуги Eppendorf 5810R (Eppendorf, Германия) при 7500 об/мин в течение 10 мин. После чего для более тщательной очистки надосадочные жидкости помещали в центрифужные концентраторы Amicon Ultra-15 (Merck, Германия) с диаметром пор целлюлозной мембраны 3 кДа и центрифугировали в течение 15 мин при 7500 об/мин. Разделение, идентификацию и определение массовых концентраций водорастворимых витаминов В₁, В₂, В₃, В₆, В_с проводили методом капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ), витамина В₅ (никотинамид) методом мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ) согласно практическому руководству по использованию систем капиллярного электрофореза «Капель» [8] и методики М 04–72–2011 [9]. Условия детектирования для витаминов В₁, В₂, В₃, В₆, В_с: капилляр: кварц, 50 мкм, 75 см; напряжение + 25 кВ; длина волны в начале анализа 200 нм, после выхода пика В₁ 267 нм, после выхода пика В₂ и до конца анализа 200 нм; температура 30 °С; давление в начале анализа 0 мбар, после выхода пика В₆ – 30 мбар до конца анализа. Условия детектирования для витамина В₅ (никотинамид): капилляр: кварц, 50 мкм, 75 см; напряжение + 25 кВ; длина волны 200 нм; температура 40 °С; давление 0 мбар.

Результаты. Исследование ферментационного бульона штамма *L. casei*, полученного после глубинного культивирования в стандартной среде MRS, на содержание свободных форм водорастворимых витаминов группы В методом капиллярного электрофореза показало, что данный штамм способен продуцировать и выводить в раствор витамины: В₂ (рибофлавин), В₃ (пантотеновой кислоты кальциевая соль) и В₅ (никотинамид). При этом наибольшая концентрация обнаруживалась для пантотеновой кислоты кальциевой соли (520.4 мг/л) (таблица 1). После культивирования *L. casei* в питательной среде для анализа фолиевой кислоты в образцах было установлено наличие витаминов: В₁ (тиамина хлорид), В₃ (пантотеновой кислоты кальциевая соль) и В₆ (пиридоксин) (таблица 1).

Таблица 1. Концентрация витаминов группы В в ферментационных бульонах культуры *L. casei* до и после культивирования в различных питательных средах

Витамины	Концентрация витаминов, мг/л			
	MRS		Среда для определения фолиевой кислоты	
	До	После	До	После
В ₁ (тиамина хлорид)	н/о*	н/о	н/о	19.54
В ₂ (рибофлавин)	н/о	2.43	н/о	н/о
В ₃ (пантотеновой кислоты кальциевая соль)	н/о	520.4	н/о	3.97
В ₅ (никотинамид)	11.37	14.21	61.37	н/о
В ₆ (пиридоксин)	0.95	н/о	0.95	11.40
В _с (фолиевая кислота)	0.27	н/о	0.27	н/о

* – не обнаружено

Исследование ферментационного бульона штамма *B. breve*, полученного после глубинного культивирования в бифидум-среде, на содержание свободных форм водорастворимых витаминов группы В методом капиллярного электрофореза показало, что данный штамм способен продуцировать и выводить в раствор витамины В₂ (рибофлавин), В₅ (никотинамид), В₆ (пиридоксин). После культивирования *B. breve* в питательной среде для анализа фолиевой кислоты в образцах было установлено наличие витаминов В₂ (рибофлавин), В₅ (никотинамид) (таблица 2).

Таблица 2. Концентрация витаминов группы В в ферментационных бульонах культуры *B. breve* до и после культивирования в различных питательных средах

Витамины	Концентрация витаминов, мг/л			
	Бифидум-среда		Среда для определения фолиевой кислоты	
	До	После	До	После
В ₁ (тиамина хлорид)	н/о*	н/о	н/о	н/о
В ₂ (рибофлавин)	0.34	0.50	1.19	0.50
В ₃ (пантотеновой кислоты кальциевая соль)	н/о	н/о	н/о	н/о
В ₅ (никотинамид)	н/о	0.89	52.97	н/о
В ₆ (пиридоксин)	н/о	48.07	н/о	45.73
В _с (фолиевая кислота)	н/о	н/о	н/о	н/о

* – не обнаружено

При этом концентрации пиридоксина после культивирования *B. breve* в бифидум-среде и среде для определения фолиевой кислоты были сопоставимы.

Дискуссия. Известно, что некоторые штаммы лакто- и бифидобактерий обладают способностью к биосинтезу витаминов группы В. Пробиотические свойства в совокупности с потенциалом обогащения продуктов витаминами в процессе ферментации или производства витаминов *in situ* в желудочно-кишечном тракте открывают новые перспективы для разработки пробиотических добавок и продуктов. Штаммы молочнокислых бактерий *L. casei* и бифидобактерий *B. breve* широко используются в качестве пробиотиков, а также для производства функциональных продуктов. В настоящем исследовании методом капиллярного электрофореза было установлено наличие в ферментационных бульонах штамма *L. casei* (ВКПМ В-2873) витаминов: тиамина хлорид, рибофлавин, пантотеновой кислоты кальциевая соль, никотинамид и пиридоксин. Их концентрация зависела от типа питательной среды. Можно предположить, что состав среды оказывает сильное влияние на продукцию и накопление витаминов. В ферментационных бульонах штамма *B. breve* (ВКПМ АС-1911) были обнаружены рибофлавин и пиридоксин. Последний в питательных средах до культивирования не обнаруживался. В целом полученные результаты согласуются с исследованиями других авторов [10–12]. Дальнейшие исследования будут сосредоточены на скрининге различных штаммов лакто- и бифидобактерий на способность к микробному биосинтезу витаминов группы В.

Закключение. Поиск штаммов пробиотических культур, обладающих способностью синтезировать витамины группы В, в настоящее время является перспективным направлением. Такие культуры могут найти применение в кормопроизводстве и животноводстве, а также в пищевой промышленности. В настоящей работе была исследована способность штаммов пробиотических бактерий *Lactobacillus casei* (ВКПМ В-2873) и *Bifidobacterium breve* (ВКПМ АС-1911) продуцировать витамины группы В. Методом капиллярного электрофореза были проанализированы ферментационные бульоны микроорганизмов, полученные после глубинного культивирования в питательных средах различного состава. В результате исследования для каждой культуры были обнаружены и определены массовые концентрации свободных форм водорастворимых витаминов. Установлено, что наличие тех или иных витаминов группы В и их количества для штамма *L. casei* заметно различалось в зависимости от типа питательной среды и ее состава. В то же время для штамма *B. breve* такого не наблюдалось. В дальнейшем интерес также представляет исследование влияния условий культивирования штаммов с целью интенсификации биосинтеза витаминов группы В.

Благодарности. Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках гранта Президента РФ на 2021–2022 гг. для молодых ученых – кандидатов наук, соглашение № 075–15–2021–459 (МК-1171.2021.5).

Литература

- Day R.L.J. et al. Probiotics: current landscape and future horizons // *Futur. Sci. OA. Future Science*, 2019. Vol. 5, № 4. P. FSO391.
- Коденцова В.М., Вржесинская О.А. Анализ отечественного и международного опыта использования обогащенных витаминами пищевых продуктов // *Вопросы питания. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки*, 2016. Vol. 85, № 2.
- Коденцова В.М., Леоненко С.Н., Рисник Д.В. Витамины группы В в профилактике заболеваний // *Вопросы диетологии. Общество с ограниченной ответственностью Издательство Династия*, 2020. Vol. 10, № 2. P. 23–34.
- Литвицкий П.Ф. Нарушения обмена витаминов // *Вопросы современной педиатрии. Общественная организация «Союз педиатров России»*, 2014. Vol. 13, № 4.
- Волгин В.И. et al. Полноценное кормление молочного скота—основа реализации генетического потенциала продуктивности. Федеральное государственное бюджетное учреждение "Российская академия наук", 2018.
- Arena M.P. et al. Probiotic abilities of riboflavin-overproducing *Lactobacillus* strains: a novel promising application of probiotics // *Appl. Microbiol. Biotechnol. Springer*, 2014. Vol. 98, № 17. P. 7569–7581.
- Бёккер Ю. Хроматография. Инструментальная аналитика: методы хроматографии и капиллярного электрофореза. Litres, 2017.
- Комарова Н.В., Каменцев Я.С. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «Капель» // СПб. ООО «Веда. 2006. Vol. 212.
- М 04–72–2011. Методика измерений содержания свободных форм водорастворимых витаминов в премиксах, витаминных концентратах, смесях и добавках, в том числе жидких, методом капиллярного электрофореза с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель 105/105М».
- Deguchi Y., Morishita T., Mutai M. Comparative studies on synthesis of water-soluble vitamins among human species of bifidobacteria // *Agric. Biol. Chem. Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry*, 1985. Vol. 49, № 1. P. 13–19.
- Magnúsdóttir S. et al. Systematic genome assessment of B-vitamin biosynthesis suggests co-operation among gut microbes // *Front. Genet. Frontiers*, 2015. Vol. 6. P. 148.
- LeBlanc J.G. et al. Beneficial effects on host energy metabolism of short-chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria // *Microb. Cell Fact. BioMed Central*, 2017. Vol. 16, № 1. P. 1–10.

УДК 581.192.7

СИНТЕЗ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО СВОЙСТВ**Е.А. Кузнецова, Г.М. Зомитева, Е.А. Кузнецова, К.А. Рыжикова, К.Д. Казакова***Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Орел, Россия*

Несмотря на достигнутые успехи в области биотехнологии микробных полисахаридов, число их, выпускаемое промышленностью, крайне невелико; проблема поиска новых продуцентов и экономичных способов их получения стоит по-прежнему остро.

Особого внимания с этой точки зрения заслуживают микроорганизмами, обитающие на корнях и в прикорневой зоне растений [1]. Из числа таких микроорганизмов в последние годы принято выделять группу «ризобактерий, стимулирующих рост растений» (PGPR). Важное место среди них занимают азотфиксаторы – бактерии рода *Rhizobium*, которые повсеместно распространены в корневой зоне бобовых и других растений [2].

Известно, что для бактерий рода *Rhizobium* очень важным инструментом в колонизации растения хозяина выступает выделение полисахаридной слизи, которая участвует в прикреплении бактериальной клетки к корневому волоску и запускает в клетке корня формирование нитей нодуляции. Для такого процесса необходимо постоянное и обильное выделение экзополисахаридов [3, 4]. Вместе с тем, в литературных источниках недостаточно данных о возможности биотехнологического получения ценных экзополисахаридов ризобий.

Цель исследования – получение препарата экзополисахарида путем микробного синтеза с использованием штамма *Rhizobium leguminosarum* ВКМ В-1003 и изучение его состава и свойств.

Для выращивания бактерии был использован глубинный периодический способ культивирования в биореакторе MINIFORS 2 на модифицированной жидкой питательной среде PGYL с добавлением 10 г./л маннита и 0,1 % комплекса витаминов (В1, В6, РР, В12, С). Культивирование осуществляли в течение 7 суток при средних значениях температуры 24 °С, содержание кислорода было установлено и контролировалось в биореакторе на уровне 21 % (в условиях непрерывной аэрации), pH среды составляла 7,3. В качестве пеногасителя использовали глицерин.

При изучении динамики роста *R. leguminosarum* В-1003 и продукции экзополисахаридов было установлено, что максимальное значение вязкости наблюдается в середине логарифмической стадии развития культуры. Развитие бактерий в стационарной фазе не сопровождается накоплением экзополисахаридов, о чем свидетельствует стабильное значение кинематической вязкости среды роста в этот период. Поэтому для получения культуры с максимальным показателем кинематической вязкости время инкубации определяется 5–6 сутками.

Выделение экзополисахарида проводили следующим образом: на первом этапе провели фильтрацию культуральной жидкости, но биомасса микроорганизмов представляла собой мелко дисперсную смесь, поэтому сразу было проведено центрифугирование с помощью центрифуги BioSan LMC-4200R при 4 °С, 40 минут, 4000g. После центрифугирования отделили супернатант и внесли в него двойной объем 96 % охлажденного этилового спирта для экстракции экзополисахарида. Сосуд с раствором поместили в холодильник при температуре 3–5 °С на 24 часа. При добавлении этанола к концентрату бесклеточной культуральной жидкости *Rhizobium leguminosarum* ВКМ В-1003 сразу наблюдалось выпадение белого хлопьеобразного слизистого осадка, количество которого увеличивалось при охлаждении до 4 °С и перемешивании.

Полученный гелеобразный студенистый экзополисахарид высушивали в суховоздушном стерилизаторе ГП-40 СПУ при 37 °С. Полученная плотная сухая корочка измельчалась в порошок в фарфоровой ступке.

Полученный из среды роста *Rhizobium leguminosarum* ВКМ В-1003 препарат был изучен с целью подтверждения полисахаридной природы. Прежде всего были проведены качественные реакции. При проведении реакции Молиша, основанной на дегидратации углеводов концентрированной серной кислотой, наблюдалось красное окрашивание. Все углеводы и гликопротеины дают положительную реакцию Молиша. Следовательно, полученный препарат имеет углеводную природу. Реакция Троммера также дала положительные результаты на ОН-группы с CuSO_4 , что также говорит о наличии сахаров в исследуемом материале.

Известно, что некоторые экзополисахариды бактерий могут быть образованы из мономеров, содержащих аминогруппу (аминосахаров). Качественной реакцией на свободные аминогруппы является тест с нингидрином. При взаимодействии нингидрина со свободными аминами и аммиаком развивается темно-синее или фиолетовое окрашивание. В наших экспериментах положительная нингидриновая реакция была выявлена в пробах с выделенным полисахаридом.

Следующим этапом в процессе идентификации было исследование порошка полученного полисахарида методом ИК-спектроскопии.

Как известно, ИК-область условно делят на ближнюю в диапазоне волновых чисел $4000\text{--}12500\text{ см}^{-1}$, в которой наблюдается электронные и колебательные переходы; основную и среднюю от 625 до 4000 см^{-1} , связанную в основном с колебаниями молекул; и дальнюю от 50 до 625 см^{-1} , в которой наблюдаются вращательные переходы, колебания в тяжелых молекулах, в ионных и молекулярных кристаллах, некоторые электронные переходы в твердых телах, крутильные и скелетно-деформационные колебания в сложных молекулах, например, в биополимерах.

На рисунке 1 приведены ИК-спектры полученного препарата экзополисахарида – продукта синтеза бактерии *Rhizobium leguminosarum* BKM B-1003.

В ИК-спектре препарата присутствуют полосы поглощения, характерные для валентных колебаний – CH_3 группы (1459 см^{-1}), для гидроксильных групп, связанных водородной связью (2361 см^{-1}), имеются свободные спиртовые группы – OH (3856 см^{-1}). Также обнаружены полосы поглощения валентных колебаний – C-C – связей в структуре углеводородного скелета углеводов (1090 см^{-1}), колебаний кратных связей – C=C – ($1637\text{--}1655\text{ см}^{-1}$) и наличие полос поглощения, характерных для групп – NH_2 (3449 см^{-1}).

