16+

ISSN 2304-4691

Актуальная биотехнология



№ 3(30)

2019

ISSN 2304-4691

Основан в 2012г.
г. Воронеж

Актуальная биотехнология

№ 3 (30)

2019

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 10.09.2019. Подписано в печать 18.09.2019.
Дата выхода в свет: 21.09.2019
Усл. печ. л. 4,6. Тираж 1500 экз. Заказ 47
Цена – свободная.

Центр коллективного пользования «Контроль и управление энергоэффективными проектами»

- ФГБОУ ВО «ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ»,
- 394036 РОССИЯ, Г. ВОРОНЕЖ, ПР-Т РЕВОЛЮЦИИ, 19, АУД. 11
- НАЧАЛЬНИК ЦКП КУЭП ДЕРКАНОСОВА АННА АЛЕКСАНДРОВНА +7(920)432-16-57 AA-DERK@YANDEX.RU
- HTTPS://CKP-VSUET.RU



ИССЛЕДОВАНИЯ В ОБЛАСТИ ИЗУЧЕНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РАСТИТЕЛЬНОГО И ЖИВОТНОГО СЫРЬЯ, ЕГО СОСТАВА, ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И ПРОДОВОЛЬСТВЕННОГО СЫРЬЯ

Перечень основных исследований, проводимых в ЦКП КУЭП:

№	НАИМЕНОВАНИЕ ОБОРУДОВАНИЯ	НАИМЕНОВАНИЕ ИСПЫТАНИЙ И ОПРЕДЕЛЯЕМЫХ ХАРАКТЕРИСТИК	ЦЕНА ЗА 1 ОБРАЗЕЦ, РУБ.
1	Жидкостный хроматограф "LC-20 Prominence" (Shimadzu)	– количественное определение 17-ти аминокислот (без триптофана)	4500 (с определением белка)
2		– определение триптофана (TRP) методом ионообменной хроматографии с постколоночной дериватизацией нингидрином	1000
3		– количественное определение 9-ти водорастворимых витаминов группы В:	6000
4	Анализатор антиоксидантной активности «Цвет Яуза-01-АА» (Россия)	– определение антиоксидантной активности различных пищевых продуктов, биологически активных добавок	500
5	Система синхронного термического анализа для проведения ДТА/ДСК/ТГА STA 449 F3 (Netzsch)	– определение массы фазовых переходов и энтальпий в зависимости от температур; – дифференциальный термический анализ; – дифференциальносканирующая калориметрия; – термогравиметрия; – синхронный теримический анализ.	1000
6	Комплекс газохроматографи-ческий «Хромос ГХ-1000» (ХРОМОС)	– определение подлинности водок и спирта этилового из пищевого сырья в соответствии с ГОСТ Р 51786; – определение содержания токсичных микропримесей в водке и спирте этиловом из пищевого сырья в соответствии с ГОСТ Р 51698 и ГОСТ Р 51762. – диапазон измеряемых объемных долей метилового спирта составляет от 0,0001 до 0,1%,массовых концентраций остальных микропримесей – 0,5 до 1000 мг/дм3	1500



Журнал Вестник ВГУИТ

ЖУРНАЛ ИНДЕКСИРУЕТСЯ В МЕЖДУНАРОДНЫХ БАЗАХ: EBSCO, DOAJ, AGRIS.

ВХОДИТ В ПЕРЕЧЕНЬ РЕЦЕНЗИРУЕМЫХ НАУЧНЫХ ИЗДАНИЙ ВАК

- ФГБОУ ВО «ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ»,
- 394036 РОССИЯ, Г. ВОРОНЕЖ, ПР-Т РЕВОЛЮЦИИ, 19, АУД. 11
- ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ: ДЕРКАНОСОВА АННА АЛЕКСАНДРОВНА ТЕЛ: 8 920 432 16 57
- E-MAIL: POST@VESTNIK-VSUET.RU
- WWW.VESTNIK-VSUET.RU

Уважаемые коллеги!
Приглашаем Вас к публикации в нашем журнале

Соответствие рубрик/разделов журнала Вестник ВГУИТ

Номенклатуре научных специальностей, по которым присуждаются ученые степени.

НАИМЕНОВАНИЕ РУБРИКИ/РАЗДЕЛА РЕЦЕНЗИРУЕМОГО НАУЧНОГО ИЗДАНИЯ	ОТРАСЛИ НАУКИ И/ИЛИ ГРУППЫ СПЕЦИАЛЬНОСТЕЙ НАУЧНЫХ РАБОТНИКОВ В СООТВЕТСТВИИ С НОМЕНКЛАТУРОЙ НАУЧНЫХ СПЕЦИАЛЬНОСТЕЙ, ПО КОТОРЫМ ПРИСУЖДАЮТСЯ УЧЕНЫЕ СТЕПЕНИ
05.00.00 технические науки	
1.1 Процессы и аппараты пищевых производств 1.2 Пищевая биотехнология	05.18.01 – Технология обработки, хранения и переработки злаковых, бобовых культур, крупяных продуктов, плодоовощной продукции и виноградарства 05.18.04 технология мясных молочных и рыбных продуктов и холодильных производств 05.18.05 технология сахара и сахаристых продуктов чая табака и субтропических культур 05.18.06 технология жиров эфирных масел и парфюмерно-косметических продуктов 05.18.07 биотехнология пищевых продуктов и биологически активных веществ 05.18.12 процессы и аппараты пищевых производств 05.18.15 товароведение пищевых продуктов и технология общественного питания
2. Химическая технология	05.17.01 Технология неорганических веществ 05.17.04 Технология органических веществ 05.17.06 технология и переработка полимеров и композитов 05.17.07 химическая технология топлива и высокоэнергетических веществ 05.17.08 процессы и аппараты химических технологий
08.00.00 экономические науки	
3. Экономика и управление	08.00.05 экономика и управление народным хозяйством

Стоимость публикации 6500 руб.

Содержание

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

ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОЙ МЕТАЛЛОПЕПТИДАЗЫ М9
А.А. Махова, М.Ю. Минаев **21**

ВЛИЯНИЕ РЕЖИМОВ ИМПУЛЬСНОГО ОСВЕЩЕНИЯ НА ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ ЗМЕЕГОЛОВНИКА И КАЛЕНДУЛЫ В ЗАКРЫТОЙ СИСТЕМЕ СИНЕРГОТРОНА 1.01
В.Н. Зеленков[1,2,3], В.В. Латушкин[1], М.И. Иванова[3], Н.Ю. Свистунова[2], С.В. Гаврилов[1], П.А. Верник[1] **23**

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ФЕРМЕНТА АСТАЦИНА ДЛЯ ОБРАБОТКИ МЯСА
М.Ю. Минаев, А.А. Махова **27**

ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ В ЛЕСНОМ ХОЗЯЙСТВЕ ЦЧР
А.И. Сиволапов[1], В.А. Сиволапов[2] **29**

РАЗРАБОТКА НОВЫХ ФОРМ БИОПОЛИМЕРНЫХ НОСИТЕЛЕЙ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТОВ
П.Ю. Стадольникова, Б.Б. Тихонов, А.И. Сидоров **33**

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛОКА КРОЛИКА В РАЗРАБОТКЕ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ ДЛЯ НОВОРОЖДЕННЫХ И НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ
Л.В. Антипова, А.О. Дарьин **36**

АНТАГОНИСТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ РИЗОСФЕРНОЙ БАКТЕРИИ *PSEUDOMONAS ASPLENII* 11RW ПРОТИВ ПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР
С.Н. Масленникова, С.Д. Каракотов **39**

ПОИСК БАКТЕРИОЦИНОГЕННЫХ ШТАММОВ СРЕДИ ИНДИГЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ МЯСА И ПЕРСПЕКТИВА ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОТИВ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ.
Е.В. Зайко, Д.С. Батаева **43**

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ОСВЕЩЕННОСТИ НА КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРОВОДОРОСЛИ CHLORELLA SOROKINIANA В ЛАБОРАТОРНОМ БИОРЕАКТОРЕ
М.С. Никитина, Т.А. Кузнецова **46**

ТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГИБРИДНОГО РАСТЕНИЯ *PHALENOPSIS* ИЗ НЕЗРЕЛЫХ СЕМЯН В АСЕПТИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ *IN VITRO*
В.О. Климентова[1], Е.В. Бучугина[1], В.В. Назаров[1], Л.А. Хасанова[2] **48**

БИОТЕХНОЛОГИЯ РАЗМНОЖЕНИЯ И АДАПТАЦИИ ВИНОГРАДА В LED-ФИТОКУЛЬТУРЕ
[1] Е.Н. Олешук,[2] Т.В. Никонович,[1] Е.Г. Попов **50**

ФАГОЧИПИРОВАНИЕ КАК СПОСОБ ЗАЩИТЫ ПРАВ НА ФЕРМЕНТИРОВАННЫЕ МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ
И.С. Полянская, А.В. Салахутдинова **54**

РАЗРАБОТКА РЕЦЕПТУРНЫХ КОМПОЗИЦИЙ КОРМОВ ДЛЯ ОБЪЕКТОВ ХОЛОДНОВОДНОЙ АКВАКУЛЬТУРЫ (НА ПРИМЕРЕ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ)
О.П. Дворянинова, А.В. Соколов, А.Е. Куцова, А.Р. Меркулова **57**

ВЛИЯНИЕ *DELFTIA* SP. LP-1 НА ПОВЫШЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ САЛАТА (*LACTUCA SATIVA* L.) К *ERWINIA CAROTOVORA SUBSP. CAROTOVORA* B15
Н.В. Агафонова, Е.Н. Капаруллина, Н.В. Доронина **59**

ГЛУБОКАЯ ПЕРЕРАБОТКА ОВОЩНОГО СЫРЬЯ НА ОСНОВЕ БИОТЕХНОЛОГИИ
Р.А. Дроздов, М.А. Кожухова, В.С. Коробицын, Т.А. Дроздова **62**

ВЛИЯНИЕ ОСВЕЩЕНИЯ НА РОСТ И АНТИОКСИДАНТНУЮ АКТИВНОСТЬ СЕЯНЦЕВ РЕДИСА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В РЕГУЛИРУЕМЫХ УСЛОВИЯХ СИНЕРГОТРОНА ИСР 1.01
В.Н. Зеленков[1,2,3], В.В. Латушкин[1], М.И. Иванова[3], А.А. Лапин[4], С.В. Гаврилов[1], П.А. Верник[1] **66**

СОВМЕСТНАЯ ОВЕРЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ХРИЗАНТЕМЫ *CDM86, CDM115* И *CDM37* ИЗМЕНЯЕТ ИДЕНТИЧНОСТЬ ВСЕХ ОРГАНОВ ЦВЕТКА И СНИЖАЕТ ФЕРТИЛЬНОСТЬ ТАБАКА
А.В. Нежданова[1,2], А.М. Камионская[1], А.В. Щенникова[1] **69**

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КОМПЛЕКСНОЙ ПЕРЕРАБОТКИ КАЛЬМАРА *BERRYTERTHIS MAGISTER*
Т.А. Игнатова, А.В. Подкорытова, Т.В. Родина **72**

ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ НУТРИЦИОЛОГИЯ: ПРОДУКТЫ С САХАРОЗАМЕНИТЕЛЯМИ, СВОЕВРЕМЕННОСТЬ ИЛИ НЕАКТУАЛЬНОСТЬ
И.С. Полянская, А.Р. Козицина **75**

ПРИМЕНЕНИЕ БИОТЕХНИЧЕСКИХ ПРИЕМОВ ДЛЯ РАЗМНОЖЕНИЯ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО
[1] Т.А. Благодарова, [2] А.Ю. Кошелев,[3] А.И. Сиволапов **78**

БИОПРЕПАРАТИВНОЕ СОПРОВОЖДЕНИЕ ПОСТУРОЖАЙНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ
Е.И. Кипрушкина, В.С. Колодязная, И.А. Шестопалова, С.С. Мишин, Т.В. Нагиев **82**

ВЛИЯНИЕ КОНСОРЦИУМА МИКРООРГАНИЗМОВ НА РАЗВИТИЕ ФИТОПАТОГЕНОВ
С.А. Ибрагимова **84**

ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ К СТЕБЛЕВОЙ РЖАВЧИНЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ SR ГЕНОВ В ОБРАЗЦАХ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ВИР
И.Д. Созина[1], В.В. Соляникова[1], О.А. Баранова[2], О.П. Митрофанова[3] **87**

ПОЛУЧЕНИЕ ПИЩЕВОГО УКСУСА ИЗ ВТОРИЧНЫХ РЕСУРСОВ ПИВОВАРЕННОЙ ОТРАСЛИ
О.С. Егорова, Д.Р. Летфуллина **89**

ВЛИЯНИЕ РЕЖИМОВ ИМПУЛЬСНОГО ОСВЕЩЕНИЯ НА ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТМИНА И ПАЖИТНИКА В ЗАКРЫТОЙ СИСТЕМЕ СИНЕРГОТРОНА 1.01
В.Н. Зеленков[1,2,3], В.В. Латушкин[1], М.И. Иванова[3], Н.Ю. Свистунова[2], С.В. Гаврилов[1], П.А. Верник[1] **94**

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕАЛИЗАЦИИ МЕТОДА IN VITRO ПРИ РАЗМНОЖЕНИИ ВИНОГРАДА
С.А. Корнацкий **98**

ПОЛУЧЕНИЯ ВЫСОКОКАЧЕСТВЕННЫХ КОРМОВЫХ ДОБАВОК СО СВОЙСТВАМИ ФИТОБИОТИКА
А.А. Дерканосова, А.А. Коротаева, А.А. Ориничева **101**

ФУКОЗОСОДЕРЖАЩИЕ САХАРА КАК ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ КОМПОНЕНТ КОМБИКОРМА ДЛЯ ОСЕТРОВЫХ РЫБ
Е.П. Анохина, М.М. Исува, О.С. Корнеева **101**

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ СЕЯНЦЕВ НУГА АБИССИНСКОГО ПРИ РАЗНЫХ РЕЖИМАХ ИМПУЛЬСНОГО ОСВЕЩЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИИ МИНЕРАЛЬНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ РАСТВОРОВ
В.Н. Зеленков[1,2,3], А.А. Лапин[4], В.В. Карпачев[5], В.В. Латушкин[1], М.И. Иванова[3], С.В. Гаврилов[1], П.А. Верник[1], В.П. Барышок[6] **103**

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРОРОЩЕННОЙ СПЕЛЬТЫ НА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДРОЖЖЕЙ SACCHAROMYCES CEREVISIAE
З.Ш. Мингалеева, А.В. Маслов, О.В. Старовойтова, А.И. Биктагирова, О.А. Решетник **106**

ИЗМЕНЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ И ФУНКЦИОНАЛЬНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МЯСА ФОРЕЛИ ОЗЕРНОЙ В ПРОЦЕССЕ ХРАНЕНИЯ
О.П. Дворянинова[1], А.Е. Куцова[1], А.В. Алехина[1], И.А. Саранов[1], А.Е. Матеева[2] **107**

ОСНОВЫ СОЗДАНИЯ ОПТИМАЛЬНЫХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ ПИЩЕВЫХ И КОРМОВЫХ БИОДОБАВОК
В.Л. Кудряшов, Н.С. Погоржельская, Ю.А. Борщова, Е.Н. Соколова, Н.А Фурсова, В.А. Алексеев **111**

ОБЪЕДИНЕНИЕ В ОДНОМ ГЕНОТИПЕ ЛОКУСОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ НЕКОТОРЫЕ ПАРАМЕТРЫ ВОЛОКНА, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА «ПИРАМИДИРОВАНИЯ ГЕНОВ»
А.А. Туланов, М.М. Дарманов, А.Х. Макамов, О.С. Тураев, В.С. Камбурова, И.Ю. Абдурахмонов **115**

ОБЕСПЕЧЕНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ
Ю.Ю. Шестакова, Н.Л. Клейменова, О.А. Орловцева, Л.И. Назина, А.Н. Пегина **118**

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА ФОСФОЛИПАЗЫ НА КАЧЕСТВЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КЕКСОВ
Е.А. Солдатова, С.Ю. Мистенева, Т.В. Савенкова **122**

СОДЕРЖАНИЕ И СОСТАВ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ CYANOPHYTA
Д.И. Петрухина **124**

СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОДЛИННОСТИ И СОДЕРЖАНИЯ ОСТАТОЧНОЙ ВЛАЖНОСТИ В ВАКЦИНАХ МЕТОДОМ БИК-СПЕКТРОСКОПИИ
А.Ю. Хрущев, Ю.С. Ходькова, Т.Н. Лихих, С.В. Антонова, В.О. Бондаренко **128**

ВЛИЯНИЕ ПРИРОДНОГО САХАРОЗАМЕНИТЕЛЯ НА АКТИВНОСТЬ ХЛЕБОПЕКАРНЫХ ПРЕССОВАННЫХ ДРОЖЖЕЙ И ПРОЦЕСС СОЗРЕВАНИЯ ПОЛУФАБРИКАТА
С.В. Борисова, З.Ш. Мингалеева, А.И. Биктагирова, О.А. Решетник, О.В. Старовойтова **130**

СОЗДАНИЕ СОВРЕМЕННОЙ ТЕХНОЛОГИИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ СОРТОВ И ФОРМ ВИНОГРАДА НА ОСНОВЕ МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО АНАЛИЗА
А.В. Секридова[1], О.П. Малюченко[1], А.Г. Прилипов[2], Е.Н. Кислин[3], И.А. Шилов[1] **133**

ВЛИЯНИЕ ФП ЦЕЛЛОЛЮКС-А НА ВЫХОД СБРАЖИВАЕМЫХ УГЛЕВОДОВ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ЭТАНОЛА ИЗ ЯЧМЕНЯ
А.Н. Яковлев[1], Г.В. Агафонов[1], Т.С. Ковалева[1], С.Ф. Яковлева[1], Т.Н. Тертычная[2] **134**

ВЫРАЩИВАНИЕ ВЫСШЕГО ГРИБА *FLAMMULINA VELUTIPES* В ДВОЙНОЙ КУЛЬТУРЕ С *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*
О.М. Цивилева, А.Н. Шатерников, В.Е. Никитина **136**

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ НА ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТЬ КУЛЬТУРЫ LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS
Е.Б. Жалсабон, Р.Ц. Михайлова, А.Т. Бубееев, В.Ж. Цыренов **140**

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА КОНЦЕНТРАТА ПИЩЕВЫХ ВОЛОКОН, ПОЛУЧЕННОГО ИЗ ТОПИНАМБУРА
Р.А. Дроздов[1], М.А. Кожухова[1], А.А. Кушнерева[2], А.В. Шкуро[1] **143**

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОДУКТОВ СПОРТИВНОГО ПИТАНИЯ ДЛЯ ОРГАНИЗОВАННЫХ КОЛЛЕКТИВОВ В ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ
С.А. Новоселов[1], А.Н. Шаронов[2], С.М. Кузнецов[1], С.А. Лопатин[3] **146**

ОВЕС И ПРОДУКТЫ ЕГО ПЕРЕРАБОТКИ КАК ПЕРСПЕКТИВНОЕ ПИЩЕВОЕ СЫРЬЕ СЕВЕРО-ЗАПАДНОГО РЕГИОНА РОССИИ
Т.Р. Кудряшова, О.Б. Иванченко **149**

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ АКТИНОБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОЧВ ПОД HERACLEUM SOSNOWSKYI MANDEN
Е.В. Товстик, И.Г. Широких, А.В. Сазанов **153**

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОНСЕРВИРОВАННОГО СЕНАЖА В КОРМЛЕНИИ БЫЧКОВ
И.В. Миронова, Е.В. Позднякова, А.М. Багаутдинов, Х.Х. Тагиров, Ю.Н. Чернышенко **156**

РАСТИТЕЛЬНЫЕ ИСТОЧНИКИ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ БОРЬБЫ С ВОЗБУДИТЕЛЕМ АСКОСФЕРОЗА ПЧЕЛ
В.И. Домаш[1], М.И. Черник[2], М.А. Белозерский[3], Я.Е. Дунаевский[3], О.А. Иванов[1], Т.Г. Шабашова[1] **159**

ВЛИЯНИЕ ПОЛИСАХАРИДНОГО КОМПЛЕКСА ЛЮЦЕРНЫ НА СОРБИРОВАННЫЕ СВОЙСТВА ПИЩЕВЫХ СИСТЕМ
Л.Э. Глаголева, Александрова А.В **161**

МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЕ МАРКЕРЫ LINARIA VULGARIS L.
О.А. Павлова[1], И.А. Владимиров[1], Д.Е. Полев[3], Д.И. Богомаз[1,2]. **164**

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КЭНДИ СИРОПА В ПИВОВАРЕНИИ
М.М. Данина, О.Б. Иванченко* **166**

СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЙ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКТ ГИПОХОЛЕСТЕРИНЕМИЧЕСКОГО И ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ
В.М. Воробьева, В.К. Мазо, И.С. Воробьева, С.Н. Зорин **169**

ИУК И АБК СТИМУЛИРУЮТ ПРОРАСТАНИЕ *IN VITRO* МУЖСКОГО ГАМЕТОФИТА ПЕТУНИИ, АКТИВИРУЯ К ± КАНАЛЫ В ПМ ПЫЛЬЦЕВЫХ ТРУБОК.
А.С. Воронков, Ю.В. Минкина[1], Г.В. Тимофеева, Л.В. Ковалева **173**

ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА КИСЛОМОЛОЧНОЙ ПАСТЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ШТАММОВ ЛАКТОБАКТЕРИЙ СЕЛЕКЦИИ НИИ БИОТЕХНОЛОГИИ ГОРСКОГО ГАУ И КЛУБНЕЙ ТОПИНАМБУРА СОРТА ИНТЕРЕС
А.М. Хозиев, Б.Г. Цугкиев, З.Л. Дзиццоева, И.Б. Цугкиева **175**