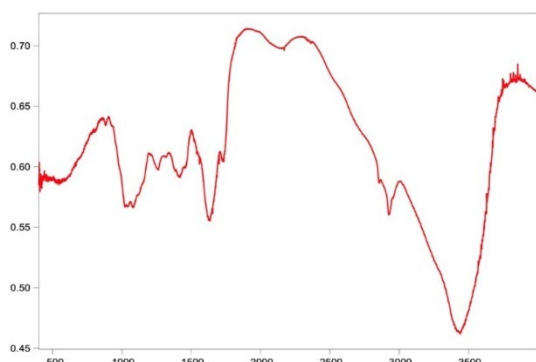


Рисунок 1 – ИК-спектры препарата экзополисахарида *Rhizobium leguminosarum* BKM B-1003

Проведенные исследования позволяют предположить, что полученный экзометаболит имеет углеводную природу и является экзополисахаридом.

Можно также предположить, что экзополисахарид в своем составе содержит функциональные группы, например, диаминогруппы, которые поперечными сшивками, соединены с глюкозными остатками эфирными связями.

Также был проведен кислотный гидролиз экзополисахарида *Rhizobium leguminosarum* BKM B-1003. Для гидролиза легкогидролизуемых полисахаридов использовали обработку 2 % раствором соляной кислоты при температуре $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 3 часов. В результате гидролиза получили 89,5 % редуцирующих сахаров. Таким образом, экзополисахарид бактерии *Rhizobium leguminosarum* BKM B-1003 является легкогидролизуемым

полисахаридом. После проведения гидролиза экзополисахарида методом тонкослойной хроматографии с использованием пластинок Силуфол определили моносахаридный состав экзополисахарида. Установлено, что в состав экзополисахарида бактерии *Rhizobium leguminosarum* BKM B-1003 входят глюкоза, мальтоза и ксилоза.

Таким образом, в результате культивирования ризобактерии *Rhizobium leguminosarum* BKM B-1003 получен и выделен экзополисахарид, в котором выявлены альдегидные группы (реакция Молиша) и свободные OH -группы (реакция Троммера). Также обнаружено с помощью нингидриновой пробы наличие аминогрупп в полисахариде. Проведение исследований методом ИК-спектрометрии показало, что в полисахариде имеются – CH_3 , – OH , – C-C -, – C=C - и – NH_2 группы. Установлено, что полисахарид является легкогидролизуемым. Идентификация углеводов в гидролизате полисахарида методом тонкослойной хроматографии позволила выявить в качестве мономеров глюкозу, мальтозу и ксилозу.

Литература

- Феоктистова Н.В. и др. Ризосферные бактерии // Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки. – 2016. – № 2. – С. 207–224.
- Frayse N, Courdec F, Poinot V. Surface polysaccharide involvement in establishing the *Rhizobium*-legume symbiosis // European Journal of Biochemistry – 2003. – v. 270. – PP.1365–1380
- Laus M, et al. novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin // Molecular Microbiology -2006 – V.59. – PP.1704–1713
- Angus, A.A., Hirsch A.M. Biofilm Formation in the Rhizosphere: Multispecies Interactions and Implications for Plant Growth // Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere. – 2013 – V. 2. – P. 701–712

УДК 663.95

АНАЛИЗ БИОДОСТУПНОСТИ АНТИОКСИДАНТОВ ЧАЙНЫХ СБОРОВ

П.В. Масленников, М.В. Зорин, А.В. Серегина

Балтийский федеральный университет им. И. Канта, институт живых систем, Калининград, Россия

Введение. В последние десятилетия специалисты в области биологии и медицины все большее внимание уделяют проблеме окислительного (оксидативного) стресса и путям его предупреждения. Доказано, что активные формы кислорода оказывают токсическое действие на организм, повреждая мембранные липиды, белки и ДНК. В организмах животных и растений действуют особые защитные механизмы – антиоксидантные системы, компоненты которых способны связывать образующиеся избыточные радикалы, предупреждая развитие оксидативного стресса [1–3]. Образование активных форм кислорода может происходить как в процессе нормального аэробного метаболизма, так и при действии экзогенных физико-химических факторов, прямо или косвенно, генерирующих активные формы кислорода. Усиливающееся негативное действие окружающей среды на современного человека повышает актуальность разработки новых способов профилактики оксидативного стресса [1–3].

В последние годы большое внимание уделяется изучению антиоксидантной активности ряда продуктов питания, в первую очередь растительного происхождения, обусловленной наличием в них полифенолов, в том числе, флавоноидов и таннинов [4]. Эти соединения обладают способностью к прямому ингибированию свободных радикалов и хелатированию металлов, включая железо, оказывая тем самым выраженный антиоксидантный эффект [5]. Популярным продуктом питания, употребляемым подавляющим большинством населения и богатым растительными антиоксидантами, является чай [6]. В настоящее время потребителям доступны разнообразные сорта чая, а также чайные сборы на основе трав. Хотя целебные свойства чая известны с глубокой древности, исследование биохимических и фармакологических свойств чайных сборов с использованием методических возможностей современной науки имеет большую теоретическую и практическую значимость. В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение биодоступности растительных антиоксидантов, содержащихся в чайных сборах. Анализ содержания биологически активных веществ (аскорбиновая кислота, рутин, полифенолы, антоцианы, водорастворимые антиоксиданты) в различных видах чая.

Материалы и методы. Определялось содержание биологически активных соединений в образцах семи видов чая: цветочный чай (Суданская роза, Египет), зеленый чай с лимоном (Lemon Gree Tee, Winckler GmbH, Германия), Фиточай «Амарант» (Россия), цейлонский черный байховый чай с пряностями (Greenfield tea Ltd, Англия), зеленый листовый чай «Marco Tea» (Venture Tea Ltd, Sri Lanka), чай черный байховый мелколистный с ароматом бергамота (Ahmad Tea Ltd, Англия), чайный травяной сбор из мяты (Калининградская область, Россия). Содержание антоциановых пигментов определяли в 1 % солянокислом водном экстракте, предварительно гомогенизировав в течение 30–45 минут при 4500 об/мин. Содержание суммы антоцианов рассчитывали по формуле с применением удельного показателя поглощения цианидин – 3,5 – дигликозида в 1 % водном растворе соляной кислоты (453). Поглощение данных пигментов определяли на спектрофотометре UV-3600 (Shimadzu, Japan) при длине волны 510 нм [7, 8]. Количественное определение каротиноидов проводили спектрофотометрическим методом без предварительного разделения в 100 %-ной ацетоновой вытяжке, с последующим расчетом по формуле Хольма. Для расчета концентрации определяли оптическую плотность экстракта при длинах волн 440, 644, 662 нм [8]. Количественное определение аскорбиновой кислоты проводили титрационным методом [5]. Принцип метода количественного определения витамина С основан на его способности восстанавливать 2,6 – дихлорфенолиндифенол, который в щелочной среде имеет синюю окраску, а в восстановленном состоянии – бесцветный. Количественный уровень рутина определяли по методике Кушмановой методом титра [5]. Определение рутина основано на его способности окисляться перманганатом. В качестве индикатора применялся индигокармин, который вступает в реакцию с перманганатом после того, как окислится весь рутин. Суммарное содержание водорастворимых антиоксидантов (ССА или АОА) определяли амперометрическим методом на приборе «Цвет Яуза 01-ААА» по методике Яшина Я.И. [9]. В работе исследовалась биодоступность антиоксидантов трех чайных сборов – зеленого чая с лимоном (Lemon Gree Tee), цейлонского черного байхового чая с пряностями (Greenfield) и фиточая «Амарант». Для определения биологической доступности антиоксидантов у 30 добровольцев производили отбор слюны.

Добровольцы представляли собой однородную группу, в которую входили лица женского пола в возрасте от 18 до 21 года. Отбор слюны производили натощак (через 3–4 часа после еды). Перед отбором проб необходимо было прополоскать рот дистиллированной водой 2–3 раза. Отобранные пробы центрифугировали или вортиксировали. Надосадочную жидкость количественно переносили в мерную пробирку и разводили элюентом в соотношении 1:50 (100 мкл пробы слюны до 5 мл элюентом). Далее проводили анализ суммарного содержания водорастворимых антиоксидантов. Для оценки биодоступности антиоксидантов образцов чая отбор слюны проводили перед употреблением чая и после, через 60 минут. Статистическую обработку полученных данных проводили в программе Statistica ver. 12 (Statsoft Inc., Thulsa, OK, USA). Для выявления статистически достоверных различий между вариантами эксперимента данные обрабатывали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). В качестве критерия достоверности различий использовался тест множественных сравнений Тьюки (Tukey's HSD test) при уровне значимости $p < 0.05$. Предварительно был проведен тест Шапиро–Уилка для проверки нормальности распределения данных, который не выявил препятствий для применения дисперсионного анализа. Степень взаимосвязи двух переменных оценивали с помощью коэффициента корреляции Пирсона (r -Пирсона). В таблицах приведены статистически обработанные данные в виде средних арифметических значений и их стандартных ошибок.

Результаты и обсуждение. В работе представлены результаты сравнительного анализа содержания важнейших биологически активных соединений с антиоксидантной активностью (суммарное содержание водорастворимых антиоксидантов, аскорбиновая кислота, рутин, каротиноиды, антоцианы), а также их биодоступности в чайных смесях, представленных в розничной торговой сети. Следует отметить, что среди выбранных образцов чая присутствовали смеси на основе зеленого чая, на основе черного чая, а также травяные смеси различного состава. Показано, что чайные сборы существенно различались по содержанию биологически активных веществ, что связано с особенностями их состава. Как известно, содержание антиоксидантов в чайном листе определяется целым рядом факторов, в том числе агротехнических и технологических [10]. Максимальное содержание водорастворимых антиоксидантов было выявлено в образцах зеленого чая (табл. 1.), что хорошо согласуется с многочисленными данными о том, что наиболее выраженные антиоксидантные свойства характерны именно для зеленых чаев, которые в процессе обработки не ферментируются [11]. Фенольные соединения представляют самую распространенную группу вторичных метаболитов растений и выполняют широкий спектр физиологических функций, включая активное участие в окислительно – восстановительных реакциях. Важно, что водорастворимые фенольные соединения в значительной степени сохраняются после термической обработки [11], таким образом, чай, содержащий высокие концентрации фенольных соединений, сохраняют свои антиоксидантные свойства в процессе заваривания.

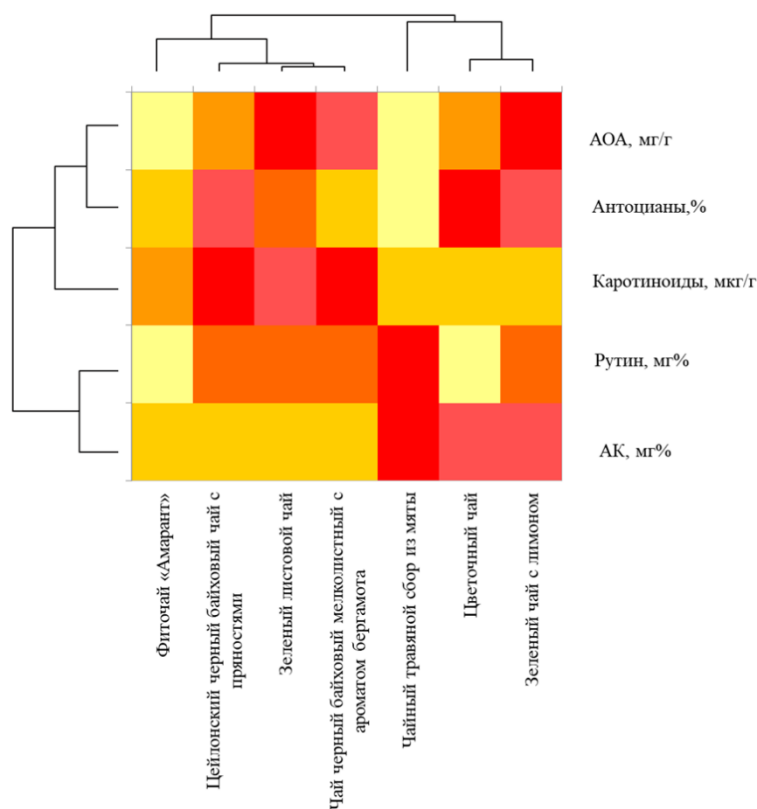
Все исследованные сорта зеленого и черного чая содержали сходное количество рутина – гликозида флавоноида кверцетина, обладающего Р-витаминной активностью, однако травяные сборы существенно различались по этому показателю. Минимальное содержание рутина наблюдалось в фиточае «Амарант» и в цветочном чае «Суданская роза». Чайный травяной сбор из мяты, напротив, характеризовался очень высоким содержанием рутина. Большие различия в содержании рутина в различных травяных сборах, вероятно, связаны с особенностями их состава [12]. В частности, имеются данные о том, что добавки к чайной смеси могут существенно изменить уровень содержания в ней рутина [12]. Так, добавление лимона почти в 2 раза увеличивает содержание витамина Р. Так как мята содержит значительное количество рутина (по некоторым данным, до 13.8 мг %), то не удивительно, что чайный сбор на ее основе лидирует по его содержанию.

Травяные чаи занимают лидирующие позиции по содержанию аскорбиновой кислоты, уровень которой в 2–2,5 раз превышает уровень, характерный для зеленых и черных чаев. Данные об содержании аскорбиновой кислоты, полученные нами для зеленых и черных чаев, соответствуют данным других авторов [13, 14]. Так как усвоение витамина Р и аскорбиновой кислоты лучше происходит в комплексе, следует особо отметить травяной чай на основе мяты, который среди изученных нами образцов содержал максимальное количество как рутина, так и аскорбиновой кислоты. Содержание каротиноидов в исследованных чайных смесях также существенно различалось. Интересно, что нами была обнаружена значительная разница по данному показателю между зелеными чаями. Зеленый чай с лимоном содержал в 3,6 раза меньше каротиноидов, чем зеленый чай «Marco Tea». Возможно, это связано с тем, что каротиноиды, которые представляют собой неустойчивые соединения, легко окисляются атмосферным воздухом, лучше сохраняются в цельнолистовых чаях.

Таблица 1. Содержание антиоксидантов в различных чайных и травяных сборах.