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА СОХРАНЕНИЯ И РАЗМНОЖЕНИЯ СОРТОВ И КЛОНОВ ВИНОГРАДА
И.А. Павлова, В.П. Клименко **176**

ВЛИЯНИЕ ФИТОГОРМОНОВ НА РИЗОГЕНЕЗ SALVIA AUSTRIACA L.
Е.В. Васильченко **179**

МИКРОСАТЕЛЛИТНОЕ ГЕНОТИПИРОВАНИЕ СОРТОВ КЛЕВЕРА ЛУГОВОГО И ЛЮЦЕРНЫ СЕЛЕКЦИИ ВНИИ КОРМОВ ИМ. В.Р. ВИЛЬЯМСА
И.А. Клименко, А.О. Шамустакимова, Н.В. Капустина, М.А. Макаренков **180**

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ДРОЖЖЕВОГО ПЕЧЕНЬЯ
О.В. Старовойтова, З.Ш. Мингалеева, О.А. Решетник **182**

ПРОЕКТИРОВАНИЕ ГИПОАЛЛЕРГЕННОЙ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ ИЗ МЯСА ИНДЕЙКИ СО СБАЛАНСИРОВАННЫМ АМИНОКИСЛОТНЫМ СОСТАВОМ
А.А. Смоленцева, Р.А. Бежанова **185**

ИССЛЕДОВАНИЕ СУЛЬФИРОВАНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ РАСТИТЕЛЬНОГО МАСЛА
А.В. Протопопов, А.В. Голод, А.Е. Бовина **190**

ТЕХНОЛОГИЯ КОРМОВЫХ ДОБАВОК НА ОСНОВЕ ОТХОДОВ ПРОИЗВОДСТВА МИДИЙ
О.Е. Битютская, О.И. Лавриненко, Е.В. Спирато **191**

УБОЙНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ БАРАНОВ РОМАНОВСКОЙ ПОРОДЫ ПРИ ВКЛЮЧЕНИИ В РАЦИОН СОРБЦИОННОЙ И ПРОБИОТИЧЕСКОЙ ДОБАВОК
С.Р. Зиянгирова, И.В. Миронова, Ю.Н. Чернышенко, А.А. Нигматьянов, Р.Р. Сайфуллин **196**

НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ПРОИЗВОДСТВУ НИЗКОЛАКТОЗНОГО МОРОЖЕНОГО
Е.И. Мельникова, Е.В. Богданова **199**

ОЛИГОСАХАРИДЫ ИЗ ПЛОДОВ АБРИКОСА, ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОМ ВЭЖХ
М.Х. Рахмонов, А.С. Джомуродов, Икроми Х., З.К. Мухидинов **201**

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДИПЛОИДИЗИРОВАННЫХ ГАПЛОИДНЫХ ЛИНИЙ В СЕЛЕКЦИИ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ В УСЛОВИЯХ ЦЕНТРАЛЬНОГО НЕЧЕРНОЗЕМЬЯ
А.О. Казаченко, Н.В. Давыдова, А.В. Грачева, Е.С. Романова, А.В. Широколава **205**

БИОФОРТИФИКАЦИЯ КУРИНЫХ ЯИЦ – БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ПОЛУЧЕНИЮ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПИЩЕВЫХ ИНГРЕДИЕНТОВ ПОВЫШЕННОЙ ПИЩЕВОЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЦЕННОСТИ.
А.Ш. Кавтарашвили, В.М. Коденцова, В.К. Мазо **206**

БИОТЕХНОЛОГИЯ СУБЛИМИРОВАННЫХ БИОПРОДУКТОВ С МЕТАБИОТИКАМИ ДЛЯ СПОРТИВНОГО ПИТАНИЯ
С.И. Артюхова **208**

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ДОБАВКИ «ГЕЛЕОН-200М» ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ПОЛУКОПЧЕНОЙ КОЛБАСЫ
Е.П. Мирошникова, Ю.С. Кичко, М.В. Клычкова, М.Д. Романко **213**

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ РЕГУЛИРОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ПРОИЗВОДСТВА, ПОТРЕБИТЕЛЬСКИХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ХЛЕБОБУЛОЧНЫХ ИЗДЕЛИЙ
Н.Н. Корнен[1,2], С.А. Калманович[1], О.Л. Вершинина[1], Т.А. Шахрай[2] **218**

РАЗРАБОТКА РЕЖИМОВ ПОСОЛА КУРИНЫХ СНЭКОВ
Н.Н. Галатюк, А.С. Насирова **220**

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ НАЦИОНАЛЬНОГО КАЛЬЦИЙСОДЕРЖАЩЕГО КИСЛОМОЛОЧНОГО ПРОДУКТА КОРОТ (КОРТ, КУРТ, КУРУТ) ДЛЯ НОРМАЛИЗАЦИИ КАЛЬЦИЕВОГО ОБМЕНА
Ж.К. Шоманова, З.М. Хасанова, Л.А. Хасанова, Т.К. Шоманова, А.С. Муканова, А.К. Шарипова, Р.Р. Хафизова **222**

ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТЬ ХОЗЯЙСТВЕННОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СОРНЫХ РАСТЕНИЙ
Н.Е. Тарасовская[1,2], Б.Ж. Баймурзина[1,2], Л.А. Хасанова[2], З.М. Хасанова[2] **223**

БИОТЕХНОЛОГИЯ КИСЛОМОЛОЧНОГО ПЛАВЛЕНОГО СЫРА С МЕТАБИОТИКАМИ
О.В. Козлова[1], С.И. Артюхова[2] **225**

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА КОЛБАСНЫХ ИЗДЕЛИЙ
И.С. Косенко **229**

СОПОСТАВИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПЛОДОВ *СМОРОДИНЫ ЧЁРНОЙ* РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ С ВЫСОКОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТЬЮ
Л.А. Хасанова[1], Г.Ш. Казыханова[1,2], И.В. Такиуллина[1], И.З. Галикеева[1], Д.В. Гарифуллина[2], Р.С. Кираев[2], З.М. Хасанова[1] **230**

СТИМУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ СВЧ ИЗЛУЧЕНИЯ В ПРОЦЕССАХ БИОТРАНСФОРМАЦИИ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТЧАТКИ
Т.Н. Данильчук, И.Г. Кончаков **231**

ОЦЕНКА РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ИЗ *КИПРЕЯ УЗКОЛИСТНОГО* ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ЧАЕВ, ЧАЙНЫХ НАПИТКОВ И НАПИТКОВ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО НАЗНАЧЕНИЯ НА ЕГО ОСНОВЕ
Р.И. Якупова[1], Л.А. Хасанова[1], Г.Ш. Казыханова[1,2], Д.В. Гарифуллина[2], Р.С. Кираев[2], З.М. Хасанова[2] **234**

ПЕРЕРАБОТКА ОТХОДОВ ВОДНЫХ БИОРЕСУРСОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ БИОТЕХНОЛОГИИ
Н.Г. Строкова, Н.Ю. Зарубин, О.В. Бредихина **235**

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭКСТРАКТОВ ХВОИ *PICEA ABIES* НА РАННИЕ ЭТАПЫ ОНТОГЕНЕЗА РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ *LINUM USITATISSIMUM*
Е.В. Ожимкова[1], А.И. Сидоров[1], Е.М. Короткова[2] **239**

ВЛИЯНИЕ АДЬЮВАНТОВ НА ПАТОГЕННОСТЬ CALOPHOMA COMPLANATA ДЛЯ БОРЩЕВИКА СОСНОВСКОГО
Е.Л. Гасич, Л.Б. Хлопунова, А.О. Берестецкий **241**

КАЧЕСТВЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЗЕРНОВЫХ ЗАТОРОВ, ОСАХАРЕННЫХ ФЕРМЕНТАМИ ГЛУБИННОЙ КУЛЬТУРЫ И СОЛОДА
М.Б. Хоконова, О.К. Цагоева **244**

ОБОГАЩЕНИЕ ХЛЕБА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ КОМПОНЕНТАМИ МИКРОВОДОРОСЛИ
Т.Н. Тертычная[1], Л.И. Лыткина[2], Д.В. Коптев[2] **249**

НОВЫЕ ВИДЫ ОБОЛОЧЕК В КОЛБАСНОМ ПРОИЗВОДСТВЕ
Е.П. Мирошникова, М.В. Клычкова, Ю.С. Кичко, М.Д. Романко **250**

КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ХИТИНАЗЫ 19 СЕМЕЙСТВА ИЗ *D.CAPENSIS*
И.Г. Синельников **253**

О ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ УЛЬТРАЗВУКА ДЛЯ ИНТЕНСИФИКАЦИИ ПРОЦЕССА ВЫДЕЛЕНИЯ ЖИРА ИЗ ГОЛОВ ТИХООКЕАНСКИХ ЛОСОСЕВЫХ РЫБ
А.Г. Артемова, О.В. Бредихина, Р.В. Артемов, Ю.А. Баскакова **254**

ЭФФЕКТИВНОСТЬ НОВОГО ОРГАНО-МИНЕРАЛЬНОГО УДОБРЕНИЯ «АРКСОЙЛ» НА ПОСЕВАХ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ
М.Г. Жариков[1], Р.Ю. Салпагаров[1], В.П. Грунская[2] **258**

ИНФОРМАЦИОННО-ПАТЕНТНЫЕ АСПЕКТЫ ПРОДОВОЛЬСТВЕННОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ПРОДУЦИИ АКВАКЛЬТУРЫ
Е.А. Зюзина **264**

БЕЛКОВАЯ КОРМОВАЯ ДОБАВКА В КОМБИКОРМАХ ДЛЯ ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ
И.П. Салеева[1], В.С. Лукашенко[1], Е.В. Журавчук[1], Е.А. Овсейчик[1], В.Г. Волик[2], Д.Ю. Исмаилова[2] **267**

ПРОБИОТИК ПРОТИВ СМЕШАННОЙ КИШЕЧНОЙ ИНФЕКЦИИ МОЛОДНЯКА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ
Н.Н. Гаврилова, А.К. Саданов, Г.К. Таубекова, И.А. Ратникова, Ж.Е. Сагидолдина **268**

ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ КОНЦЕНТРАТОВ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ, ОБОГАЩЕННЫХ ЭССЕНЦИАЛЬНЫМИ МИКРО- И МАКРОЭЛЕМЕНТАМИ
А.В. Щёкотова, И.С. Хамагаева, М.С. Аюшеева, С.Н. Хазагаева, А.А. Дёмина **271**

ПРИМЕНЕНИЕ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ АГАРА ИЗ КРАСНЫХ ВОДОРОСЛЕЙ РОДА *AHNFELTIA*
Н.В. Бурова, А.В. Подкорытова **273**

НОВЫЕ РЕЦЕПТУРЫ ПРЯНИКОВ ДИАБЕТИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ
Т.Н. Тертычная[1], И.В. Мажулина[1], С.В. Калашникова[1], С.Ф. Яковлева[2] **274**

РАЗРАБОТКА НАПИТКОВ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО НАЗНАЧЕНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМПЛЕКСА L-КАРНИТИНА И ВИТАМИНА Е
Г.А. Аюпова[1,2], Л.А. Хасанова[1], Р.Ф. Ахметов[2], З.М. Хасанова[1] **275**

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ ЛИНИИ ПЕРЕРАБОТКИ СЕМЯН МАСЛИЧНЫХ КУЛЬТУР В БИОДИЗЕЛЬНОЕ ТОПЛИВО
А.А. Шевцов[1], Т.Н. Тертычная[2], В.В. Ткач[3], Н.А. Сердюкова[3] **276**

НАУЧНЫЕ ПОДХОДЫ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ – ВАЖНЫЙ ШАГ В ВЫПОЛНЕНИИ ФЕДЕРАЛЬНОГО ПРОЕКТА «УКРЕПЛЕНИЕ ОБЩЕСТВЕННОГО ЗДОРОВЬЯ»
В.И. Ганина **277**

ДИГИДРОКВЕРЦЕТИН И АРАБИНОГАЛАКТАН – ПРИРОДНЫЕ БИОРЕГУЛЯТОРЫ, ПРИМЕНЕНИЕ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ И ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ
Ю.П. Фомичев, Л.А. Никанова **279**

ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕРЕРАБОТКИ ЖИРОСОДЕРЖАЩЕГО ШЛАМА С ПОМОЩЬЮ ВЕРМИКОМПОСТИРОВАНИЯ
Я.А. Масютин, М.С. Кожикин **284**

ВЛИЯНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА РОСТОВЫЕ ПРОЦЕССЫ ЯЧМЕНЯ
А.В. Платонов[1], И.И. Рассохина[1], Д.Н. Коткова[1], Л.В. Сухарева[1], В.Н. Большаков[2] **287**

ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МАКРОБИОТИЧЕСКИХ ПРОДУКТОВ «ДИАХИТ» И «ОПТИМАЛ ВЕС»
Н.А. Кленова, Н.Ю. Орлова[1], Е.А. Повереннова[2] **289**

ИЗУЧЕНИЕ ПОПУЛЯЦИЙ ЛИПЫ МЕЛКОЛИСТВЕННОЙ TILIA CORDATA MILL. В РЕСПУБЛИКЕ БАШКОРТОСТАН, ПОИСК, ГЕНОТИПИРОВАНИЕ, РАЗМНОЖЕНИЕ IN VITRO ЛИП С ПОВЫШЕННОЙ ПРОДУКЦИЕЙ НЕКТАРА.
Р.Г. Фархутдинов, Б.Р. Кулуев, Р.Р. Хисамов[1], В.Г. Корюгина, Р.Р. Хисамова **293**

КОЛИЧЕСТВО АУКСИНОВ В РИЗОСФЕРЕ ЯЧМЕНЯ В УСЛОВИЯХ КОНКУРЕНТНЫХ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ *FUSARIUM CULMORUM* И *PSEUDOMONAS FLUORESCENS*
А.И. Шапошников, Н.А. Вишневская, О.К. Струнникова **295**

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА МЯСНЫХ ПРОДУКТОВ ИЗ НИЗКОСОРТНОГО СЫРЬЯ
А.В. Зыкова, А.Н. Кирилюк, А.М. Патиева, С.В. Патиева, А.А. Тоншев **297**

ХАРАКТЕРИСТИКА МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЛОШАДЕЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ И ПУПОВИННОЙ КРОВИ
С.А. Васильева, Д.Г. Коровина, Е.В. Викторова, И.П. Савченкова **298**

ПЕРСПЕКТИВЫ РЕАЛИЗАЦИИ ПРИНЦИПОВ НАИЛУЧШИХ ДОСТУПНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ НА ПРИМЕРЕ ГЛУБОКОЙ ПЕРЕРАБОТКИ ВТОРИЧНОГО МОЛОЧНОГО СЫРЬЯ
А.Г. Храмцов, В.А. Диняков, А.Д. Лодыгин, С.С. Школа **300**

БИОЛОГИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ ПРОИЗВОДСТВА МАЙОНЕЗА
Э.И. Рахимова, А.С. Сироткин, Э.Э. Саитова **302**

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА ЭМБИОТА НА РОСТ И РАЗВИТИЕ МИКРОЧЕРЕНКОВ КАРТОФЕЛЯ *IN VITRO*
Г.В. Филиппова, В.Г. Дарханова, Н.С. Строева **305**

ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ КОМПЛЕКСНЫХ КОРМОВЫХ КОНЦЕНТРАТОВ
М.В. Лукьяненко, Р.В. Казарян, А.С. Бородихин, А.А. Фабрицкая **307**

НОВЫЕ ТВОРОЖНО-РАСТИТЕЛЬНЫЕ ПРОДУКТЫ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО НАЗНАЧЕНИЯ
Е.А. Пожидаева, Е.С. Попов **310**

КРИОБАНКИ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ: СОЗДАНИЕ, НАЗНАЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
Н.А. Волкова, Н.А. Зиновьева, В.А. Багиров **311**

ЭМУЛЬГИРУЮЩИЕ СВОЙСТА ПРОБИОТИЧЕСКИХ СИСТЕМ, ОБОГАЩЕННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫМИ БИОКОРРЕКТОРАМИ
Н.С. Родионова, Е.С. Попов, Н.А. Родионова **313**

ЭФФЕКТИВНОСТЬ РИЗОСФЕРНЫХ БАКТЕРИЙ ПРИ КОИНОКУЛЯЦИИ МИКРОКЛОНОВ КАРТОФЕЛЯ IN VITRO
О.В. Ткаченко[1], К.Ю. Каргаполова[1], Г.Л. Бурыгин[1,2], Н.В. Евсеева[2], Е.Е. Костина[1], А.Ю. Денисова[1], М.А. Григорян[1] **314**

ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ПРЕПАРАТ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ СОСУДИСТОГО БАКТЕРИОЗА КРЕСТОЦВЕТНЫХ МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА
М.А. Кузнецов, А.А. Щербаков, С.В. Савина, В.М. Скорляков, С.В. Иващенко, В.С. Муртаева **315**

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО МАРМЕЛАДА, СОДЕРЖАЩЕГО БАВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ
В.А. Доценко, Д.А. Алиева **317**

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ НАПИТКИ НА ОСНОВЕ НАТУРАЛЬНОГО МЁДА И ПИЩЕВОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ
Л.А. Хасанова, З.М. Хасанова, В.Н. Саттаров, Г.А. Аюпова, Р.И. Якупова, И.В. Такиуллина, И.З. Галикеева, Г.М. Гареева, Г.Р. Рахимова, З.З. Назарова, А.З. Амакасова, Р.Т. Ахметьянов, Г.Т. Ахметьянова, Т.А. Кущ, З.Н. Сулейманова, Л.А. Сулейманова, З.Ю. Ибрагимова, Н.В. Калинина, З.Н. Кашапова, Э.М. Ялазюк, А.М. Давлетшина, А.А. Ахлякова, Р.Р. Даукаева, Э.Ю. Страхова, И.М. Гумеров **318**

БИОКОНТРОЛЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БОЛЕЗНЕЙ РАСТЕНИЙ С ПОМОЩЬЮ БАКТЕРИОФАГОВ
К.А. Мирошников[1], А.П. Кабанова[1], М.М. Шнейдер[1], Д.М. Васильев[2], А.Н. Игнатов[2] **320**

ПЕКТИН КАК ПРИРОДНЫЙ БИОПОЛИМЕР В СОСТАВЕ ФРУКТОВО-ОВОЩНЫХ НАПИТКОВ
Ш.Г. Алиев **320**

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПИЩЕВЫЕ ИНГРЕДИЕНТЫ АДАПТОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ И ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ
В.А. Шипелин, Ю.С. Сидорова, В.К. Мазо **322**

МЕТОДЫ БИОТЕХНОЛОГИИ В ПРОИЗВОДСТВЕ ПИТЬЕВОГО КИСЕЛЯ ОБОГАЩЕННОГО БЕЛКОМ АМАРАНТА
О.Н. Ожерельева, М.М. Данылив **324**

ПОЛУЧЕНИЕ ГИБРИДОВ ДОМАШНИХ ОВЕЦ С ДИКИМИ РОДСТВЕННЫМИ ВИДАМИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В СЕЛЕКЦИИ
А.Н. Ветох, Б.С. Иолчиев, Н.А. Волкова, В.А. Багиров **325**

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ПЛОДОВО-ЯГОДНОГО СЫРЬЯ И ПРОДУКЦИИ ИЗ НЕГО
Н.К. Романова, С.В. Китаевская **326**

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЙ В СОЗДАНИИ НОВЫХ СОРТОВ ЧЕЧЕВИЦЫ
Г.Н. Суворова **327**

ПОЛУЧЕНИЕ КАРОТИНСОДЕРЖАЩИХ ПИЩЕВЫХ ДОБАВОК ДЛЯ ОБОГАЩЕНИЯ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ
А.В. Черкасова[1], Л.П. Бессонова[2], Л.В. Антипова[1] **328**

ОЦЕНКА РИБОНУКЛЕАЗНОЙ АКТИВНОСТИ КОЛЛЕКЦИИ ЭНДОФИТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ
Е.Р. Сарварова, Е.А. Черепанова, Р.М. Хайруллин, И.В. Максимов **329**

КЛОНИРОВАНИЕ И ГОМОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *BGL1*, КОДИРУЮЩЕГО В-ГЛЮКОЗИДАЗУ *PENICILLIUM VERRUCULOSUM*, ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НОВОГО ФЕРМЕНТА
П.В. Волков, А.М. Рожкова, А.П. Синицын **330**

ПРИМЕНЕНИЕ ЗАЩИТНЫХ КУЛЬТУР ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ СМЕТАННЫХ ПРОДУКТОВ
О.И. Долматова, В.С. Крикунова **331**

ФОРМИРОВАНИЕ ВЫСОКОТЕХНОЛОГИЧНОЙ ЭФИРОМАСЛИЧНОЙ ОТРАСЛИ В АГРОПРОМЫШЛЕННОМ КОМПЛЕКСЕ РЕСПУБЛИКИ КРЫМ
В.С. Паштецкий[1], Н.В. Невкрытая[1], В.С. Власова[1,2], Л.А. Хасанова[2], З.М. Хасанова[2] **332**

БИОТЕХНОЛОГИЯ ТВОРОЖНОГО ПРОДУКТА С ПРОЛОНГИРОВАННЫМИ СРОКАМИ ГОДНОСТИ
О.И. Долматова, О.В. Викторова **334**

РАЗРАБОТКА НАПИТКОВ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО НАЗНАЧЕНИЯ НА ОСНОВЕ ЯБЛОЧНОГО СЫРЬЯ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН
Л.А. Хасанова[1], З.М. Хасанова[1], А.Р. Саттаров[1], С.А. Хасанов[1], К.И. Насыкова[1], Р.А. Шафиков[2], И.О. Чанышев[2] **335**

ВЛИЯНИЕ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО НА СКОРОСТЬ ДЫХАНИЯ МИТОХОНДРИЙ ЛЕТАТЕЛЬНЫХ МЫШЦ ШМЕЛЕЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ ПЕСТИЦИДОВ IN VITRO
Сыромятников М.Ю.[1], Попов В.Н.[1,2] **335**