Вид чайного сбора	ССА, мг QE г ⁻¹	Рутин, мг %	АК, мг %	Каротиноиды, мкг г ⁻¹	Антоцианы, %
Цветочный чай	21,67±1,24	8,12±0,72	42,2±4,2	59,4±5,6	0,45±0,04
Зеленый чай с лимоном	39,01±2,54	23,41±1,92	40,1±3,5	68,41±7,1	0,41±0,04
Фиточай «Амарант»	8,25±0,87	7,16±0,92	20,1±1,8	110,5±10,2	0,23±0,02
Цейлонский черный байховый чай с пряностями	22,69±1,89	23,40±2,14	18,4±1,6	287,4±25,2	0,37±0,03
Зеленый листовой чай «Marco Tea»	36,13±3,12	24,65±2,14	19,7±1,9	246,3±23,1	0,31±0,03
Чай черный байховый мелколистный с ароматом бергамота	30,11±2,58	22,12±2,03	22,4±2,1	275,4±24,5	0,19±0,02
Чайный травяной сбор из мяты	10,67±1,05	40,2±4,12	48,9±4,2	82,7±8,2	0,15±0,01

Уровень содержания антоцианов в исследованных чайных смесях не зависел от типа чая. Максимальное количество антоцианов было обнаружено в чае, содержащем цветки суданской розы (гибискуса), которые содержат высокие количества антоцианов. Обнаруженные значительные различия по содержанию антоцианов между исследованными черными и зелеными чаями, возможно, связаны с особенностями технологической обработки чайного листа, в частности в процессе его высушивания. Имеются данные о том, что содержание антоцианов сильно уменьшается при высушивании образцов. Так, при высушивании ягод черники на воздухе вне прямого доступа



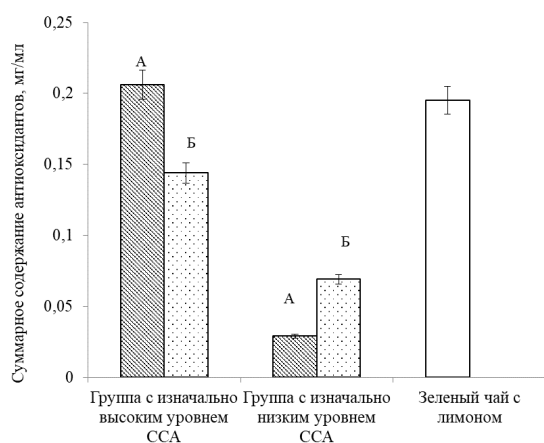
солнечного света, их потери составляют около 40 %, а в некоторых образцах сушеной черники, приобретенных в аптеке, они достигали 60 %. Корреляционной связи между содержанием каротиноидов и антоцианов в исследованных чайных смесях выявлено не было, хотя в литературе имеются данные о положительной корреляционной зависимости средней степени сопряженности между содержанием антоцианов и уровнем каротиноидов в листьях растений прибрежного дюнного комплекса [15]. В связи с этим можно предположить, что уровень корреляции между содержанием антоцианов и каротиноидов может определяться климатическими условиями произрастания растений. Проведен кластерный анализ чайных сборов по содержанию в них отдельных антиоксидантов. Результаты анализа позволили разделить все исследованные образцы чая на две группы в зависимости от их фитохимической ценности (рис. 1.).

Рис. 1. Heat map (темное – высокое значение, светлое – низкое значение) с кластерами для классификации экстрактов разных видов чайных сборов по содержанию в них различных антиоксидантов

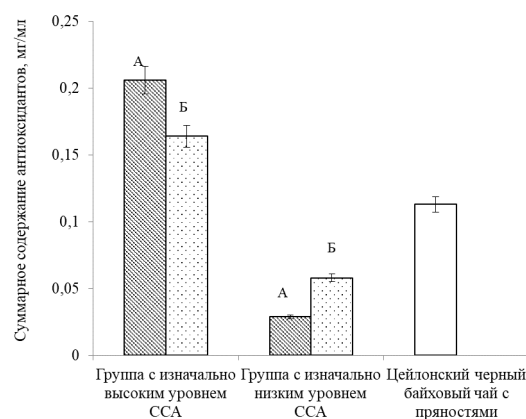
Исследование биодоступности

было проведено для образцов трех чайных сборов – зеленого чая с лимоном, цейлонского черного байхового чая с пряностями и фиточая «Амарант» (Россия).

В ходе проведения эксперимента испытуемые были условно разделены на две группы: лица с изначально высоким уровнем антиоксидантной активности слюны ($0,22 \pm 0,02$ мг/мл) и лица с низким уровнем антиоксидантной активности слюны ($0,035 \pm 0,005$). В качестве критерия биодоступности оценивали изменение уровня суммарного содержания антиоксидантов в слюне добровольцев через 60 минут после приема напитка. Было показано, что после употребления зеленого и черного чая уровень антиоксидантов в слюне добровольцев с исходной низкой антиоксидантной активностью достоверно увеличивался (более чем в два раза). После употребления фиточая «Амарант» подобного эффекта не наблюдали. Таким образом, можно сделать вывод о более высокой степени биодоступности антиоксидантов в составе зеленого и черного чая. Интересным является факт снижения уровня суммарного содержания антиоксидантов в слюне после употребления зеленого и черного чая у лиц с исходно высокими показателями антиоксидантной активности. Возможно, данная закономерность связана со сложными механизмами всасывания и усвоения антиоксидантных соединений в организме человека.



(1)



(2)



(3)

Рис. 2. Биодоступность антиоксидантов зеленого чая с лимоном (1), цейлонского черного байхового чая с пряностями (2), фиточая «амарант» (3). А – ССА до употребления напитка; Б – ССА после

Заключение. Исследованные образцы чайных и травяных сборов существенно различаются по содержанию фенольных антиоксидантов. Максимальное количество антиоксидантов характерно для образцов зеленого чая, минимальное – для фиточая «Амарант» и чайного травяного сбора из мяты. Все исследованные сорта зеленого и черного чая содержат сходное количество рутина, тогда как травяные сборы существенно различаются по этому показателю. Минимальное количество рутина характерно для фиточая «Амарант» и цветочного чая «Суданская роза», максимальное – для чайного травяного сбора из мяты. Максимальное количество аскорбиновой кислоты среди исследованных чайных смесей содержится в травяном сборе из мяты.

Максимальное количество каротиноидов содержат чайные смеси на основе черного чая, минимальное количество каротиноидов содержит цветочный чай «Суданская роза». Минимальное содержание антоцианов характерно для чайного травяного сбора из мяты, а максимальное для цветочного чая «Суданская роза». Зеленый чай с лимоном и цейлонский черный байховый чай с пряностями характеризуются сходным уровнем биодоступности антиоксидантов. После употребления обоих напитков у лиц с изначально низким содержанием антиоксидантов в слюне отмечается достоверное увеличение этого показателя. Антиоксиданты фиточая «Амарант» характеризуются низким уровнем биодоступности. Употребление этого напитка не приводит к изменению уровня антиоксидантов в слюне независимо от их исходного содержания. Проведен кластерный анализ чайных сборов по содержанию в них отдельных антиоксидантов.

Литература

1. Preiser J. – C. Oxidative Stress //JPEN Journal, 2012. Vol.36(2). P. 147–154.
2. Breitenbach M., Eckl P. Introduction to Oxidative Stress in Biomedical and Biological Research // Biomolecules, 2015. Vol. 5. P. 1169–1177.
3. Adwas A.A. et al. Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body // J. Appl. Biotechnol. Bioeng., 2019. Vol. 6(1). P. 43–47.
4. Nasri H., Baradaran A., Shirzad H., Rafieian-Kopaei M. New concepts in nutraceuticals as alternative for pharmaceuticals // Int. J. Prev. Med., 2014. Vol. 5. P. 1487–1499.
5. Maslennikov P., Golovina E., Artemenko A. Ecological and Geochemical Conditions for the Accumulation of Antioxidants in the Leaves of *Lathyrus maritimus* (L.) Bigel // Plants, 2020. Vol. 9(6). P. 746.
6. Jakubczyk K. et al. Antioxidant Properties and Nutritional Composition of Matcha Green Tea // Foods, 2020. Vol. 9(4). P. 483.
7. Feduraev P., Skrypnik L., Riabova A., Maslennikov P., Chupakhina G. Phenylalanine and Tyrosine as Exogenous Precursors of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Secondary Metabolism through PAL-Associated Pathways // Plants, 2020. Vol.9(4). P. 476.
8. Maslennikov P.V., Chupakhina G.N., Skrypnik L.N., Feduraev P.V., Melnik A.S. Assessment of the Antioxidant Potential of Plants in Urban Ecosystems under Conditions of Anthropogenic Pollution of Soils // Russ. J. Ecol., 2018. Vol.49(5). P.384–394.
9. Maslennikov P.V., Chupakhina G.N., Skrypnik L.N., Feduraev P.V., Melnik A.S. The contribution of polyphenols to plant resistance to Pb soil pollution // International Journal of Environmental Studies, 2018. Vol.75(5). P. 719–731.
10. Yang J., Liu R.H. The phenolic profiles and antioxidant activity in different types of tea // IFST Journal, 2012. Vol. 48(1). P.163–171.
11. Abdeltaif S., SirElkhatim K.A. Estimation of Phenolic and Flavonoid Compounds and Antioxidant Activity of Spent Coffee and Black Tea (Processing) Waste for Potential Recovery and Reuse in Sudan // Recycling, 2018. Vol. 3(2). P. 27.
12. Habtemariam S., Varghese G. Extractability of Rutin in Herbal Tea Preparations of *Moringa stenopetala* Leaves // Beverages, 2015. Vol.1(3). P. 169–182.
13. Korus A. Level of Vitamin C, Polyphenols, and Antioxidant and Enzymatic Activity in Three Varieties of Kale (*Brassica Oleracea* L. Var. *Acephala*) at Different Stages of Maturity // International Journal of Food Properties, 2011. Vol. 14(5). P. 106910–80.
14. Jaroszewska A., Biel W. Chemical composition and antioxidant activity of leaves of mycorrhized seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) // Chilean Journal of Agricultural Research, 2017. Vol. 77(2). P. 155–161.
15. Chupakhina G.N., Shansky M., Parol A., Chupakhina N.Y., Feduraev P.V., Skrypnik L.N., Maslennikov P.V. Comparative characteristics of antioxidant capacity of some forage plants of the Baltic Sea Region (a case study of the Kaliningrad Region and Estonia) //Agronomy Research, 2018. Vol. 16, 1976–1985.

ОЦЕНКА РИСКА ПЕРЕКРЕСТНОЙ КОНТАМИНАЦИИ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ВИРУСОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОДЕЛЬНЫХ АДЕНОВЕКТОРОВ, НЕСУЩИХ ГЕНЫ ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ

П.М. Петрова, О. Попова, Т.А. Ожаровская, Д.В. Воронина, Д.И. Зрелкин

НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

Производство биотехнологических препаратов с использованием клеток-продуцентов сопряжено с риском перекрестной контаминации клетками других культур или посторонними микроорганизмами. Такая проблема существует при изготовлении противовирусных вакцин, в частности на базе аденовирусных векторов различных серотипов. Например, в вакцинах от гриппа аденовирусные векторы представлены 5, 26, 35 или другими серотипами [1], вакцины против COVID-19 включают серотипы 5, 26 и полученный от шимпанзе серотип Y25 [2, 3]. Риск перекрестной контаминации повышается при получении на одном предприятии двух и более векторов. Так, крупным прецедентом стал брак нескольких серий вакцины против COVID-19 JNJ-78436735 на основе аденовируса 26 серотипа из-за смешения субстанции с компонентами вакцины AZD1222 на базе Y25, производство которой расположено на том же заводе [4]. Существует целый ряд методов, направленных на предотвращение, обнаружение и устранение биологического загрязнения.

Целью работы было определение контаминирующей дозы вируса при совместном культивировании аденовекторов 26 и 5 серотипов методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Мы проводили исследование с использованием двух модельных аденовирусов – 5 (Ad5) и 26 (Ad26) серотипов, несущих гены красного (mCherry) и зеленого (EGFP) флуоресцентных белков соответственно. В культуру клеток НЕК 293 зараженных Ad26-EGFP в дозе 10^6 вирусных частиц вносили десятикратные разведения Ad5-mCherry в дозе от 10^4 до 10^7 вирусных частиц. Контаминацию оценивали визуально по экспрессии репортерных генов с помощью флуоресцентной микроскопии и детекцией вирусных геномов методом ПЦР-РВ. При первом культивировании визуально контаминацию не наблюдали только при заражающей дозе Ad5-mCherry 10^4 частиц. Соотношение количества геномов целевого вируса Ad26-EGFP и вируса Ad5-mCherry, вызывающего контаминацию, на 5 день культивирования составило $3,22 \times 10^{11}$ и $2,64 \times 10^7$ соответственно. При следующем культивировании Ad26-EGFP экспрессия mCherry была обнаружена для всех доз, а соотношение количества геномов Ad26-EGFP и Ad5-mCherry составило $4,50 \times 10^{11}$ к $2,23 \times 10^{12}$, $2,89 \times 10^{10}$, $7,68 \times 10^8$ и $9,22 \times 10^7$ соответственно.

Таким образом, регулярный мониторинг перекрестной контаминации при производстве вирусных векторов различных серотипов на одних производственных площадках является важным этапом в определении качества производимых препаратов, а использование современных молекулярно-биологических методов, таких как ПЦР в режиме реального времени, значительно ускоряет и упрощает контроль.

Литература

- Coughlan L. et al. Adenoviral vectors as novel vaccines for influenza. *Pharm Pharmacol.* – 2015. 67(3): 382–399.
- Logunov DY et al. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet.* – 2021. 397(10275): 671–681.
- Voysey M et al. Oxford COVID Vaccine Trial Group. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. *Lancet.* – 2021. 397(10269): 99–111.
- FDA: Decision memorandum to Janssen COVID-19 Vaccine № 27205 [утверждён 11 июня 2021 года]. – Food&drug administration – Текст: электронный.

УДК 579.246.4

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ НЕФТЕПРОДУКТОВ КАК СТРЕССОВОГО ФАКТОРА НА РАЗВИТИЕ КОЛОНИЙ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК**Т.А. Василенко, Е.О. Бездетко***Белгородский государственный технологический университет имени В.Г. Шухова, Белгород, Россия*

Существует множество факторов, влияющих на рост и развитие микроорганизмов. В работе изучено воздействие нефтепродуктов на колонии клеток дрожжей двух видов *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*. При этом мы оценивали различные уровни стресса и определили жизнеспособность клеток дрожжей методом окраски раствором Люголя, метиленовым синим и сафранином.

Различные группы микроорганизмов способны использовать нефтепродукты в качестве источника углерода или наоборот испытывать угнетение от их действия. Активность каталазы является маркером направленности и интенсивности биологических процессов в почвах в условиях нефтезагрязнения [1]. Выявлено, что интродукция полифункционального биопрепарата в почву, содержащая *Acinetobacter calcoaceticus*, *Ochrobactrum intermedium*, *Pseudomonas koreensis*, *Paenibacillus ehimensis*, снижала содержание нефти в 3,1–3,6 раза и повышала на 2–3 порядка численность основных физиологических групп почвенных микроорганизмов, участвующих в ее трансформации, а также ускоряла всхожесть семян [2]. Выявлено, что активный ил, отбираемый с очистных сооружений нефтеперерабатывающих производств, гораздо дешевле и не уступает по эффективности действию биопрепаратов на основе искусственных биоценозов [3].