РАЗРАБОТКА РАНЕВОГО ПОКРЫТИЯ НА ОСНОВЕ РАСТВОРИМОЙ ФОРМЫ КОМПОНЕНТОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА
Р.Д. Мустафина[1], И.Р. Гильмутдинова[2], П.С. Еремин[2] **338**

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ CA-125 И MISRII – ПОВЕРХНОСТНЫХ МАРКЕРОВ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЯИЧНИКОВ
А.Я. Рак, А.В. Трофимов, А.М. Ищенко **341**

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ НА РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК
М.В. Улитко[1,2], Т.Р. Султанова[1], Р.А. Вазиров[1], С.Ю. Соковнин[1,3], В.Г. Ильвес[3] **342**

ОСОБЕННОСТИ ФОРМОВОЧНОГО РАСТВОРА БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ ПОЛИМЕРОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ СИСТЕМ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ
А.В. Черкас[1,2], Е.Б. Аронова[1], Е.Н. Бражникова[2] **346**

ДИНАМИКИ УДАЛЕНИЯ ВОДЫ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СБОРА ЖЕЛЧЕГОННОГО ДЕЙСТВИЯ ПРИ ИНФРАКРАСНОМ ОБЛУЧЕНИИ ПРИ 105° С
В.Н. Зеленков[1,2], А.А. Лапин[3], Е.В. Ферубко[1], Т.Д. Даргаева[1] **348**

ПОВЫШЕНИЕ АКТИВНОСТИ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА ПУТЕМ ПРОВЕДЕНИЯ ИНДУЦИРОВАННОГО УФ-МУТАГЕНЕЗА
А.Х. Хасенова[1], М.А. Акылова[2], З.Ж. Турлыбаева[1], Р.Ш. Галимбаева[1], А.Ж. Султанова[1] **352**

ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРЫС ЛИНИИ ВИСТАР В УСЛОВИЯХ ПОСТОЯННОГО ОСВЕЩЕНИЯ
В.С. Каплан, А.А. Грицюнайте, К.А. Сахнова, Е.А. Шмигельский, Л.С. Макарцева, С.А. Кучер, Д.А. Арешидзе **353**

БИОСИНТЕЗ ПОЛИГИДРОКСИБУТИРАТА НА ГЛИЦЕРИНЕ DELFTIA SP. LP-1
Е.Н. Капаруллина, Н.В. Агафонова, Н.В. Доронина **357**

ОСОБЕННОСТИ РЕГИСТРАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ ОТВЕТОВ БИООБЪЕКТОВ В ПРИСУТСТВИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
О.М. Алексеева[1], А.В. Кременцова[1], О.В. Шаталова[1], Ю.А. Ким[2] **360**

ИСПЫТАНИЕ НА ПРИСУТСТВИЕ МИКОПЛАЗМ МЕТОДОМ ИНДИКАТОРНОЙ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ
Н.С. Куцерубова, М.П. Богрянцева, С.В. Усова, И.Ф. Радаева, Е.А. Нечаева **365**

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИНГИБИТОРОВ PHASEOLUS VULGARIS
В.А. Сильченко, Е.А. Прутенская, Л.А. Зайцева **367**

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ПРОГНОЗИРОВАНИЮ ПОВЫШЕНИЯ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ОРГАНИЗМА К ТЯЖЕЛЫМ ГИПОКСИЧЕСКИМ / ИШЕМИЧЕСКИМ НАГРУЗКАМ
Е.И. Захарова[1], З.И. Сторожева[2], М.Ю. Монаков[1], А.М. Дудченко[1] **369**

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РНК-ШАПЕРОНА PROQ ИЗ ESCHERICHIA COLI И ЕГО ДОМЕНОВ С МАЛОЙ РЕГУЛЯТОРНОЙ РНК 3’ETS(LEUZ)
Н.В. Леконцева, А.О. Михайлина, А.Д. Никулин **373**

НОВЫЙ МЕТОД ТЕРМИЧЕСКОЙ ДИССОЦИАЦИИ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ СЕЛЕКЦИИ ДНК-АПТАМЕРОВ
С.А. Лапа, Э.Н. Тимофеев, Г.С. Краснов, А.В. Чудинов **375**

ВЛИЯНИЕ ЭРИТРОМИЦИНА НА ВИДОВОЙ СОСТАВ БИОЦЕНОЗА АКТИВНОГО ИЛА
З.Е. Мащенко, В.В. Бахарев **377**

УРОВЕНЬ ЖЕЛЧНЫХ КИСЛОТ ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ПАТОЛОГИИ ПЕЧЕНИ
А.Х. Кодиров, Н.Ю. Самандаров, Х.С. Рахимова, Г.З. Пиров, Н.Б. Бораджабова **380**

СВЕРХРАННИЕ БЕЛКИ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСА УЧАСТВУЮТ В УСТАНОВЛЕНИИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ПРОТИВООПУХОЛЕВОМУ АНТИБИОТИКУ ДОКСОРУБИЦИНУ ИНФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК ЛЕЙКЕМИИ THP-1
Я.Ю. Чернорыж, К.И. Юрлов, Р.А. Симонов, Н.Е. Федорова, А.А. Кущ **385**

ПОКАЗАТЕЛИ СУММАРНОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ РАСТИТЕЛЬНОГО СБОРА ЖЕЛЧЕГОННОГО ДЕЙСТВИЯ ПРИ ТЕРМОДЕГИДРАТАЦИИ ПРИ 105° С
В.Н. Зеленков[1,2], А.А. Лапин[3], Е.В. Ферубко[1], Т.Д. Даргаева[1] **389**

ВЛИЯНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ НА СОСТАВ МИКРОБИОТЫ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА
Л.В. Мацкова[1], Д.С. Кацеров[1], Е.С. Нерубенко[1], И.С. Алумянц[1], И.М. Титова[2] **390**

ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ДИБЕНЗО[B, D] ПИРАН-6-ОНА НА МОДЕЛИ СТРЕПТОЗОТОЦИН ИНДУЦИРОВАННОГО ДИАБЕТА У КРЫС
Н.И. Кащенко[1], И.В. Свиридов[1], Т.Г. Горностай[2] **392**

ДИАГНОСТИКА РАКА ТОЛСТОЙ КИШКИ НА ОСНОВЕ ЦЕЛОСТНОСТИ МОЛЕКУЛ ДНК
Г.М. Бутрович, Е.Д. Мирлина, О.А. Вострюхина **395**

ЛИПОСОМАЛЬНЫЙ ПРЕПАРАТ, СОДЕРЖАЩИЙ ДВЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СУБСТАНЦИИ КАРНОЗИН И ЛИПОЕВУЮ КИСЛОТУ: ПОЛУЧЕНИЕ И ВЛИЯНИЕ НА АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ
В.А. Щелконогов[1,2,3], Б.Т. Адулждаббар[1], Е.С. Дарнотук[1], Г.М. Сорокоумова[1], Н.С. Шастина[1], О.А. Баранова[2], А.В. Чеканов[2], К.Д. Казаринов[3], В.П. Мудров[4], Э.Ю. Соловьева[2], А.И. Федин[2] **397**

АНАЛИЗ АНТИМИКРОБНОЙ И ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ ИОННОЕ СЕРЕБРО ИЛИ НАНОЧАСТИЦЫ СЕРЕБРА
Е.В. Владимирова[1], Д.С. Орлов[2], Н.Ю. Ульянова[3], О.Б. Иванченко[1] **398**

РАЗРАБОТКА КАПСУЛЯРНОЙ ФОРМЫ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ
Э.В. Сынгеева, Н.Д. Ипатова, А.А. Толмачева, С.Д. Жамсаранова **401**

ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ СВОЙСТВА ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ РОДА BACILLUS
С.А. Лазарев, Н.А. Михайлова **404**

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ВВЕДЕНИИ РЕКОМБИНАНТНОЙ ВАКЦИНЫ СИНЕГНОЙНОЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ЖИВОТНЫМ
Е.О. Калиниченко, А.В. Солдатенкова, Е.М. Зимина, С.А. Лазарев, А.А. Калошин, А.А. Поддубиков, Н.К. Ахматова, Н.А. Михайлова **407**

ТВЕРДОФАЗНЫЕ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЕ ТЕСТ-СИТЕМЫ В МОНИТОРИНГЕ ГЛАЗНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ
Б.Р. Назмутдинов[1,2], Л.А. Хасанова[1], Н.Н. Курчатова[2], З.М. Хасанова[1] **408**

МОДЕРНИЗАЦИЯ И ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОИЗВОДСТВА ЛАКТОГЛОБУЛИНА ПРОТИВ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ И САЛЬМОНЕЛЛ
Г.С. Алешукин, А.В. Алешукина, К.Г. Маркова **409**

РЕКОМБИНАНТНЫЕ АНТИГЕНЫ PSEUDOMONAS AERUGINOSA: ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ
А.А. Калошин, Е.М. Зимина, Н.А. Михайлова **410**

СИНЕГНОЙНАЯ ИНФЕКЦИЯ – СОВРЕМЕННЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИММУНОПРОФИЛАКТИКИ
Н.А. Михайлова, А.А. Калошин, Е.М. Зимина, А.В. Солдатенкова, Е.О. Калиниченко **411**

РЕЗИСТЕНТНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ КАК ОДНА ИЗ КЛЮЧЕВЫХ ПРОБЛЕМ МЕДИЦИНЫ, ВЕТЕРИНАРИИ, БИОТЕХНОЛОГИИ
А.Ю. Искусных[1], Д.О. Искусных[2] **412**

НОВЫЕ КОМПОЗИЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ГЕЛЕЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ С АНТИБИОТИЧЕСКИМИ И БИОСТИМУЛИРУЮЩИМИ СВОЙСТВАМИ
Н.А. Кленова, З.П. Белоусова, Т.И. Васильева, Д.А. Евдокименко, И.С. Мажанова, В.С. Соболева, Т.В. Шарова **414**

БЫСТРЫЕ УРЕАЗНЫЕ ТЕСТЫ – НАДЕЖНЫЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИИ HELICOBACTER PYLORI
Е.Б. Аронова[1], Ю.Г. Базарнова[1], М.А. Дмитриенко[2] **418**

ЖИЗНЕСПОСОБНЫЕ НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫЕ КЛЕТКИ МИКРООРГАНИЗМОВ И ИХ ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ
Л.П. Блинкова[1], А.М. Абдуллаева[2], Ю.Д. Пахомов[1], М.Л. Альтшулер[1], Т.А. Першина[2] **421**

ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЕ КАК НОВЫЙ СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
В.Б. Огай, А.Е. Секенова **423**

ЛЕКТИНЫ РАСТЕНИЙ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ РЕЦЕПТОРОВ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА
О.Л. Канделинская[1], Е.Р. Грищенко[1], М.В. Шолух[2], Е.В. Бондарюк[2], Т.В. Шман[3], Е.П. Вашкевич[3], Т.И. Ермилова[3] **425**

ВЛИЯНИЕ МОНО- И ОЛИГОСАХАРИДОВ VALERIANA OFFICINALIS L. НА МИКРОФЛОРУ КИШЕЧНИКА
А.И. Сидоров[1], Л.Е. Смирнова[2], Е.В. Ожимкова[1], В.М. Червинец[2], В.П. Молчанов[1] **426**

ВЛИЯНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ НА ПРОЦЕССЫ ОБУЧЕНИЯ И ПАМЯТИ
Н.А. Ломтева, Е.И. Кондратенко, С.К. Касимова **428**

БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ НЕРИБОСОМАЛЬНЫХ ПЕПТИДНЫХ АНТИБИОТИКОВ ГРИБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ
Е.А. Рогожин[1,2,3], В.С. Садыкова[4], И.А. Гаврюшина[4], Р.А. Габрия[4], А.Е. Куварина[4], А.С. Барашкова[1], М.Л. Георгиева[2,4] **430**

ЭКДИСТЕРОН: ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ЭФФЕКТ
О.Ю. Шувалов, А.В. Петухов, О.А. Федорова, А.А. Дакс, Н.А. Барлев **432**

КАПСУЛЫ НА ОСНОВЕ ЭМУЛЬСИЙ ПИКЕРИНГА И ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ СЛОЕВ
Т.В. Букреева, К.В. Паламарчук **433**

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СОКА ЛИМОНА НА ВЫДЕЛЕНИЕ АКТИНОМИЦЕТОВ РЕДКИХ РОДОВ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ АНТИБИОТИКОВ
О.Н. Синёва, Л.П. Терехова **434**

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭНДОЛИЗОСОМАЛЬНОЙ ДЕГРАДАЦИИ РЕКОМБИНАНТНОГО АЛЛЕРГЕНА ЧЕЧЕВИЦЫ LEN C3
Е.И. Финкина[1], И.В. Богданов[1], Н.Н. Строкач[2], Т.В. Овчинникова[1,2] **436**

ПОЛУЧЕНИЕ ПРОТИВОГРИБКОВОГО ПОЛИЕНОВОГО АНТИБИОТИКА РОЗЕОФУНГИНА В ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ
А.К. Саданов, А.С. Балгимбаева, Л.Н. Ибрагимова, Л.П. Треножникова, Г.Е. Тугелбай, З.Ж. Турлыбаева, А.Ж. Султанова, Р.Ш. Галимбаева, М. Есиркепулы, В.Э. Березин, И.Р. Кулмагамбетов **437**

ПОЛУЧЕНИЕ АНАЛОГОВ КОСТНОГО МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОГО БЕЛКА-2 ЧЕЛОВЕКА С КОЛЛАГЕН-СВЯЗЫВАЮЩИМИ ДОМЕНАМИ
Д.Д. Лыкошин, М.Н. Терешин, Р.С. Есипов **438**

LATE MORBIDITIES OF ANTI-CANCER THERAPY: DOES DNA MATTER?
Alexander Maslov **438**

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ПРОТИВОМИКРОБНЫХ АГЕНТОВ МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКИ HIRUDO MEDICINALIS
Е.Н. Графская, К.Д. Надеждин, Е.Р. Павлова, П.В. Башкиров, В.Н. Лазарев **439**

ФАКТОРЫ БИОДЕГРАДАЦИИ БЕЛОГО ФОСФОРА
А.З. Миндубаев[1], Э.В. Бабынин[2], А.Д. Волошина[1], С.Т. Минзанова[1], Л.Г. Миронова[1], Е.К. Бадеева[1] **441**

БИОГЕОТЕХНОЛОГИЯ ПЕРЕРАБОТКИ ТЕХНОГЕННЫХ ОТХОДОВ АО «АЛМАЛЫКСКИЙ ГОРНО-МЕТАЛЛУРГИЧЕСКИЙ КОМБИНАТ» РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН
[1] М.Г. Сагдиева, [2] Д.Я. Мирталипов, [2] З.Г. Сагдиева, [2] З.В. Калиниченко..... **446**

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА ПЕРЕРАБОТКИ КОММУНАЛЬНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ В АНАЭРОБНОМ БИОРЕАКТОРЕ С ЭЛЕКТРОФИЗИЧЕСКИМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ НА МЕТАНОГЕННОЕ МИКРОБНОЕ СООБЩЕСТВО
Ю.В. Литти*, Д.А. Ковалев, А.А. Ковалев**, Ю.И. Русскова *, А.Н. Ножевникова*** **450**

БИОАККУМУЛЯЦИЯ ХИМИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ ЦИАНОБАКТЕРИЯМИ В ГИДРОТЕРМАЛЬНЫХ ИСТОЧНИКАХ КАМЧАТКИ И СОЗДАНИЕ ПРИРОДОПОДОБНОЙ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ НАНОРАЗМЕРНОГО КРЕМНЕЗЕМА ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ
В.Н. Зеленков[1,2], В.В. Потапов[3] **456**

ОЦЕНКА УРОВНЯ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВ ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИМИ АРОМАТИЧЕСКИМИ УГЛЕВОДОРОДАМИ В РАЙОНЕ БЫВШЕГО ШЛАМОНАКОПИТЕЛЯ ВБЛИЗИ РЕКИ СЕВЕРСКИЙ ДОНЕЦ
Т.С. Дудникова, С.Н. Сушкова, Т.М. Минкина, Е.М. Антоненко, Д.Г. Невидомская, А.И. Барбашев, И.П. Лобзенко, И.Г. Шпортун, Н.А. Дорохова..... **460**

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АППАРАТА ВИХРЕВОГО СЛОЯ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТАНОВОГО СБРАЖИВАНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ
Ю.В. Литти*, Д.А. Ковалев, А.А. Ковалев**, И.В. Катраева***, А.Н. Ножевникова*** **465**

ВОЗДЕЙСТВИЕ ТИОНОВЫХ И НИТРИФИЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ НА МЕТАЛЛИЧЕСКИЕ МОДЕЛЬНЫЕ ПЛАСТИНЫ
М.С. Петрова[1], Г.Г. Няникова[1], М.А. Майорова[2]..... **470**

ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ В СИЛИКАГЕЛИ ЖИВЫЕ КЛЕТКИ: МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОЛУЧЕНИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ
О.Н. Понаморева, В.А. Алферов..... **472**

РАЗРАБОТКА БИОСЕНСОРНОГО АНАЛИЗАТОРА ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА
В.А. Алферов, В.А. Арляпов, Н.Ю. Юдина, М.Г. Зайцев..... **480**

БАКТЕРИАЛЬНАЯ АССОЦИАЦИЯ – ДЕСТРУКТОР СТОЙКИХ ОРГАНИЧЕСКИХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ (ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ)
Д.О. Егорова[1,2], Е.А. Шестакова[1], А.А. Пьянкова[1], Т.Д. Кирьянова[2], Л.Н. Ананьина[1] **484**

ВЛИЯНИЕ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ СФАГНОВОГО ПЕРЕХОДНОГО ТОРФА НА РОСТ ШТАММА-НЕФТЕДЕСТРУКТОРА RHODOCOCCUS SP. X5 ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
Е.В. Акатова, Ю.А. Пронькина, К.Р. Семенова, М.М. Герцен, Е.Д. Дмитриева **487**

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ДАННЫЕ ПО СОДЕРЖАНИЮ МИКРОЯДЕР В ЭРИТРОЦИТАРНЫХ КЛЕТКАХ ПРУДОВЫХ ЛЯГУШЕК, ОБИТАЮЩИХ В ЗАГРЯЗНЕННОЙ ВОДНОЙ СРЕДЕ
Е.Б. Романова, Е.С. Рябинина **490**

ИММОБИЛИЗАЦИЯ БАКТЕРИЙ PARACOCCUS YEEI, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ АКТИВНОГО ИЛА, В ОРГАНОСИЛИКАТНЫЕ МАТРИЦЫ
О.А. Каманина, Е.А. Ланцова, М.С. Тимошина **495**

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИМЕРНОЙ МАТРИЦЫ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ БИОАНОДОВ ТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ
С.В. Алферов, Н.А. Клименова **497**

FORMS OF CADMIUM COMPOUNDS IN SOILS CONTAMINATED BY EMISSIONS FROM NOVOCHERKASSK POWER STATION
V.A. Chaplygin, T.M. Minkina, S.S. Mandzhieva, S.N. Sushkova, T.S. Dudnikova, T.V. Bauer, I.V. Zamulina, N.P. Chernikova, D.V. Bren, I.P. Lobzenko **500**

СТРАТЕГИЯ РАЗРАБОТКИ БИОМАТЕРИАЛОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЭЛЕКТРОДОВ
Н.В. Лакина, В.Ю. Долуда, В.Г. Матвеева, Э.М. Сульман **504**

НУТРИЕНТНЫЙ СОСТАВ И БЕЗОПАСНОСТЬ МЯСНОЙ ПРОДУКЦИИ ОТ БЫЧКОВ РАЗНЫХ ПОРОД ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ ИХ СОДЕРЖАНИЯ
Х.Х. Тагиров, Р.С. Исхаков, Л.А. Зубаирова, А.А. Ламанов **507**

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ РЕШЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ВОДНОЙ ВЫТЯЖКИ ИЗ КОРЫ ПРИ ПЕРЕРАБОТКЕ ДРЕВЕСИНЫ В АГРОПРОМЫШЛЕННОМ СЕКТОРЕ
А.Б. Дягилева, С.Б. Михайлова, А.И. Смирнова **509**

НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫЕ РЕАГЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ В ПРОЦЕССАХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД
Й.В. Кобелева, Н.Н. Шургалина, Л.М. Газизулина, О.О. Гурьянова, А.С. Сироткин, Т.В. Вдовина **513**

БИОСУРФАКТАНТЫ, СИНТЕЗИРУЕМЫЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ-НЕФТЕДЕСТРУКТОРАМИ: СОСТАВ, СВОЙСТВА И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
Л.А. Беловежец[1], М.С. Третьякова[2], Б.А. Маркова[2], Л.П.Ознобихина[1] **514**

БИОЛОГИЧЕСКИЙ СПОСОБ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПЛОДОРОДИЯ ДЕГРАДИРОВАННЫХ ПОЧВ
А.К. Саданов, И.Э. Смирнова, Э.Р. Файзулина, Л.Г. Татаркина **517**

МИКРОБИОЦЕНОЗ СТОЧНЫХ ВОД
В.Б. Сбойчаков, О.В. Решетникова, А.А. Ганичева **521**

ВЫЗВАННАЯ АНТИОКСИДАНТОМ СТИМУЛЯЦИЯ РОСТА РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА МИНЕРАЛЬНОГО ПИТАНИЯ
Н.В. Будаговская **526**

ЭКТОМИКОРИЗНЫЕ АССОЦИАЦИИ СОСНЫ СИБИРСКОЙ PINUS SIBIRICA DU TOUR КАК БИОТИЧЕСКИЙ ФАКТОР УСТОЙЧИВОСТИ КЕДРОВЫХ ЛЕСОВ
О.Б. Вайшля, К.С. Карбышева, Н.С. Москвитина, *А.Е. Нурлаби **527**