Клетки дрожжей испытывают стресс от различных факторов. Высокие концентрации глюкозы и этанола, давление, кислотность, окислители – все эти факторы способствуют различным видам стресса дрожжевых клеток. Осмотический стресс происходит в сусле при пивоварении [4, 5].

Спирт образуется в процессе брожения и его влияние на дрожжи определяется как этанольный стресс. Нарушение свертывания белка в эндоплазматическом ретикулуле вызывает развернутый белковый ответ, который запускается в почковании дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [6].

Обработка углекислым газом под высоким давлением – это метод нетермической пастеризации. В одном из исследований штаммы дрожжей подвергали обработке диоксидом углерода под высоким давлением и температуре и в дальнейшем были проанализированы повреждения органелл *Saccharomyces cerevisiae*, которые визуализировались с помощью специфичных для органелл *GFP fusion* белков. Восстановление дрожжевой клетки или её жизнеспособность сопровождалась разрушением эндоплазматического ретикулула, ядерной мембраны, тела Гольджи и ядрышка. Однако видимых повреждений клеточной мембраны не наблюдалось. Микроскопией было подтверждено, что обработка углекислым газом под высоким давлением повреждает мембраны основных органелл, но не клеточную мембрану и определяется как стресс дрожжевых клеток [7].

Когда дрожжевые клетки подвергаются воздействию концентраций окислителей, они адаптируются к последующей летальной обработке. Эта адаптация включает в себя толерантность к окислительному повреждению, а не защиту клеточных компонентов. М-тирозин используется в качестве чувствительной меры окислительного повреждения белка, и такое повреждение накапливается в дрожжевых клетках. Глутатион (трипептид) представляет собой одну из основных клеточных защит от атаки свободных радикалов и играет важную роль в адаптации к окислительному стрессу. Доказано что при атаке свободных радикалов, нарушающей метаболизм глутатиона, в нормальных аэробных условиях роста, дрожжи накапливают значительные уровни м-тирозина [8].

Способность реагировать и приспосабливаться к изменениям физической среды является еще одним универсальным и существенным свойством клеток. Клетки реагируют на механический сжимающий стресс, быстро индуцируя образование аутофагосом. Было доказано, что аутофагия очень чувствительна к изменениям механического давления и протекающие реакции градуированы. Так же механическая индукция аутофагии не зависит от времени и носит временный характер, длящийся до тех пор, пока клетки не адаптируются к новой среде и не восстановят свою форму. Таким образом, аутофагический ответ является частью комплексного ответа на механический вызов, позволяя клеткам справляться с постоянно меняющейся физической средой [9].

Жизнеспособность дрожжевых клеток, выращенных в различных условиях, можно определять с помощью красителей с эозином-У и Янусом Грином В, а также по количеству колоний клеток, посаженных на инфузионный агар с добавлением фактора роста гистоплазмы и бычьего сывороточного альбумина. Метод подсчета колоний на агаре является надежной процедурой определения жизнеспособности дрожжевых клеток *Histoplasma capsulatum*, а тесты с красителями не обязательно дифференцируют живые клетки от мертвых [10].

Для определения общего количества клеток и жизнеспособности *Saccharomyces carlsbergensis* разработали автоматизированный метод цитометрии с использованием недавно синтезированного ДНК-флуоресцентного красителя *PO-TEDM-1* и нового прибора *Easycounter YC*. Данный метод может быть использован в анализах, включающих простой подсчет клеток и обеспечение качества биообработки образцов [11].

Актуальным направлением является использование отходов производства [12]. Отходы производства могут быть использованы в биотехнологических процессах для роста и развития микроорганизмов. Перед высевом микроорганизмов были приготовлены 5,0 %-ные водные вытяжки:

- 1) *Saccharomyces cerevisiae* – из порошкообразных спиртовых дрожжей.
- 2) *Schizosaccharomyces pombe* – из отхода производства кормовых добавок.

Высев водных вытяжек в количестве 1 мл с разбавлением в 3 раза проводили на двух питательных средах на среде Сабура (рН = 6,62) и экспериментальной среде на основе отхода производства (рН = 3,96). После посева в чашки Петри на поверхность застывших сред дополнительно вносили 1 см³ нефтепродуктов (индустриальное масло И-20) и равномерно распределяли микробиологической петлей. Чашки выдерживали при температуре 30–31 °С в термостате. Повторность всего эксперимента трехкратная. Количество колоний через 24 ч после посева на 1 см² площади в чашке Петри приведено в табл. 1. Установлено, что для *Schizosaccharomyces pombe* более благоприятная экспериментальная среда, а для *Saccharomyces cerevisiae* – среда Сабура. Для жизнедеятельности грибов оптимальными условиями являются следующие: температура 30–32 °С, рН 4,2–4,5.

Таблица 1. Количество колоний дрожжей в чашке Петри на 1 см² (разведение вытяжек в 3 раза)

Вид дрожжей	Экспериментальная среда		Среда Сабура	
	Контроль	Добавление 1 дм ³ нефтепродуктов	Контроль	Добавление 1 дм ³ нефтепродуктов
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27,9	18,5	47,67	36,8
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	26,6	17,4	21,5	11,4

Фотографии колоний приведены на рис. 1–4. Визуально наблюдается угнетение колоний после введения нефтепродуктов. Морфометрический анализ клеток дрожжей проводили при микроскопировании прижизненных препаратов через сутки после посева. Также для определения количества гликогена клетки окрашивали раствором Люголя (табл. 2). Раствор Люголя окрашивает клетки в желтый цвет, а гликоген – в коричневый. В зрелых клетках гликоген занимает от 1/3 до 2/3 клетки и более. В клетках с низкой физиологической активностью окрашенный гликоген занимает менее 1/4 клетки. В молодых клетках гликоген отсутствует, а клетки при окрашивании раствором йода приобретают бледно-желтый цвет [4, 13]. Фотографии окрашенных препаратов клеток дрожжей раствором Люголя (контроль) приведены на рис. 5–6.

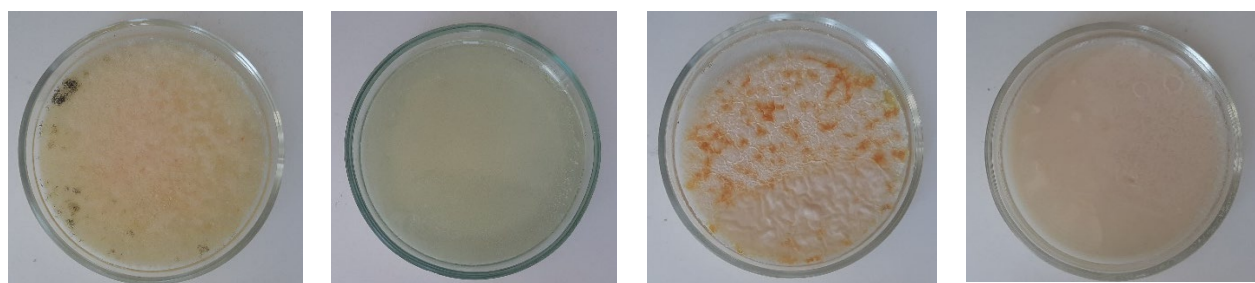
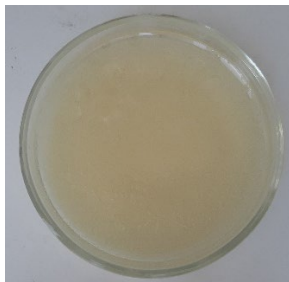


Рис. 1. Фотографии колоний (контроль) *Saccharomyces cerevisiae* на экспериментальной среде (1) и среде Сабура (2)

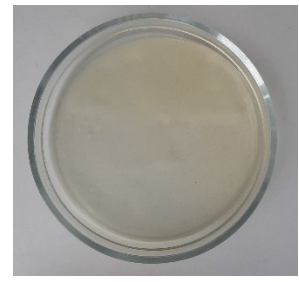
Рис. 2. Фотографии колоний (контроль) *Schizosaccharomyces pombe* на экспериментальной среде (1) и среде Сабура (2)



1

2

Рис. 3. Фотографии колоний (с добавлением нефтепродуктов) *Saccharomyces cerevisiae* на экспериментальной среде (1) и среде Сабуро (2)



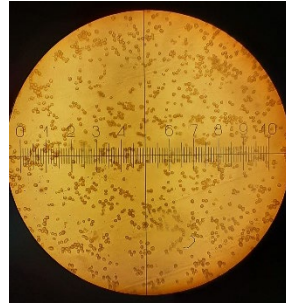
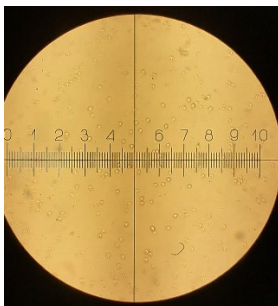
1

2

Рис. 4. Фотографии колоний (с добавлением нефтепродуктов) *Schizosaccharomyces pombe* на экспериментальной среде (1) и среде Сабуро (2)

Таблица 2. Диаметр клеток дрожжей (увеличение $\times 280$)

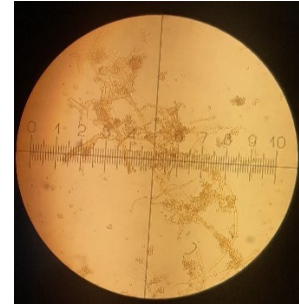
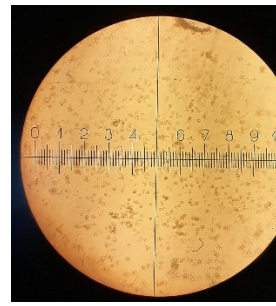
Вид дрожжей	Экспериментальная среда		Среда Сабуро	
	Контроль	Добавление 1 дм ³ нефтепродуктов	Контроль	Добавление 1 дм ³ нефтепродуктов
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<1,7–3,32 мкм; < 1 % зрелых клеток	<1,0–2,0 мкм; < 0,5 % зрелых клеток	<1,7–2,5 мкм; зрелые клетки отсутствуют	<1,0–2,0 мкм; зрелые клетки отсутствуют
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<1,7–2,5 мкм; 10 % зрелых клеток	<1,0–2,0 мкм; < 2,0 % зрелых клеток	0,83–1,7; 5 % зрелых клеток	<0,75–1,5 мкм 1 % зрелых клеток



1

2

Рис. 5. Фотографии колоний (контроль) *Saccharomyces cerevisiae* на экспериментальной среде (1) и среде Сабуро (2)

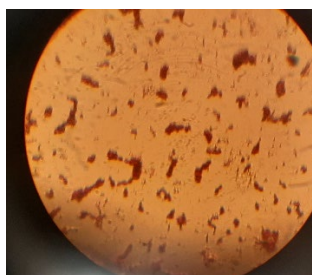


1

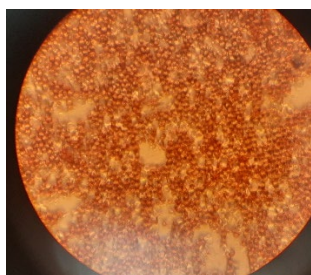
2

Рис. 6. Фотографии колоний (контроль) *Schizosaccharomyces pombe* на экспериментальной среде (1) и среде Сабуро (2)

Для выявления клеточных ядер в клетках дрожжей, в данной работе окраску проводили метиленовым синим и сафранином [4, 13]. Клетки окрашиваются в красный цвет, если они живые и содержат оксидоредуктазы; в противном случае – окраска фиолетовая (рис. 7–9).

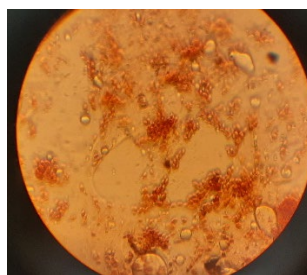


1

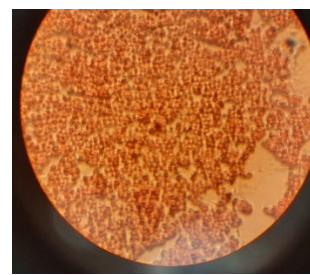


2

Рис. 7. Фотографии колоний (контроль) *Saccharomyces cerevisiae* на экспериментальной среде (1) и среде Сабуро (2)



1



2

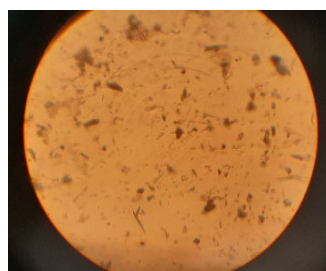
Рис. 8. Фотографии колоний (с добавлением нефтепродуктов) *Saccharomyces cerevisiae* на экспериментальной среде (1) и среде Сабуро (2)

После окрашивания было установлено, что фиолетовая окраска характерна только в случае инкубации *Schizosaccharomyces pombe* на среде Сабуро в присутствии нефтепродуктов. Во всех остальных случаях – окраска красная.

В рамках эксперимента к колониям дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, которые развивались на среде Сабуро, сутки вносили индустриального масла И-20 в количестве 1 дм³ сразу при высеве и на 3-и сутки. На рис. 10 приведены фотографии чашек Петри на 8 день эксперимента.



1



2

Рис. 9. Фотографии колоний клеток *Schizosaccharomyces pombe* на среде Сабуро: контроль (1); с добавлением нефтепродуктов (2)



Рис. 10. Фотографии колоний (контроль) *Saccharomyces cerevisiae* на экспериментальной среде: сверху – без добавления нефтепродуктов; внизу – внесением 1 дм³ нефтепродуктов: слева – внесение на 3 сутки после посева; справа – внесение при высеве

Визуально отмечена окраска колоний без внесения нефтепродукта – фиолетовая с белыми краями. Форма колоний – круглая с ризоидным краем. При наличии нефтепродукта колонии приобретают красную окраску независимо от того, в какой период роста дрожжей была осуществлена их добавка (индустриальное масло И-20 в количестве 1 см³) и исчезает белый край (он приобретает желтую окраску). Проведен подсчет диаметра пигментированных колоний дрожжей и их количества на 7 день эксперимента: без добавления нефтепродуктов: 37 пигментированных колоний со средним $d = 0,97$ мм; с добавлением нефтепродуктов при посеве: 59 пигментированных колоний со средним $d = 0,77$ мм; с добавлением нефтепродуктов на 3 сутки после посева: 56 пигментированных колоний со средним $d = 0,82$ мм. В результате исследований было установлено, что наличие нефтепродуктов (индустриальное масло И-20) на поверхности двух агаризованных сред угнетает после посева клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*, что проявляется в уменьшении их размера и количества.

Полученные данные свидетельствуют, что при инкубации на следующие сутки после посева диаметр клеток при наличии нефтепродуктов уменьшился в следующее количество раз: экспериментальная среда: *Saccharomyces cerevisiae* – в 1,67 раза; *Schizosaccharomyces pombe* – в 1,4 раза; среда Сабуро: *Saccharomyces cerevisiae* – в 1,4 раза; *Schizosaccharomyces pombe* – в 1,12 раза.

Аналогично получены данные по количеству колоний дрожжей: экспериментальная среда: *Saccharomyces cerevisiae* – уменьшение в 1,51 раза; *Schizosaccharomyces pombe* – в 1,53 раза; среда Сабуро: *Saccharomyces cerevisiae* – уменьшение в 1,3 раза; *Schizosaccharomyces pombe* – в 1,89 раза.

При наличии нефтепродукта (в количестве 1 см³) колонии *Saccharomyces cerevisiae* меняют окраску с фиолетовой на красную, исчезает белый край, который присутствует в контрольном образце колоний. Форма колоний без присутствия нефтепродукта – круглая с ризоидным краем; при его наличии – круглая с фестончатым краем. После окрашивания клеток дрожжей метиленовым синим и сафранином было установлено, что фиолетовая окраска характерна только в случае инкубации *Schizosaccharomyces pombe* на среде Сабуров в присутствии нефтепродуктов. Во всех остальных случаях – окраска красная.

Литература

1. Ковалева Е.И., Пукальчик М.А., Яковлев А.С. О возможностях применения активности каталазы при экологическом нормировании и оценке нефтезагрязненных почв. Экология и промышленность России. 2016. Т.20. № 11. С. 26–31.
2. Коршунова Т.Ю., Бакаева М.Д., Логинов О.Н. Полифункциональные биопрепараты-нефтедеструкторы: влияние на растения и содержание нефти в почве. Экология и промышленность России. 2018. Т.22. № 9. С. 18–22.
3. Ксенофонтов Б.С., Козодаев А.С., Таранов Р.А., Виноградов М.С., Сенник Е.В., Ворopaева А.А. Микробиологические технологии очистки почвы с использованием естественных биоценозов. Экология и промышленность России. 2015. Т.19. № 9. С. 4–7.
4. Меледина Т.В., Давыденко С.Г., Васильева Л.М. Физико-логистическое состояние дрожжей: – СПб.: НИУ ИТМО; ИХиБТ, 2013. – 48 с.
5. Халилова Э.А., Исламмагомедова Э.А., Котенка С.Ц., Гасанов Р.З., Макарова А.А., Аливердиева Д.А. О морфологических свойствах штамма *S. cerevisiae* Y-503 в условиях осмотического, температурного и кислотного стресса // Известия Самарского научного центра РАН. 2019. № 2–2. С. 133–141.
6. Miyagawa K. – I., Ishiwata-Kimata Y., Kohno K. and Kimata Y. (2014) Ethanol stress impairs protein folding in the endoplasmic reticulum and activates Ire1 in *Saccharomyces cerevisiae*, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 78:8, 1389–1391, DOI: 10.1080/09168451.2014.921561
7. Takahashi U., Hamada K. and Iwahashi H. (2019) Critical damage to the cellular organelles of *Saccharomyces cerevisiae* under sublethal conditions upon high pressure carbon dioxide treatment, *High Pressure Research*, 39:2, 273–279, DOI: 10.1080/08957959.2019.1610747
8. Poljak A., Dawes I.W., Ingelse B.A., Duncan M.W., Smythe G.A. and Grant C.M. (2003) Oxidative damage to proteins in yeast cells exposed to adaptive levels of H₂O₂, *Redox Report*, 8:6, 371–377, DOI: 10.1179/135100003225003401
9. Jason S. King, Douwe M. Veltman and Robert H. Insall (2011) The induction of autophagy by mechanical stress, *Autophagy*, 7:12, 1490–1499, DOI: 10.4161/auto.7.12.17924
10. Kyung J. Kwon-Chung and Ram P. Tewari (1987) Determination of viability of *Histoplasma capsulatum* yeast cells grown in vitro: comparison between dye and colony count methods, *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 25:2, 107–114, DOI: 10.1080/02681218780000151
11. Atanasova M., Yordanova G., Nenkova R., Ivanov Y., Godjevargova T. and Dinev D. (2019) Brewing yeast viability measured using a novel fluorescent dye and image cytometer, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 33:1, 548–558, DOI: 10.1080/13102818.2019.1593053
12. Сапронова Ж.А., Свергузова С.В., Святченко А.В. Технология получения железосодержащего коагулянта из отходов сталеплавильного производства для очистки ливневых вод // Вестник БГТУ им. В.Г. Шухова. 2016. № 12. С. 160–164.
13. Давыденко С.Г., Васильева Л.М., Баташов Б.Э., Дедегкаев А.Т. Применение методов окраски дрожжей для оценки их физиологического состояния // Пиво и напитки. 2011. № 5. С. 8–10.

**НОРМАТИВНО-ПРАВОВОЕ РЕГУЛИРОВАНИЕ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ
В ПРОМЫШЛЕННОСТИ ГЕННО-МОДИФИЦИРОВАННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ
ШТАММ *ESCHERICHIA COLI* K-12 – ПРОДУЦЕНТ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ**

Т.А. Воейкова^{1,2}, В.С. Кулигин^{1,2}, А.Д. Новиков^{1,3}, О.А. Журавлева^{1,2}, А.Ю. Скороходова⁴

¹НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

²НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика, Москва, Россия

³НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика, Курчатовский геномный центр, Москва, Россия

⁴ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Приоритетной задачей микробиологической промышленности Российской Федерации (РФ) является производство биологически активных веществ (БАВ), необходимых для пищевой и химической промышленности, сельского хозяйства. Повысить синтез целевого продукта за счет направленного изменения активности генов позволяет современная методология генной инженерии. Во всех странах генетически-модифицированные микроорганизмы (ГММ) являются предметом государственного регулирования. Для обеспечения биобезопасности в промышленной биотехнологии законодательные структуры различных стран разрабатывают нормативно-правовые документы для координации и выработки общих принципов этой деятельности.

Проведен сравнительный анализ принципов правового регулирования при внедрении ГММ продуцентов БАВ в производство в РФ, США и Евросоюзе (ЕС). Определены критерии безопасности для исходных штаммов, выбранных для генетических манипуляций – это документированная практика длительного безопасного использования, заключения квалифицированных экспертов, проведение научных исследований. Рассматриваются принципы присвоения штаммам квалифицированного статуса безопасности – GRAS в США и QPS в ЕС, что позволяет использовать эти штаммы и созданные на их основе продуценты в биотехнологии без дополнительных проверок безопасности. Отмечается, что в РФ списка безопасных штаммов не существует, что усложняет создание и промышленное использование ГММ продуцентов. Определены требования, предъявляемые к вносимому генетическому материалу: минимальные размеры, отсутствие генов, кодирующих токсины, устойчивость к антибиотикам, синтез аллергенов, рамок считывания с неизвестными функциями; не увеличивать выживаемость микроорганизма в окружающей среде. Обсуждается возможность совершенствования законодательной базы по использованию ГММ в РФ. В соответствии с правилами Российского и международного законодательства, в НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика с применением современной методологии хромосомальной рекомбинационной инженерии был сконструирован трансгенный штамм *Escherichia coli* K-12 продуцент янтарной кислоты (ЯК), содержащий в составе хромосомы гетерологичный ген пируваткарбоксилазы – *pusA* из штамма *Bacillus subtilis*. Исходный штамм *E. coli* K-12 синтезировал ~ 5 % ЯК от общего количества метаболитов в цикле трикарбоновых кислот. Было проведено более 20 актов геномного редактирования. В результате был получен продуцент, который синтезировал 80 % ЯК, не содержал плазмид, генов устойчивости к антибиотикам и отвечал требованиям, предъявляемым к микроорганизмам, полученным с использованием генной инженерии [1]. Анализ поведения ГММ под влиянием ряда факторов внешней среды показал, что новый штамм не составляет конкуренции облигатной микрофлоре.

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18–29–14005–мк.

Литература

1. А.Ю. Скороходова, О.А. Журавлева, Т.А. Воейкова и др. Создание бесплазмидного и безмаркерного штамма *Escherichia coli* – продуцента янтарной кислоты и оценка его биосинтетического потенциала при утилизации сахаров лигноцеллюлозы. Биотехнология. 2020 Т. 36 № 2 С. 3–11.

**Секция 8. Биотехнология и
образование. Заседание
Федерального УМО в системе
высшего образования по
укрупненной группе
специальностей и
направлений подготовки
19.00.00 Промышленная
экология и биотехнология**

ОСОБЕННОСТИ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ МАГИСТРАНТОВ

Г.Н. Демиденко, М.Г. Сульман

Тверской государственный технический университет, Тверь, Россия

Согласно Федеральным государственным образовательным стандартам программа подготовки магистрантов состоит из нескольких частей, включающих учебные дисциплины (обязательные, вариативные и элективные), практики и государственную итоговую аттестацию [1]. Выпускник, освоивший программу магистратуры по направлениям подготовки 19.00.00 Промышленная экология и биотехнология, должен быть готов решать следующие научно-исследовательские задачи:

- постановка и формулирование задач научных исследований на основе результатов поиска, обработки и анализа научно-технической информации;
- разработка новых технических и технологических решений на основе результатов научных исследований;
- создание теоретических моделей процессов, позволяющих прогнозировать параметры, характеристики аппаратуры и свойства получаемых веществ, материалов и изделий;
- разработка программ и выполнение научных исследований, обработка и анализ их результатов, формулирование выводов и рекомендаций;
- координация работ по сопровождению реализации результатов работы в производстве;
- подготовка научно-технических отчетов, аналитических обзоров и справок;
- защита интеллектуальной собственности, публикация научных результатов.

В процессе обучения научно-исследовательские задачи раскрываются в различных формах:

- закрепленных вузом в учебном плане в вариативной части Блока 1 ряда специальных дисциплин, например, «Защита интеллектуальной собственности и патентование», «Технология подготовки научной документации», «Основы научно-исследовательской работы»;
- учебных и производственных практиках (тип – научно-исследовательская работа);
- выпускной квалификационной работы (ВКР) – магистерской диссертации.

Программа научно-исследовательской работы (НИР) магистрантов определяется в начале первого года обучения, исследования выполняются под контролем научного руководителя согласно утвержденному плану, а написание отчетных работ распределяется по семестрам с учетом учебной нагрузки. Выполнение НИР осуществляется в следующих формах:

- планирование и проведение экспериментов по теме исследования;
- написание отчетов, тезисов, статей, заявок на полезную модель или патент;
- подготовке докладов, презентаций и выступление на конференциях молодых ученых, круглых столах и т. п.;
- участия в научной жизни кафедры, исследовательских проектах и научно-образовательных программах.

Написание статей и участие в конференциях позволяет не только расширить научный кругозор магистранта, развить аналитическое мышление и усовершенствовать навыки самостоятельной исследовательской работы, но и подготовиться к написанию магистерской диссертации, подготовка к защите которой начинается уже на первом курсе магистратуры, а все опубликованные материалы являются основой содержания ВКР.

Литература

1. Проект «Федеральный государственный образовательный стандарт высшего образования – магистратура по направлению подготовки 19.04.01 Биотехнология». Портал Федеральных государственных образовательных стандартов высшего образования [сайт]: URL: www.fgosvo.ru (дата обращения 23.07.2021).

УДК 663.1

**ОСОБЕННОСТИ ПОДГОТОВКИ КАДРОВ ПО ПИЩЕВЫМ НАПРАВЛЕНИЯМ
В СООТВЕТСТВИИ С ФГОС ВО 3++ И ПРОЕКТОМ ФГОС ВО 4****О.Я. Мезенова, С.В. Агафонова***Калининградский государственный технический университет, Калининград, Россия*

Совершенствование образовательной системы с учетом современных реалий является обязательным условием формирования кадрового потенциала, отвечающего требованиям работодателей. Стратегия высшего образования в России существенно изменилась с введением закона «Об образовании в Российской Федерации» от 29.12.2012 № 273-ФЗ, результатом чего явился переход к образовательным стандартам третьего поколения.

Государственные образовательные стандарты первого поколения (ГОС) были разработаны в период с 1994 по 1996 гг. на основе Закона «Об образовании» 1992 г. Отсутствие единого подхода при разработке данных стандартов затрудняло реализацию образовательных программ в вузах, в особенности ведущих подготовку по широкому перечню направлений. Поэтому в 2000 г. на смену этим стандартам пришли государственные образовательные стандарты второго поколения, в основу которых были положены принципы ФЗ «О высшем и послевузовском профессиональном образовании» 1996 г. Новые образовательные стандарты, сформированные при едином подходе и согласованные с требованиями работодателей, расширили возможности вузов в формировании образовательных программ.

Тем не менее, коренного изменения существующей образовательной системы с введением ГОС второго поколения не произошло. Основными проблемами являлись отсутствие в стандартах конкретных требований к освоению образовательной программы, а также по-прежнему слабая взаимосвязь с потребностями рынка труда. Для решения этих проблем началась работа по внедрению федеральных образовательных стандартов высшего образования (ФГОС ВО) третьего поколения. Новые стандарты помимо решения проблем образования в России должны были также способствовать гармонизации системы образования со странами Европы в рамках Болонского процесса.

В соответствии с положениями ФЗ «Об образовании в Российской Федерации» от 29.12.2012 г., ФГОС должны обеспечивать: единство образовательного пространства в России; преемственность основных образовательных программ; вариативность содержания образовательных программ соответствующего уровня образования; государственные гарантии уровня и качества образования на основе единства образовательных требований к условиям реализации основных образовательных программ и результатам их освоения. Для усиления практикоориентированности образования формирование требований к результатам освоения основных образовательных программ в части профессиональной компетенции осуществляется на основе соответствующих профессиональных стандартов.

Основными особенностями ФГОС ВО 3+ явились:

- компетентностно-ориентированный подход – формирование у выпускников трех видов компетенций: общекультурных, общепрофессиональных и профессиональных в соответствии с видами деятельности;
- отсутствие перечня дисциплин;
- усиление значимости электронной информационно-образовательной среды и дистанционных образовательных технологий.

ФГОС 3+ были направлены на достижение интеграции рынка труда и образования, однако, этого достичь не удалось. Прежде всего, из-за рассогласования между компетенциями выпускников, прописанных в образовательных стандартах, и обобщенными трудовыми функциями (требованиями работодателей), данными в профессиональных стандартах. Таким образом возникла необходимость в переходе на новую редакцию образовательных стандартов – ФГОС 3++.

Основные изменения в актуализированных ФГОС ВО 3++ направлены на повышение практикоориентированности в подготовке кадров высшего образования. Этими изменениями явились:

- формулирование результатов освоения образовательной программы через универсальные компетенции, являющиеся едиными для всех ФГОС ВО;
- обязательная часть регламентируется через общепрофессиональные компетенции. В данную группу компетенций заложены базовые основы профессиональной деятельности с учетом потенциального развития области образования и единые для нее. Предусмотрено дифференцирование компетенций по категориям;

– профессиональные компетенции делятся на обязательные и рекомендуемые и формулируются на основании профессиональных стандартов, либо имеющегося передового опыта в данной области. Профессиональные компетенции отсутствуют во всех ФГОС и должны быть прописаны в примерной основной образовательной программе (ПООП);

– минимальный объем обязательной части образовательной программы установлен в процентах от ее общего объема;

– исключение базовой и вариативной частей образовательной программы, при этом включение блоков «дисциплины» и «практика».