БИОГЕОТЕХНОЛОГИЯ ПЕРЕРАБОТКИ ЗАБАЛАНСОВЫХ ЗОЛОТОСУЛЬФИДНЫХ РУД И КОНЦЕНТРАТОВ ГП «НАВОИЙСКИЙ ГОРНО-МЕТАЛЛУРГИЧЕСКИЙ КОМБИНАТ» РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН
[1] М.Г. Сагдиева, [2] Д.Я. Мирталипов, [2] З.Г. Сагдиева, [2] З.В. Калиниченко, [2] Л.М. Гилязетдинова **532**

СДВИГИ В ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ СТЕХИОМЕТРИИ ПРИ АБИОТИЧЕСКОМ СТРЕССЕ
Д.М. Дударева, А.К. Квиткина, И.В. Евдокимов **537**

ГИДРОТЕРМАЛЬНОЕ СЖИЖЕНИЕ БИОМАССЫ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ И ВОДНОЙ РАСТИТЕЛЬНОСТИ В ПРИСУТСТВИИ КАТАЛИЗАТОРА
М.С. Власкин, М.С. Котелев **538**

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА БОРЬБЫ С ИНВАЗИОННЫМИ ЗОЛОТАРНИКАМИ
А.Н. Панкрушина, В.М. Шмелёв **540**

ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОПРОВОДЯЩИХ МАТЕРИАЛОВ НА СКОРОСТЬ ОБРАЗОВАНИЯ БИОГАЗА И НА СОСТАВ МЕТАНОГЕННОГО МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА В ТЕРМОФИЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ
Ю.И. Русскова, Ю.В. Литти, Н.А Чернова, А.Н. Ножевникова **541**

ТВЕРДОФАЗНАЯ АНАЭРОБНАЯ ПЕРЕРАБОТКА ОРГАНИЧЕСКОЙ ФРАКЦИИ ТВЕРДЫХ БЫТОВЫХ ОТХОДОВ, ПРЕДОБРАБОТАННЫХ В АППАРАТЕ ВИХРЕВОГО СЛОЯ ФЕРРОМАГНИТНЫХ ЧАСТИЦ
Э.Р. Михеева[1], И.В. Катраева[2] **543**

ВИДОВОЙ СОСТАВ ДРЕВО-КУСТАРНИКОВЫХ НАСАЖДЕНИЙ НА ТЕРРИТОРИЯХ ОБЩЕОБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ УЧРЕЖДЕНИЙ Г. РОСТОВА-НА-ДОНУ
Т.В. Денисова, Ю.В. Дзигунова, В.В. Лагутина **546**

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОНСОРЦИУМА НЕСПОРООБРАЗУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ РЕМЕДИАЦИИ ПОЧВ, ЗАГРЯЗНЁННЫХ ПОЛИАРОМАТИЧЕСКИМИ УГЛЕВОДОРОДАМИ
А.С. Нартов[1], А.И. Сидякин[2,3], Э.О. Байрамалиева[2] **548**

ИНТЕНСИФИКАЦИИ ПРОЦЕССОВ НИТРИФИКАЦИИ В БИОФИЛЬТРАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ БИОАУГМЕНТАЦИИ
Т.В. Вдовина, А.С. Дмитриев, А.А. Хасанова, Н.И. Кириллова, Й.В. Кобелева, А.С. Сироткин **550**

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ПЕРЕРАБОТКИ ОТХОДОВ
И.Д. Бельский[1], Е.В. Верёвочкина[2], О.В. Ягольницер[1] **551**

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИГОДНОСТИ РУД ЧЕРНОСЛАНЦЕВОГО ТИПА К ПЕРЕРАБОТКЕ МЕТОДОМ БАКТЕРИАЛЬНО-ХИМИЧЕСКОГО ВЫЩЕЛАЧИВАНИЯ
Р.С. Алимов, М.Г. Сагдиева, С.А. Соатов, У.А Сомова, А.В. Баранова **552**

БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ИЗОФОРМ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА PITX В ТКАНЯХ ХВОСТАТЫХ АМФИБИЙ: СПЕЦИФИЧНОСТЬ ЭКСПРЕССИИ В РЕГЕНЕРИРУЮЩЕЙ СЕТЧАТКЕ ТРИТОНОВ
В.Н. Симирский, Ю.В. Маркитантова **557**

ПОИСК ИНГИБИТОРОВ ПИРИМИДИН НУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗ ИЗ *B. SUBTILIS* МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА И ДИНАМИКИ.
П.А. Эйстрих-Геллер, С.В. Рубинский, А.А. Лашков **559**

ПРИМЕНЕНИЕ ИНФОРМАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ И ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ЗАДАЧ
Т.Ц. Дамдинова[1], Л.Ю. Прудова[1], Т.Е. Данилова[2] **561**

АНАЛИЗ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ В ХОДЕ ЛЕЧЕНИЯ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТА СРЕДСТВАМИ ПАКЕТА MS EXCEL
К.А. Мороз, А.С. Ткаченко, К.В. Шилеев **564**

ЭКДИЗОНОВЫЙ РЕЦЕПТОР НАСЕКОМЫХ-ВРЕДИТЕЛЕЙ КАК МИШЕНЬ ДЛЯ ФАРМАКОФОРНОГО ПОИСКА НОВЫХ ИНСЕКТИЦИДОВ
М.С. Кондратьев **568**

АНАЛИЗ МУТАЦИОННОЙ НАГРУЗКИ ПРИ КАРОТИДНЫХ ПАРАГАНГЛИОМАХ
А.В. Снежкина[1], Е.Н. Лукьянова[1], М.С. Федорова[1], А.Ф. Садритдинова[1], Е.А. Пудова[1], Д.В. Калинин[1,2], А.Л. Головюк[1,2], В.С. Павлов[1], Г.С. Краснов[1], А.В. Кудрявцева[1] **568**

THE PROPERTIES OF MIRNA INTERACTION WITH 5' AND 3' UTR MRNA GENES HAVING NUCLEOTIDE REPEATS
A.M. Belkozhayev, R.E. Niyazova **570**

CHARACTERISTICS OF INTERACTION OF MIRNAS WITH MRNA GENES OF HEAT STRESS TRANSCRIPTION FACTORS
A.K. Rakhmetullina, A.T. Ivashchenko **571**

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ MIRNA С CDS MRNA ГЕНОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В РАЗВИТИИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО
О.Ю. Юрикова, Ш.А. Атамбаева, А.Т. Иващенко **574**

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ КАК СРЕДСТВО ПРОГНОЗИРОВАНИЯ И ОПТИМИЗАЦИИ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА
Д.В. Сотников, Жердев А.В, Б.Б. Дзантиев **577**

ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЙ МУТАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ПРОМОТОРА T7: СВЯЗЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ И ФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ДНК
М.А. Орлов, Т.Р. Джелядин, А.А. Сорокин **578**

МЕТОДЫ БИОИНФОРМАТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ВИРУСНЫХ МЕТАГЕНОМОВ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА
Е.В. Старикова, К.М. Климина, А.А. Хурумова, Д.С. Ульянов, Е.Н. Ильина **580**

РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ И ПОЛУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНО ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ЛИНИЙ ВОЛЬФИИ БЕСКОРНЕВОЙ (WOLFFIA ARRHIZA) СОДЕРЖАЩИХ ГЕНЫ БЕЛКОВ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ
П.А. Хватков[1,3], А.Н. Шведова[1], М.А. Чернобровкина[1], А.С. Пушин[1,2], А.П. Фирсов[1,2], Л.А. Шалойко[2], С.В. Долгов[1,2,3] **582**

ЦИТОМЕГАЛОВИРУС ИНДУЦИРУЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК THP-1 К ХИМИОТЕРАПИИ, ВЛИЯЯ НА МЕТАБОЛИЗМ ПОЛИАМИНОВ
[1] С.С. Емельянова, [2] Я.Ю. Чернорыж, [2] К.И. Юрлов, [3] Н.Ф. Закирова, [1] Г.Р. Виноградская, [1] В.Н. Вербенко **585**

БИОМИМЕТИЧЕСКИЕ СТРУКТУРЫ ПЛЕНОК БИОСИНТЕТИЧЕСКОГО ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА
В.В. Воинова[1], Е.А. Акулина[1], А.А. Дудун[2], К.А. Меньших[1], А.П. Бонарцев[2], Д.В. Чеснокова[1], Т.К. Махина[2], Г.А. Бонарцева[2], И.Г. Чишанков[3], Т.М. Жданко[3], В.И. Куликовская[3], К.В. Шайтан[1], В.Е. Агабеков[3] **589**

СОЗДАНИЕ 3D КЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДОВ НА МИКРОСФЕРАХ ИЗ ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА
К.А. Меньших, В.В. Воинова, А.П. Бонарцев **591**

ТЕХНОЛОГИЯ ХРАНЕНИЯ МАКСИМАЛЬНОГО КОЛИЧЕСТВА ГЕНОВ ВИДА РАСТЕНИЙ В МИНИМАЛЬНОМ КОЛИЧЕСТВЕ КОМПОНЕНТОВ ЕГО БИОЛОГИЧЕСКОГО БАНКА ГЕНОВ
Н.С. Купцов, Е.Г. Попов **592**

НОВЫЕ ЧЕЛНОЧНЫЕ ВЕКТОРЫ НА ОСНОВЕ ПРИРОДНЫХ ПЛАЗМИД БАКТЕРИИ HELICOBACTER PYLORI
А.М. Белова, Д.В. Басманов, В.В. Бабенко, Т.В. Митько, Д.В. Клинов, В.Н. Лазарев **596**

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА СТИЛЬБЕНСИНТАЗЫ ВИНОГРАДА В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ ТАБАКА
Е.Б. Рукавцова[1], В.В. Алексеева[1], С.В. Тарлачков[1], Н.С. Захарченко[1], А.К. Сурин[2], Е.Ю. Горбунова[1], В.Н. Азев[1], Я.И. Бурьянов[1] **598**

ОРГАНОСПЕЦИФИЧНОСТЬ ЭПОКСИАЛКОГОЛЬСИНТАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ЦИТОХРОМОВ P450 СЕМЕЙСТВА CYP74 ОГУРЦА CUCUMIS SATIVUS
Е.К. Аскарова, С.С. Горина, Е.О. Смирнова, Я.Ю. Топоркова, Л.Ш. Мухтарова, А.Н. Гречкин **600**

НОВЫЙ СПОСОБ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ДОСТАВКИ БИОМОЛЕКУЛ НА ОСНОВЕ МОНОСЛОЕВ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ С ПРИМЕНЕНИЕМ ИК-ЛАЗЕРА
Е.С. Авдеева, Т.Е. Пылаев, Н.Г. Хлебцов **603**

НУКЛЕОТИДНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ СИНТЕЗА NOD-ФАКТОРА ШТАММА SINORHIZOBIUM MELILOTI АК555 – ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОГО СИМБИОНТА ЛЮЦЕРНЫ
А.С. Саксаганская, В.С. Мунтян, Ю.В. Лактионов, М.Л. Румянцева, Б.В. Симаров **605**