Поскольку ФГОС третьего поколения в необходимой степени должны быть учтены положения утвержденных профессиональных стандартов, отвечающие современным требованиям рынка труда, неотъемлемой процедурой актуализации является согласование их проектов с органами, представляющими интересы работодателей. Экспертиза проектов ФГОС осуществляется Советом по профессиональным квалификациям (СПК), за которым закреплены сопряженные с ФГОС профессиональные стандарты, по результатам экспертизы подготавливается экспертное заключение. В случае отсутствия сопряженных профессиональных стандартов, экспертиза ФГОС проводится ведущими работодателями области, либо их объединениями.

Укрупненная группа специальностей и направлений (УГСН) подготовки 19.00.00 «Промышленная экология и биотехнологии» ориентирована на подготовку кадров для пищевых и биотехнологических производств и охватывает отрасли производства продуктов питания из растительного, животного, водного сырья, а также переработки микробиологического сырья с получением пищевых, кормовых, фармацевтических, технических продуктов. В рамках УГСН 19.00.00 реализуется подготовка выпускников по следующим направлениям бакалавриата (19.03...) и магистратуры (19.04...): 19.03.01 и 19.04.01 Биотехнология; 19.03.02. и 19.04.02 Продукты питания из растительного сырья; 19.03.03 и 19.03.04 Продукты питания животного происхождения; 19.03.04 и 19.04.04 Технология продукции и организация общественного питания; 19.04.05 Высотехнологичные производства пищевых продуктов функционального и специализированного назначения. Подготовка выпускников по данным направлениям осуществляется более чем в 60 вузах России, координирует взаимодействие вузов Федеральное учебно-методическое объединение по УГСН 19.00.00 «Промышленная экология и биотехнологии».

Благодаря работе научно-методических советов, входящих в состав ФУМО, на сегодняшний день утверждены в Минобрнауки актуализированные ФГОС ВО 3++ по направлениям:

- Продукты питания из растительного сырья (бакалавриат и магистратура);
- Продукты питания животного происхождения (бакалавриат и магистратура);
- Технология продукции и организация общественного питания (бакалавриат и магистратура);
- Высотехнологичные производства пищевых продуктов функционального и специализированного назначения (магистратура).

Ввиду широкого перечня областей профессиональной деятельности выпускников-биотехнологов и необходимости подготовки экспертных заключений от ведущих работодателей в каждой области, ФГОС по направлениям 19.03.01 и 19.04.01 Биотехнология на данный момент находятся на рассмотрении в СПК.

Все разработанные ФГОС 3++ в соответствии с распоряжением Президента России были дополнены требованиями к выпускникам в области экономической культуры и финансовой грамотности, формирования нетерпимого отношения к коррупционному поведению, использованию базовых дефектологических знаний в социальной и профессиональной сферах. Данные дополнения были включены в образовательные стандарты в виде соответствующих универсальных компетенций категорий: инклюзивная компетентность; экономическая культура, в том числе финансовая грамотность; гражданская позиция.

В актуализированных ФГОС ВО по УГСН 19.0.0.00 нашла отражение концепция по формированию компетенций цифровой экономики, сформулированная нормативными документами «Стратегия развития информационного общества в РФ на 2017–2030 годы», Национальная программа «Цифровая экономика РФ» и Федеральный проект «Кадры для цифровой экономики». Освоение компетенций цифровой экономики устанавливается в блоке общепрофессиональных компетенций.

Сегодня очевидно, что ФГОС ВО 3++ не позволяют в полной мере решить основную задачу, поставленную Федеральным законом об образовании Минобрнауки, – достижение максимальной практикоориентированности образования. Подготовка кадров для обеспечения потребностей современной пищевой и биотехнологической промышленности требует более тесного взаимодействия образования и работодателей. Необходимо усилить организацию систем переподготовки и повышения квалификации по актуальным направлениям промышленности. Пути повышения практикоориентированности в подготовке являются, к примеру, организация базовых кафедр на предприятиях, внедрение сетевого образования, в котором участвуют работодатели, предоставляя свои площадки и конкретные материалы для образования, выступая в роли научно-педагогических кадров. Для подготовки специалистов, способных решать задачи на высоком профессиональном уровне, со стороны работодателей необходимо участие в организации и проведении практик, дипломного проектирования, государственной итоговой аттестации, научной работе, аудиторной работе, а также разработке примерных основных образовательных программ.

Совместный анализ рабочей группы Координационного совета и инженерных ФУМО выявил следующие недостатки ФГОС третьего поколения:

- Структура ФГОС 3++ создает препятствия для реализации «системы 2+», в соответствии с которой ФГОС должны обеспечивать студентам возможность выбора направления подготовки начиная с третьего года обучения.

- Поскольку формулировки обязательных профессиональных компетенций и индикаторов их достижения перенесены из ФГОС в ПООП за счет использования отсылочных норм, создается противоречие между названием «Примерная ООП» и статусом «Обязательная в части отдельных разделов».

- Излишняя детализация в ФГОС способа установления образовательными организациями профессиональных компетенций на основе профессиональных стандартов затрудняет разработку образовательных программ, ориентированных одновременно на значительное количество различных профессиональных стандартов.

- Наличие в тексте ФГОС перечня профессиональных стандартов требует постоянной актуализации ФГОС при изменении профессиональных стандартов, что невозможно реализовать.

- Отсутствие в ФГОС механизма изменения сроков обучения (по очной форме) и объема программы затрудняет реализацию индивидуализации образовательных траекторий.

- Не используется потенциал системы государственно-общественного управления образованием (координационные советы по областям образования и ФУМО).

В связи с перечисленными недостатками ФГОС 3++, координационным советом Минобрнауки РФ «Инженерное дело, технологии и технические науки» разработана концепция ФГОС нового поколения – ФГОС 4. В основу этих стандартов помимо базовых норм Федерального закона «Об образовании в РФ», будут положены новые требования – поручения Президента РФ из послания Федеральному Собранию 2020 г. По решению Ассоциации «Глобальные университеты» от 17.04.2020 г., разработка ФГОС 4 должна проводиться как часть системных изменений нормативного правового обеспечения, касающихся приема в вузы, порядка формирования образовательных программ вузов, системы контроля качества образования, системы ранжирования образовательных программ вузов.

Предлагаемыми инновациями в концепции ФГОС 4, отличающими их от ФГОС 3 ++, являются:

- Включение в ФГОС механизма изменения сроков обучения (по очной форме) и объема программы для расширения возможности «ведущих» и региональных опорных вузов реализовывать индивидуализацию образовательных траекторий;

- Вузы, имеющие право на утверждение собственных образовательных стандартов, могут не учитывать при их разработке требования к результатам освоения основных образовательных программ, содержащиеся в приложении к ФГОС.

- ПООП носят полностью рекомендательный характер.

- ФГОС состоит из основной части и приложения. В основной части прописаны требования к структуре основных образовательных программ, их объему и условиям реализации. Для реализации «системы 2+» требования к результатам освоения основных образовательных программ являются едиными для данной УГСН, перечень компетенций и индикаторов их достижения устанавливается для первых двух курсов обучения.

Основная часть ФГОС утверждается в соответствии с существующим порядком и действует не менее 5 лет. Разделы, раскрывающие особенности направлений подготовки, входящих в данную УГСН, выносятся в приложение к ФГОС. Каждый раздел в приложении соответствует отдельному направлению подготовки. Приложение утверждается по упрощенной процедуре и может изменяться ежегодно при изменении технологий или рынка труда.

– ФГОС разрабатываются на УГСН, которая формируется на основе установленных критериев, в том числе, критерия обеспечения возможности реализации «системы 2+».

– К механизмам контроля качества образования добавляется государственно-общественная аккредитация (система координационные советы – ФУМО).

Для обеспечения реализации «системы 2+» Минобрнауки разработало проект приказа «Об утверждении перечней специальностей и направлений подготовки высшего образования», в котором сформирована новая УГСН 27 «Биотехнологии и пищевые технологии». В данной группе направления подготовки 19.03.02 и 19.04.02 Продукты питания из растительного сырья, 19.03.03 и 19.04.03 Продукты питания животного происхождения, 19.04.05 Высокотехнологичные производства пищевых продуктов функционального и специализированного назначения укрупнены в направления 0206.0 (бакалавриат) и 0207.1 (магистратура) Технологии производства продуктов питания. В 27 УГСН включены также направления подготовки 0106.0 (бакалавриат) и 0107.1 (магистратура) Биотехнологии. Направления подготовки 19.04.04 и 19.04.04 Технология продукции и организация общественного питания не вошли в данную УГСН, а были включены в группу «Сфера услуг».

Сегодня перед ФУМО и вузами стоит задача совершенствования подготовки с учетом актуализированных ФГОС 3++ и разработке на их основе ОПОП. Особые требования предъявляются к формулировкам профессиональных компетенций и их индикаторов, при этом необходимо учитывать региональные и вузовские особенности, традиции, мировые и отечественные тенденции развития пищевой промышленности.

Литература

Мезенова, О.Я. Особенности стратегии образовательных программ подготовки кадров по пищевым и биотехнологическим направлениям в связи с актуализацией ФГОС ВО (3++) / О.Я. Мезенова // Известия вузов. Пищевая технология. – 2019. – № 5–6. – С. 120–123.

Рудской, А.И. Концепция ФГОС ВО четвертого поколения для инженерной области образования в контексте выполнения поручений Президента России / А.И. Рудской, А.И. Боровков, П.И. Романов // Высшее образование в России. – 2021. – Т. 30. – № 4.

Проект Приказа Министерства науки и высшего образования РФ "Об утверждении перечней специальностей и направлений подготовки высшего образования" (подготовлен Минобрнауки России 12.05.2021) [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/56776893/#ixzz714mjV9Fn>

УДК 601:004.421:378

НОВАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА НАПРАВЛЕНИЯ «БИОТЕХНОЛОГИЯ» ПО ПРОФИЛЮ «БИОИНФОРМАТИКА»**Р.Р. Биглов, А.С. Кузнецов***МИРЭА – Российский технологический университет (Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова),
Москва, Россия*

Комплексной программой развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 г. было определено, что «Основными задачами подготовки кадров в сфере биотехнологий будет выстраивание на базе обновленных образовательных стандартов и программ траектории получения необходимых компетенций, знаний и навыков...». Программой предусмотрена «Разработка новых и модификация существующих образовательных стандартов для различных категорий специалистов разных отраслей биоэкономики и создание новых образовательных программ в соответствии с кадровыми потребностями биотехнологического бизнеса» [1].

Перспективными направлениями в области биотехнологий являются разработка методов биоинформатики для обработки данных геномного, транскриптомного и протеомного анализа [2].

Изучение живых организмов является сложнейшей задачей, требующей умения использовать современные знания и методы, в том числе и технологии искусственного интеллекта. В работе биотехнологов уже во всю используются такие методы, как скрининг сложнейших молекул, компьютерный молекулярный дизайн, выборки огромного количества молекул (Big Data), молекулярное моделирование, компьютерный анализ (докинг), современные методы статистического анализа, а также нейронные сети.

Актуальность подготовки специалистов по такому профилю показала сегодняшняя ситуация с пандемией, вызванной вирусом SARS-CoV-2 (COVID-19). В современных условиях создание вакцины начинается с секвенирования биополимеров вируса (белков и нуклеиновых кислот) – определения их первичной структуры (последовательности аминокислот и нуклеотидов), что невозможно без использования современного математического аппарата и средств вычислительной техники.

Современные биотехнологии должны не только использовать средства компьютерной техники (цифровизация), но и участвовать в создании компьютерных программ, используемых в их деятельности. Один из злободневных примеров – расшифровка генома вирусов и бактерий, для дальнейшего создания вакцин. Понятно, что расшифровка генома – это сложная, в том числе и математическая задача, решаемая средствами современной вычислительной техники. Особую важность приобретает создание оригинальных алгоритмов, которые могут создавать биологи и биотехнологи. Недаром появилась новая отрасль – биоинформатика.

Программой фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) определено, что «Исследования в области системной биологии и биоинформатики направлены на решение актуальных задач биологии с использованием современных математических и вычислительных методов. Особую актуальность имеет разработка алгоритмов и программ для высокоэффективной функциональной аннотации геномов, транскриптомов, протеомов, метаболомов микроорганизмов, растений, животных и человека, создание теоретических основ и методических подходов к изучению сетевых динамических взаимодействий биомолекул» [3].

В действующем перечне специальностей высшего образования есть специальность 06.05.01 «Биоинженерия и биоинформатика» относящиеся к биологическим наукам. Кроме того, в рамках некоторых других направлений подготовки имеются профили и магистерские программы по биоинформатике. Примерами могут служить такие профили и магистерские программы, как профиль «Биоинформатика» бакалавриата 01.03.02 «Прикладная математика и информатика», магистерская программа «Прикладная математика и биоинформатика» магистратуры 01.04.02. Как отдельная дисциплина «Биоинформатика» присутствует в программах бакалавриата некоторых вузов в направлении 09.03.03 «Прикладная информатика». Также существует программа специалитета 30.05.03 «Медицинская кибернетика». по специализации «Цифровая медицина и биоинформатика».

ФГОС ВО по специальности 06.05.01 установлены следующие общепрофессиональные компетенции [4]:

ОПК-1. Способен проводить наблюдения, описания, идентификацию и научную классификацию организмов (прокариот, грибов, растений и животных);

ОПК-2. Способен использовать специализированные знания фундаментальных разделов математики, физики, химии и биологии для проведения исследований в области биоинженерии, биоинформатики и смежных дисциплин (модулей);

ОПК-3. Способен проводить экспериментальную работу с организмами и клетками, использовать физико-химические методы исследования макромолекул, математические методы обработки результатов биологических исследований;

ОПК-4. Способен применять методы биоинженерии и биоинформатики для получения новых знаний и для получения биологических объектов с целенаправленно измененными свойствами, проводить анализ результатов и методического опыта исследования, определять практическую значимость исследования;

ОПК-5. Способен находить и использовать информацию, накопленную в базах данных по биологическим объектам, включая нуклеиновые кислоты и белки, владеть основными биоинформатическими средствами анализа;

ОПК-6. Способен разрабатывать алгоритмы и компьютерные программы, пригодные для практического применения;

ОПК-7. Способен понимать принципы работы современных информационных технологий и использовать их для решения задач профессиональной деятельности.

Профессиональные компетенции определяются образовательной организацией самостоятельно на основе профессиональных стандартов, соответствующих профессиональной деятельности выпускников (при наличии) – однако таких профессиональных стандартов в настоящее время не существует.

Приведем примеры дисциплин, которые преподаются в вузах для получения этих или подобных компетенций.

Так, в МГУ им. М.В. Ломоносова [5] на факультете биоинженерии и биоинформатики ведется подготовка специалистов по направлению 06.05.01 «Биоинженерия и биоинформатика». В учебном плане этой специальности имеются следующие дисциплины – в базовой части: математика (математический анализ, линейная алгебра, дифференциальные уравнения, теория вероятностей, математическая статистика, комбинаторика) – всего 25 з.е., физика – 6 з.е., химия (общая и неорганическая химия, органическая химия) – 13 з.е., биология (зоология беспозвоночных, зоология позвоночных, ботаника низших растений, ботаника высших растений, клеточная биология) – 19 з.е., биоинженерия (генная инженерия, клеточная инженерия, инженерная энзимология – 15 з.е., биоинформатика – 16 з.е.; в вариативной части: основы молекулярной биологии – 6 з.е., аналитическая химия – 5 з.е., физическая химия – 6 з.е., физиология и человека животных – 5 з.е., генетика – 4 з.е., биохимия – 8 з.е., микробиология – 5 з.е., кинетика и механизмы ферментативных реакций – 6 з.е., биоэнергетика – 3 з.е., эмбриология – 4 з.е., гистология – 3 з.е., биоэтика – 2 з.е., молекулярная биология – 3 з.е., эволюционная биология – 3 з.е., белковая инженерия – 3 з.е., медицинская биохимия – 3 з.е., молекулярная биология клетки – 2 з.е. и ряд курсов по выбору.

В СПбПУ Петра Великого [6] в институте прикладной математики и механики в бакалавриате 01.03.02 «Прикладная математика и информатика» в профиле «Биоинформатика» имеются следующие профильные дисциплины: Общая биология, Молекулярная биология, Языки программирования Python и R, Математическая статистика, Методы интеллектуального анализа данных, Биоинформатика, Системная биология, Методы оптимизации, Уравнения математической физики, Дискретная математика. В магистерской программе 01.04.02_01 «Прикладная математика и биоинформатика» профильные дисциплины: Молекулярная биология, Спецглавы молекулярной биологии, Дополнительные разделы математической статистики, Интеллектуальный анализ данных, Спецглавы биоинформатики, Математические модели в биологии, Параллельные вычисления.

В РНИМЦ им. Н.И. Пирогова [7] на медико-биологическом факультете в специалитете 30.05.03 Медицинская кибернетика, математика, направленность (профиль) Биоинформатика дисциплины в базовой части: Биология 9 з.е., Высшая математика – 12 з.е., Общая морфология – 9 з.е., Органическая химия – 3 з.е., Биоэтика – 2 з.е., Физическая химия – 2 з.е., Биохимия – 8 з.е., Информатика и основы программирования – 8 з.е., Теоретические основы кибернетики – 8 з.е., Математическая биология – 7 з.е., микробиология, вирусология – 7 з.е., Молекулярная биология и генетика – 7 з.е., Иммунология – 3 з.е., Молекулярная фармакология – 9 з.е., Биоинформатика – 3 з.е., Общая биофизика – 3 з.е.;

В вариативной части: Статистический анализ данных – 3 з.е., Статистический язык программирования R – 3 з.е., Молекулярная физиология – 3 з.е., Функциональная геномика – 3 з.е., Системная биология – 3 з.е. Клиническая биоинформатика – 3 з.е., Медицинская геномика – 3 з.е., Алгоритмы биоинформатики 3 з.е., Анализ биологических последовательностей – 3 з.е., Хемоинформатика – 3 з.е., Компьютерное конструирование лекарств – 3 з.е.

Из приведенных данных видно, что профиль «Биоинформатика» возможен для некоторых близких по содержанию направлений и специальностей. Точно также он возможен для направления «Биотехнология».

Предлагаем следующие дополнительные к направлению «Биотехнология» профессиональные компетенции (ДПК):

Профиль бакалавриата	Магистерская программа
ДПК-1. Способен использовать специализированные знания фундаментальных разделов математики, физики, химии и биологии для проведения исследований в области биоинженерии, биоинформатики и смежных дисциплин (модулей);	ДПК-1. Способен разрабатывать алгоритмы и компьютерные программы, пригодные для практического применения;
ДПК-2. Способен проводить экспериментальную работу с организмами и клетками, использовать физико-химические методы исследования макромолекул, математические методы обработки результатов биологических исследований;	ДПК-2. Способен определять новые области исследований и проблемы в сфере моделирования, разрабатывать новые информационные технологии для прогнозирования популяционных изменений
ДПК-3. Способен применять методы биоинженерии и биоинформатики для получения новых знаний и для получения биологических объектов с целенаправленно измененными свойствами, проводить анализ результатов и методического опыта исследования, определять практическую значимость исследования;	ДПК-3. Способен проводить анализ результатов ДНК и РНК секвенирования с использованием биоинформатических методов и ресурсов в научных исследованиях.
ДПК-4. Способен находить и использовать информацию, накопленную в базах данных по биологическим объектам, включая нуклеиновые кислоты и белки, владеть основными биоинформатическими средствами анализа;	ДПК-4. Способен проводить анализ результатов омиксных технологий с использованием методов математической биологии и биоинформатики для поиска новых лекарственных мишеней и биомаркеров, научных и клинических исследований
ДПК-5. Способен понимать принципы работы современных информационных технологий и использовать их для решения задач профессиональной деятельности.	ДПК-5. Способен использовать методы компьютерного конструирования лекарств для поиска и создания новых лекарственных веществ
ДПК-6. Способен обследовать объекты информатизации, описывать технологические процессы, формировать требования к функциональным возможностям информационных систем (ИС), разрабатывать информационное, лингвистическое, алгоритмическое обеспечение при проектировании ИС и баз данных	ДПК-6. Способен разрабатывать автоматизированные системы консультативной поддержки принятия решений, базируясь на медицинских данных и знаниях, с использованием методов математической статистики, технологий «Больших данных» и Искусственного интеллекта
ДПК-7. Способен использовать методы инженерии знаний при взаимодействии с экспертами предметных областей; применять методологические подходы к формализации и структуризации биотехнологической информации; разрабатывать базы знаний при построении экспертных систем в области профессиональной деятельности.	ДПК-7. Способен разрабатывать системы классификации и кодирования информации в технологии и протоколы обмена данными между информационными системами различного уровня

Для получения этих компетенций предлагаются следующие учебные дисциплины:

Профиль бакалавриата	Магистерская программа
Дисциплины биологической направленности	
Основы молекулярной биологии	Молекулярная биология клетки
Кинетика и механизмы ферментативных реакций	Биоинженерия (генная инженерия, клеточная инженерия, инженерная энзимология)
Биоэнергетика	Белковая инженерия
Генетика	Геномика
Дисциплины математической и информационной направленности	
Теоретические основы кибернетики	Дополнительные разделы биоинформатики
Биоинформатика	Дискретная математика
Алгоритмы биоинформатики	Нейронные сети
Языки программирования	Анализ многомерных данных (Big Data)
Обработка экспериментальных данных и планирование эксперимента	Базы данных и программные продукты в биотехнологии
Методология QSAR	OMICs технологии
Базы данных	Нейронные сети

Список дисциплин является приблизительным, может расширяться и дополняться.

Литература

Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года (ВП-П8–2322). Утверждена Правительством РФ 24.12.2012 № 1853п-П8.

Прогноз научно-технологического развития России: 2030. Биотехнологии / под. ред. Л.М. Гохберга, М.П. Кирпичникова. – Москва: Министерство образования и науки Российской Федерации, Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», 2014. – 48 с.

Программа фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы). Утверждена распоряжением Правительства Российской Федерации от 31 декабря 2020 г. № 3684-р.

ФГОС ВО 06.05.91 «Биоинженерия и биоинформатика». Портал Федеральных государственных образовательных стандартов высшего образования. [http://fgosvo.ru/uploadfiles/FGOS % 20VO % 203++/Spec/060501_C_3_18062021.pdf](http://fgosvo.ru/uploadfiles/FGOS%20VO%203++/Spec/060501_C_3_18062021.pdf)

Учебный план специальности 06.05.01 «Биоинженерия и биоинформатика» МГУ им. М.В. Ломоносова. [http://www.fbb.msu.ru/doc/index.php? ID=143](http://www.fbb.msu.ru/doc/index.php?ID=143)

Сайт Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого. https://dep.spbstu.ru/edu/01.03.02/01.03.02_04/, <https://compbio.spbstu.ru/magistratura-bioinformatiki-sistemnoi-biologii/>

Учебный план специальности 30.05.03 «Медицинская кибернетика», профиль «Биоинформатика» Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова https://rsmu.ru/fileadmin/templates/DOC/Discipliny/MedCyber/UP/UP_mk_BI_2021.pdf

УДК 639.3

ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ БИОПРОДУКТОВ ГЛУБОКОГО ГИДРОЛИЗА ПОБОЧНОГО РЫБНОГО СЫРЬЯ В КОМБИКОРМАХ ДЛЯ ИНДУСТРИАЛЬНОЙ АКВАКУЛЬТУРЫ**Н.Ю. Мезенова¹, Д.С. Пьянов², О.Я. Мезенова¹, С.В. Агафонова¹, В.В. Волков¹**¹ Калининградский государственный технический университет, Калининград, Россия² Атлантический филиал ФГБНУ «ВНИРО» («АтлантНИРО»), Россия

Рыбное хозяйство Калининградской области традиционно базировалось на ресурсах океана и Балтийского моря. Однако, начиная с 90-х годов 20-го столетия в связи с депрессивным состоянием промыслового флота объем вылова водных биоресурсов сократился в 4–5 раз. При норме потребления рыбы на душу населения 18–23 кг/год среднедушевой показатель упал до 12–13 кг/год. В связи с этим в регионе стали развивать индустриальную аквакультуру в качестве альтернативного восполнения рыбных ресурсов с целью увеличения питания населения свежей рыбой и рыбными продуктами.

В мировой практике, а также в России и Калининградской области наиболее перспективным считается разведение ценных видов рыб – лососевых и осетровых – в индустриальном рыбоводстве, т. е. в специализированных установках замкнутого водоснабжения (УЗВ) с применением искусственных кормов. На долю отечественной индустриально выращиваемой аквакультуры сегодня приходится около 25 % производственного сектора рыбоводства. Однако его масштабное развитие напрямую зависит от импорта специализированных кормов.

Основными компонентами кормов для большинства видов рыб являются рыбная мука и рыбий жир [1]. За последние годы производство рыбной муки в мире составило около 4,7 млн. тонн, 71 % которого использовалось в кормах для аквакультуры. Однако в России сегодня практически нет масштабного производства рыбной муки и жира, ограниченный ресурс поставляют фрагментарно только судовые установки. Поэтому использование в кормах аквакультуры рыбной муки является экономически проблемным. При этом за последние годы цены на рыбную муку только растут [2].

В настоящее время актуально частично заменять в составе комбикормов аквакультуры дорогостоящую рыбную муку на более доступные компоненты. Рыбий жир также дефицитен и далеко не всегда соответствует по качеству требуемым нормам. Поэтому важным направлением исследований в области питания рыб в индустриальной аквакультуре является обоснование замены рыбной муки и жира на альтернативные источники, по качеству не уступающие традиционным.

В этой связи представляется целесообразным частичное использование вместо рыбной муки в составе кормов продуктов глубокой переработки побочного рыбного сырья, образующихся при производстве пищевой рыбной продукции при ее разделке (голов, хребтов, чешуи и др.). Это позволяет не только решить проблему утилизации рыбных отходов, но и получать добавки протеинового, жирового и минерального составов [3].

В Калининградском ГТУ на кафедре пищевой биотехнологии разработана технология глубокой переработки рыбных отходов (патент РФ 2681352; патент РФ № 2727904). Технология позволяет под действием ферментов и высоких температур выделять протеиновую, липидную и минеральную фракцию из рыбного сырья, при этом протеиновый гидролизат характеризуется высоким содержанием низкомолекулярных пептидов (ММ менее 100 кД) с преобладанием фракции олигопептидов (ди- и трипептидов) с ММ 5–10 кДа (более 80 %). Данный факт свидетельствует о высокой потенциальной усвояемости протеинового компонента в кормовой продукции.

Применение гидролизатов различного водного сырья, в том числе ферментализатов рыбных отходов, рыбного фарша, крилевой муки, мидий и др. исследовалось в составе стартовых кормов рыб, получены положительные результаты, но пока эти технологии остались на экспериментальном уровне [2].

Исследования последних лет убедительно показывают высокий физиологический потенциал для кормов аквакультуры рыбных гидролизатов, получаемых из побочных водных биологических ресурсов. Даже при небольшой дозировке такие добавки ускоряют рост рыбы и ее физиологические показатели (среднесуточный прирост, выживаемость, активность пищеварительных ферментов, коэффициенты видимой переваримости сырого протеина, жира, сухого вещества, валовая энергия).

Включение в состав кормов аквакультуры рыбных протеиновых гидролизаты также выполняют атрактивную функцию, позволяя повысить «аромат» продукта и, как следствие, влечение рыб к источнику запаха. Данный эффект обусловлен высоким содержанием низкомолекулярных компонентов, ответственных за запах и вкус (свободные аминокислоты и пептиды).

Важным результатом применения гидролизатов в составе кормов аквакультуры является положительное влияние на целостность и регуляцию метаболизма кишечника у рыб. Наблюдается увеличение размера кишечных ворсинок, что способствует росту поверхности обмена, активности ферментов щеточной каймы и систем транспорта питательных веществ [4–5].

Целью настоящего исследования являлось обоснование частичной замены рыбной муки на протеиновые гидролизаты, получаемые из побочного рыбного сырья, в составе комбикормов для основного индустриального объекта аквакультуры (лососевых).

В качестве побочного сырья для получения гидролизатов использовали головы кильки, чешую и хребты сардины и сардинеллы. Гидролизаты получали двумя путями – высокотемпературным и ферментативным, используя гидроклав и протеолитический фермент алкалазу. Полученные суспендированные гидролизаты разделяли на три фракции – протеиновую (водорастворимую), жировую и минерально-белковую (осадочную). Протеиновую фракцию сублимационно высушивали, получая мелкодисперсный порошок, который был использован в настоящих экспериментах. Жировую и минерально-белковую фракции применяли для пищевых целей [6].

Химический состав продуктов гидролиза голов кильки, накапливающихся на Калининградских рыбзаводах при производстве консервов, приведен в табл. 1.

Таблица 1 – Усредненный химический состав продуктов гидролиза голов балтийской кильки

Продукты гидролиза	Химический состав, %			
	Вода	Протеин	Зола	Жир
Жир				100
Сублимированный протеиновый гидролизат	6,7	82,7	8,6	2,0
Высушенный белково-минеральный остаток	3,9	54,5	24,0	18,1

Особый интерес для комбикормов аквакультуры представляют сублимированные протеиновые гидролизаты, содержащие в среднем 82,7 % высоко усвояемых низкомолекулярных пептидов и свободных аминокислот. Данные композиции являются биологически активными, которые потенциально могут быть участвующими в иммунном, антиоксидантном, антисептическом, пластическом и других физиологических эффектах [7]. Аминокислотный состав протеиновых гидролизатов из голов кильки, полученных ферментативным и термическим способами, приведен в табл. 2.

По литературным данным рациональным уровнем потребления протеина во всех кормах для всех видов рыб является 45–55 % от сухого вещества. Именно протеиновая пища способна обеспечить строительство всех тканей и органов у растущих организмов рыб. Причем на ранних стадиях развития в стартовых кормах белок преимущественно должен быть представлен мелкими фракциями (низкомолекулярными пептидами, свободными аминокислотами). По мере роста рыб все больше проявляется видовая специфичность. Для хищных лососевых и осетровых рыб в продукционных кормах содержание протеина должно составляет не менее 34–45 % сухого вещества [1].

В рецептурах кормов показателем их белковой сбалансированности выступает соотношение незаменимых для данных видов рыб аминокислот. Данное соотношение определялось разными авторами применительно к различным видам рыб и не имеет сегодня однозначного признания у всех специалистов-рыбоводов. В России для оценки сбалансированности кормов лососевых используются значения установленных потребностей в аминокислотах, определенные Саенко и Каушика [1].

Расчет сбалансированности аминокислотного состава протеиновых гидролизатов, полученных из чешуи рыб различными способами гидролиза, и предназначенных для комбикормов лососевых рыб, проведенный относительно обоснованной потребности в них, приведен в таблице 3.

Таблица 2 – Аминокислотный состав белков голов кильки и полученных из них протеиновых гидролизатов, изготовленных различными способами, г / 100 г. белка

Аминокислота	Головы кильки (сырье)	Термически полученный гидролизат	Ферментативно полученный гидролизат
Аланин	8,91	7,1	8,3
Аргинин	5,21	5,7	5,8
Аспарагин	0,3	0,3	0,2
Аспарагиновая кислота	8,7	9,6	9,4
Карнозин	0,07	0	0,06
Цитруллин	0,22	0,36	0,2
Цистин	0	0	0,06
Глутамин	0,07	0,06	0,06
Глутаминовая кислота	13,0	11,8	12,5
Глицин	8,8	9,0	7,2
Гистидин	2,1	2,6	2,5
Гидроксипролин	1,7	1,6	0,7
Изолейцин	1,9	2,8	2,9
Лейцин	6,7	6,8	6,9
Лизин	6,4	6,6	5,6
Метионин	0,07	0,7	0,5
Орнитин	1,4	1,4	1,4
Фенилаланин	3,5	4,2	5,2
Пролин	4,6	4,9	4,0
Саркозин	8,9	7,0	8,3
Серин	7,0	6,6	6,7
Таурин	2,2	1,3	1,0
Треонин	3,5	3,9	3,9
Тирозин	1,7	1,7	2,6
Валин	3,0	3,9	4,1

Таблица 3 – Расчетные данные аминокислотных скоров белков гидролизатов чешуи сардины относительно «идеальных» белков для лососевых видов рыб

Незаменимая аминокислота	Содержание, г/100 г. белка, в гидролизате:		Установленная потребность (по Саенко), % белка [1]	Скоры аминокислот, %, в гидролизате:		Установленная потребность (по Kaushik), % белка [1]	Скоры аминокислот, %, в гидролизате:	
	термическом	ферментативном		термическом	ферментативном		термическом	ферментативном
Аргинин	8,27	13,39	5,0	165,4	267,8	6,0	137,83	223,16
Гистидин	2,24	5,56	-	-	-	1,8	124,44	308,88
Изолейцин	2,95	10,2	2,2	134,09	463,63	2,3	128,26	443,48
Лейцин	4,49	15,65	3,9	115,13	401,28	4,0	112,25	391,25
Лизин	8,63	18,63	-	-	-	5,0	172,60	372,60
Метионин	2,76+0,23*	7,78+1,39*	1,5+1*	119,60	366,8	4,0	69,00	229,25
Фенилаланин	2,35+1,72*	8,56+6,09**	4,1+0,4**	90,44	325,55	4,3	94,65	340,70
Треонин	2,75	10,07	2,2	125	457,72	2,3	119,56	437,83
Валин	5,17	12,11	3,0	173,33	403,66	3,3	156,66	366,97

*цистин; **тирозин

С учетом того, что для рыб, выращиваемых в хозяйствах индустриального типа, скоры лимитирующих аминокислот должны быть не менее 80–95 %, можно сделать вывод, что предлагаемые гидролизаты из чешуи рыб будут положительно влиять на биологическую ценность комбикорма и потенциально благотворно воздействовать на физиологию рыб.

С учетом полученных данных, принимая во внимание рекомендуемые ФАО наборы кормовых ингредиентов для комбикормов лососевых (табл. 3), нами была предложена усовершенствованная рецептура, в которой проведена замена 5 % рыбной муки на такое же количество гидролизата из хребтов сардины (табл. 4).

Таблица 3 – Рецептура стандартного корма для молоди лососевых (ФАО)

Компонент	Содержание, на 100 кг сухих веществ корма
Рыбная мука (<i>Clupea harengus</i>)	60,05
Крилевая мука	2,00
Кровяная мука	2,00
Рыбный растворимый белковый концентрат	5,00
Пивные дрожжи	4,00
Молотая пшеница	14,01
Рыбный жир	10,04
Витаминный премикс	1,00
Минеральный премикс	1,00

Таблица 4 – Расчет сбалансированности стартового комбикорма для лососевых рыб при замене 5 % рыбной муки на гидролизаты из хребтов сардины, полученные ферментативным гидролизом

Аминокислота (АК)	Потребность молоди лосося (чавыча, молодь, 2–4 г.)	Стандартный корм		Корм с гидролизатом (5 % замены рыбной муки) из хребтов лососевых	
		Содержание аминокислоты	Скор аминокислоты	Содержание аминокислоты	Скор аминокислоты
Лизин	2,000	2,976	148,80	3,183	159,2
Метионин	0,500	1,110	221,90	1,175	234,9
Цистин	1,000	0,422	42,19	0,420	42,05
Цистин + метионин	1,500	1,532	102,10	1,595	106,3
Треонин	0,900	1,621	180,10	1,715	190,6
Валин	1,300	2,314	178,00	2,432	187,1
Изолейцин	0,900	1,730	192,20	1,852	205,8
Лейцин	1,600	3,019	188,70	3,147	196,7
Тирозин	0,40	1,275	318,8	1,316	329,1
Фенилаланин	1,70	1,570	92,32	1,656	97,41
Гистидин	0,700	0,973	139,00	1,049	149,8
Аргинин	2,400	2,430	101,20	2,494	103,9
Триптофан	0,200	0,506	253,10	0,475	237,3

Таким образом, введение 5 % гидролизата из побочного рыбного сырья (хребтов сардины, остающихся при филетировании), способствует росту скоров аминокислот на 7,4–8,1 %, что свидетельствует о повышении биологической ценности корма по аминокислотной сбалансированности. Полученные данные также показывают перспективность использования в составе стартовых и продукционных комбикормов индустриальной аквакультуры (лососевых и осетровых) продуктов глубокого гидролиза побочного рыбного сырья, обладающих повышенной усвояемостью, в качестве альтернативы рыбной муке. Производство и применение протеиновых гидролизатов позволило бы не только приблизиться к решению проблемы кормов в Калининградском регионе, но и проблему утилизации отходов рыбоперерабатывающих производств.

Литература

- Щербина М.А., Гамыгин Е.А. Кормление рыб в пресноводной аквакультуре. – М.: Изд-во ВНИРО, 2006. – 360 с.
- Остроумова И.Н. Включение в стартовые корма для сиговых рыб (Coregonidae) бактериальной биомассы и белковых гидролизатов / И.Н. Остроумова, В.В. Костюничев, А.А. Лютиков, В.А. Богданова, А.К. Шумилина, Т.П. Данилова, А.В. Козьмина, Т.А. Филатова // Вопросы рыболовства. – 2018. – Том 19 (№ 1). – С. 82–98.
- Мезенова О.Я.Д. Тишлер, С.В. Агафонова, Н.Ю. Мезенова, В.В. Волков, Д.А. Бараненко, Т. Гримм, С. Ридель Исследование и рациональное применение пептидных и липидных композиций, получаемых при гидролизной переработке коллагенсодержащих тканей /Вестник Международной академии холода, 2021, №; 1, с. 46–58
- Khosravi S. Supplementation of Protein Hydrolysates to a Low-fishmeal Diet Improves Growth and Health Status of Juvenile Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus* / S. Khosravi, H.T.D. Bui, M. Herault, V. Fournier, K.D. Kim. B.J. Lee, K.W. Kim, K.J. Lee // Journal of the World Aquaculture Society. – 2018. – Vol. 49 (5). – P. 897–911.
- Leduc A. Dietary aquaculture by-product hydrolysates: impact on the transcriptomic response of the intestinal mucosa of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) fed low fish meal diets / A. Leduc, C. Zatylny-Gaudin, M. Robert, E. Corre, G. Le Corguille, H. Castel, A. Lefevre-Scelles, V. Fournier, E. Gisbert, K.B. Andree, J. Henry // BMC Genomics. – 2018. – 19:396. Leduc et al., 2018], [Khosravi et al., 2018.
- Обоснование рациональных параметров гидролиза коллагенсодержащего высокоминерализованного копченого рыбного сырья /О.Я. Мезенова, Л.С. Байдалинова, С.В. Агафонова и др. // Известия вузов. Пищевая технология, 2019. – № 4 (370). – С. 46–50.
- Cytoprotective Effect of Antioxidant Pentapeptides from the Protein Hydrolysate of Swim Bladders of Miiuy Croaker (*Miiichthys miiuy*) against H₂O₂-Mediated Human Umbilical Vein Endothelial Cell (HUVEC) Injury / C. Shi-Ying, W. Yu-Mei, Zh. Yu-Qin, C. Chang-Feng, W. Bin. // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – № 20(21). – pp. 5425.



Уважаемые коллеги!
Дорогие друзья!

Мы выражаем большую и искреннюю благодарность всем участникам VIII международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» за ваш труд в определении основных проблем в области биотехнологии и выявлении тенденций развития в данной области, за обмен достижениями биотехнологии и обсуждение путей оптимизации образовательного процесса студентов-биотехнологов. Желаем вам творческих успехов, больших научных достижений и побед!

До новых встреч!
С уважением, оргкомитет.

Организаторы:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Воронежский государственный университет инженерных технологий»,
Научно-образовательный центр «НаноБиоТех»,
ООО «Вега-Эко»,
ООО «Биоактуаль»

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ
журнала «*Актуальная биотехнология*»

Приглашает к публикации студентов, аспирантов и научных работников по следующим тематикам:

- *Актуальные вопросы современной биотехнологии*
- *Биоинженерия и биоинформатика*
- *Экология и ресурсосбережение*
- *Биоэнергетика, пищевая биотехнология, биохимия, биогеотехнология*
- *Сельскохозяйственная и лесная биотехнология*
- *Биофармацевтика и биомедицина*

Требования к оформлению статей

1. Материалы представляются в двух видах: на электронном носителе и распечатанные на одной стороне листа белой бумаги формата А4 (1 экз.) на лазерном принтере. Они должны быть набраны в редакторе MSWord версия не ниже 6.0 (Office не выше 2007) и напечатаны через одинарный интервал в две колонки шрифтом:

- основной текст – TimesNewRomanCyr 11 с полями: левое 22 мм, правое 18 мм, верхнее и нижнее 25 мм;
- колонтитулы от края – верхний и нижний 18 мм;
- заголовки по центру – TimesNewRomanCyr 11, жирный;
- красная строка -1 см;
- перенос слов – автоматический.

Со смещением на 5 см от рамки текста в начале статьи набираются:

- УДК– Times New Roman Cyr 12;
- должность, степень И. О. Ф. авторов – TimesNewRomanCyr 12;
- название статьи – TimesNewRomanCyr 16, жирный, строчной (без переноса);
- аннотации– Times New Roman Cyr 9;
- ключевые слова – TimesNewRomanCyr 9, до 10 слов;

2. Объем для статьи – 3-8 с. Структурно статья должна иметь четко выраженное *введение*, в котором ставится задача (описывается решаемая проблема), *основную часть*, где излагаются используемые авторами пути решения поставленной задачи, приводятся и обсуждаются результаты, и *заключение*, в сжатой форме подводящее итог работы. Повторение одних и тех же данных в статье, таблице и графике не допускается. Размерность всех характеристик приводится в системе СИ.

3. К каждой статье под заглавием дается аннотация (объем до 600 печатных знаков) на русском и английском языках через 1 строку друг от друга. Название статьи, фамилия и инициалы приводятся отдельно на английском языке.

4. Название статьи или краткого сообщения должно быть лаконичным и точно отражать содержание.

5. Иллюстрации в формате jpeg или gif:

должны быть расположены после ссылки на них в тексте;

должны выполняться на компьютере с обозначением всех необходимых букв и символов в соответствии с ЕСКД и Р 50-77-80. Все буквенные и цифровые обозначения, приведенные на рисунках, поясняются в основном или подрисуночном тексте. Подрисуночные подписи даются TimesNewCyr 10, на формат рисунка.

Графические объекты (диаграммы, графики) должны быть активными (т.е. подлежать редактированию стандартными средствами, например, MSExcel).

6. Формулы и буквенные обозначения:

- × буквы латинского алфавита, используемые в индексах, набирают курсивом;
 - × буквы русского и греческого алфавита – прямым шрифтом; знак вектора – полужирным;
 - × нумерация формул в тексте сквозная. Нумеруются только те формулы, на которые есть ссылки в тексте.
- Формат формул (стандартный редактор) :
- × стиль – «математический»;
 - × размер символа — 11

Sizes (Размеры)	
Full (Обычный)	11 – 10
Subscript/Superscript (Крупный индекс)	7
Sub-subscript/Superscript (Мелкий индекс)	5
Symbol (Крупный символ)	12
Subsymbol (Мелкий символ)	9

7. Таблицы (слово печатается вразрядку) должны быть с заголовками и обязательно располагаться после ссылки на них в тексте. Графы в таблицах должны иметь краткие заголовки. Упоминаемые в заголовках величины сопровождаются соответствующими единицами измерений.

8. Литература (слово печатается: TimesNewRomanCyr 11, жирный, прописной) включает источники, использованные автором при написании статьи, и должна содержать не более 10 наименований. Ссылки в тексте даются в квадратных скобках: [1], помещаются в конце статьи и оформляются согласно ГОСТ 7.1-2003.

В журнале публикуются оригинальные научные статьи теоретического и экспериментального характера. Автор указывает рубрику (в сопроводительном письме), в которой он хотел бы разместить свою статью:

Статья должна быть тщательно проверена и подписана всеми авторами.

На отдельном листе авторы указывают название статьи на русском и английском языке, ФИО полностью, адрес, ученую степень, должность, место работы, контактный телефон, e-mail, а также отмечают автора для переписки.

К статье должны прилагаться сопроводительные документы:

- сопроводительное письмо;
- выписка из протокола заседания кафедры (лаборатории) с рекомендацией статьи к печати;
- положительная рецензия ведущего ученого в данной области или члена редакционной коллегии, заверенная подписью и печатью.

•