РАЗРАБОТКА CRISPR-CAS9 СИСТЕМЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА ДРОЖЖЕЙ YARROWIA LIPOLYTICA НА ПРИМЕРЕ СИНТЕЗА В-КАРОТИНА
М.О. Таратынова, Е.Ю. Юзбашева, Ю.М. Косихина, С.П. Синеокий **606**

СОЗДАНИЕ УСТОЙЧИВЫХ К ВИРУСУ ШАРКИ КОСТОЧКОВЫХ КУЛЬТУР БИОИНЖЕНЕРНЫМИ МЕТОДАМИ
Т.Н. Сидорова[1,2], В.Р. Тимербаев[1,2,3], Л.Ю. Муринец[1], О.А. Шульга[3], А.С. Пушин[1,3], А.П. Фирсов[1,3], С.В. Долгов[1,2,3] **608**

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ДИВИНИЛЭФИРСИНТАЗЫ (ДЭС): ПОЛУЧЕНИЕ, ОЧИСТКА, АНАЛИЗ ПРОДУКТОВ РЕАКЦИИ
Е.О. Смирнова, М.Е. Воробьева, С.С. Горина, Е.К. Аскарова, Т.М. Ильина, Я.Ю. Топоркова, А.Н. Гречкин **612**

ОСОБЕННОСТИ КАТАЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЦИТОХРОМОВ P450 СЕМЕЙСТВА CYP74
В.С. Фатыхова, Е.О. Смирнова, М.Е. Воробьева, Е.К. Аскарова, С.С. Горина, Т.М. Ильина, Я.Ю. Топоркова, А.Н. Гречкин **614**

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МАНИПУЛЯЦИИ ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ТРАНСПОРТЕР ЦИТРАТА, НА ПРОДУКЦИЮ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ ДРОЖЖАМИ YARROWIA LIPOLYTICA
Ю.М. Косихина, Е.Ю. Юзбашева, А.В. Шутов, М.О. Таратынова, С.П. Синеокий **615**

ПОЛУЧЕНИЕ СЕМЕНИ АМЕРИКАНСКОЙ НОРКИ ПРИ ПОМОЩИ ЧРЕЗКОЖНОЙ АСПИРАЦИОННОЙ БИОПСИИ ПРИДАТКА СЕМЕННИКА
Д.В. Попов, Г.Ю. Косовский, С.П. Шипова **617**

ГЕНОМНЫЕ ОСТРОВА СИМБИОТИЧЕСКИХ АЗОТФИКСИРУЮЩИЙ БАКТЕРИЙ РОДА SINORHIZOBIUM
М.Е. Черкасова, В.С Мунтян, А.С. Саксаганская, Б.В. Симаров, М.Л. Румянцева **618**

ЭКСПЕРЕМЕНТАЛЬНОЕ СРАВНЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ДЛЯ СОЗДАНИЯ МОДЕЛИ ГЭБ
Д.А. Сахаров, Ю.М. Аверина, А.Ю. Курбатов, М.А. Ветрова **619**

МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ КРАСНОКНИЖНОГО РАСТЕНИЯ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ HEDYSARUM CRETACEUM FISCH
С.Д. Бакулин **620**

ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ГЕНОМА НОРКИ МЕТОДОМ ISSR-PCR И IRAP-PCR
Е.С. Щукина[1], В.И. Глазко[1,2], Т.Т. Глазко[1,2], Г.Ю. Косовский[1] **622**

ИСКУССТВЕННАЯ СТИМУЛЯЦИЯ ФОЛЛИКУЛОГЕНЕЗА САМОК НОРОК
Д.В. Попов, Е.С. Щукина, И.С. Кашапова, Г.Ю. Косовский **623**

КОНСТРУИРОВАНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ ВЫРОЖДЕННЫХ ПРАЙМЕРОВ
С.С. Горина, Я.Ю. Топоркова **625**

РЕСУРСОСБЕРЕГАЮЩАЯ ТЕХНОЛОГИЯ БИОПЕРЕРАБОТКИ ВОЗОБНОВЛЯЕМЫХ СЫРЬЕВЫХ РЕСУРСОВ
В.П. Молчанов, А.И. Сидоров, М.Г. Сульман **628**

ГК «БИОТЕХНО»: ПРОЕКТИРОВАНИЕ И ПРОИЗВОДСТВО БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ОБОРУДОВАНИЯ
М.М. Тимофеева, А.Е. Никулин **629**

ПОИСК ЭКОЛОГИЧЕСКИ БЕЗОПАСНЫХ ПАВ ДЛЯ МОЙКИ АВТОМАТОВ РОЗЛИВА И ФАСОВКИ МОЛОКА И МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ
Н.Н. Гаврилова, Ж.И. Кузина, Б.В. Маневич **631**

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НЕФТЕДЕСТРУКТОРА RHODOCOCCUS SP. ДЛЯ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ НА ЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВАХ
Ю.А. Маркова[1], М.С. Третьякова[1], М.В. Иванова[1], Л.А. Беловежец[2] **633**

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ГИНСЕНОЗИДОВ В ЖЕНЬШЕНЕ *PANAX GINSENG C.A. MEYER*, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ СВЕРХКРИТИЧЕСКОЙ ЭКСТРАКЦИИ
М.П. Разгонова, Т.К. Каленик, А.М. Захаренко, Д. Кравотто[*], К.С. Голохваст[а] **635**

СИНТЕЗ ЗАМЕЩЕННЫХ АННЕЛИРОВАННЫХ ТРИАЗОЛЬНЫХ ГЕТЕРОЦИКЛОВ
О.В. Мазова, М.В. Глебова **638**

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ *CALLIGONUM LEUCOCLADUM BUNGE*
Г.Т. Есжанова, Д.Т. Рахимжанова **644**

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОЙ МЕТАНОЛДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ *METHYLOBACTERIUM EXTORQUENS* РСМ 160
Т.А. Кузнецова, Т.А. Белякова, А.В. Катыкина **647**

ИННОВАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ ИЗ БУРЫХ ВОДОРОСЛЕЙ РОДА *LAMINARIA (SACCHARINA)*: ИХ ПРОИЗВОДСТВО
А.В. Подкорытова[1], И.А. Шашкина[2] **651**

ОПТИИЗАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВРОВАНИЯ БИФИДОБАКТЕРИЙ
И.Д. Поздняков **656**

НОВОЕ В БИОТЕХНОЛОГИИ ЛИЗОЦИМА ИЗ ЖИВОТНОГО СЫРЬЯ
Г.П. Шуваева, П.А. Ворон, Т.В. Свиридова, О.Л. Мещерякова **659**

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛОЧНОГО ЛАКТОЗОСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ГИГИЕНИЧЕСКИХ МОЮЩИХ СРЕДСТВ
М.А. Чикатуева, Е.А. Абрамова, А.Г. Храмцов **661**

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭКСРАКТА ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТЕНИЯ SANGUISORBA OFFICINALIS L. НА КУЛЬТУРУ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТРИЙ BIFIDOBACTERIUM LONGUM B379M
И.Д. Поздняков **665**

ИННОВАЦИОННЫЕ РЕШЕНИЯ В ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА КРИСТАЛЛИЧЕСКОЙ ГЛЮКОЗЫ
Л.С. Хворова, Л.В. Баранова **668**

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГАЛАКТОМАННАНОВ РАСТЕНИЙ *CROTALARIA ALATA* И *GLEDITSIA TRIACANTHOS* В КАЧЕСТВЕ ЗАКРЕПИТЕЛЕЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ
Р.П. Закирова **671**

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ АЦИЛИРОВАНИЯ САХАРОЗЫ ТЕРЕФТАЛЕВОЙ КИСЛОТОЙ
А.В. Протопопов, Е.Ю. Шумилова, Е.А. Нещадимова **673**

ИЗУЧЕНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ФЕРМЕНТАЦИИ СКОРЛУПЫ КЕДРОВЫХ ОРЕХОВ В ТВОРОЖНОЙ СЫВОРОТКЕ ПРОПИОНОВОКИСЛЫМИ БАКТЕРИЯМИ
Ф.П. Балдынова, А.В. Бызгаева, С.В. Олоев **674**

СОЗДАНИЕ МОЮЩЕГО СРЕДСТВА ДЛЯ УДАЛЕНИЯ ОТЛОЖЕНИЙ РАСТИТЕЛЬНО-ЖИРОВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ СПРЕДОВ
Е.И. Орлова, Б.В. Маневич, Ж.И. Кузина, Т.В. Косьяненко **676**

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ХИТОЗАНА ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В МЕДИЦИНЕ, ВЕТЕРИНАРИИ И АГРОБИОЛОГИИ
А.И. Албулов, В.П. Варламов, М.А. Фролова, А.Я. Самуйленко, А.В. Гринь **678**

СОЗДАНИЕ МОЮЩИХ КОМПОЗИЦИЙ, ИНДИФФЕРЕНТНЫХ ПО ОТНОШЕНИЮ К УФ-МЕМБРАНАМ
Е.Б. Харитонова, Ж.И. Кузина, Б.В. Маневич **680**

ГАРМОНИЗАЦИЯ ПАТЕНТНЫХ ЗАКОНОДАТЕЛЬСТВ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ И РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН В СВЕТЕ ЕДИНОЙ ПАТЕНТНОЙ ПОЛИТИКИ В ГОСУДАРСТВАХ-УЧАСТНИКАХ ЕАЭС
А.С. Исабеков, Л.А. Хасанова, Т.Е. Алгалиев, З.М. Хасанова **682**

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ФЕРМЕНТАЦИИ ШТАММА *E.COLI* BL21(DE3) С ПЛАЗМИДОЙ PET32A ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ УРОВНЯ СИНТЕЗА ЦЕЛЕВОГО БЕЛКА
К.В. Кувакин[1,2], Е.В. Демьянова[1], В.И. Лисицкая[1], О.Б. Иванченко[2] **684**

НОВЫЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ РЕКОМБИНАНТНЫЙ ПРОДУЦЕНТ КОРМОВОГО ФЕРМЕНТА ЭНДО–1,3(4)-В-ГЛЮКАНАЗЫ НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕЙ *KOMAGATAELLA KURTZMANII*
Л.Н. Борщевская, Т.Л. Гордеева, А.Н. Калинина, С.П. Синеокий, А.С. Федоров **685**

СИСТЕМА ЕДИНОГО ПАТЕНТА В РАМКАХ ЕВРАЗИЙСКОГО ЭКОНОМИЧЕСКОГО СОЮЗА
Т.Е. Алгалиев, Л.А. Хасанова, А.С. Исабеков, З.М. Хасанова **686**

НОВЫЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ РЕКОМБИНАНТНЫЙ ПРОДУЦЕНТ КОРМОВОГО ФЕРМЕНТА ФИТАЗЫ НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕЙ *PICHIA PASTORIS*
Т.Л. Гордеева[1], Л.Н. Борщевская[1], А.Н. Калинина[1], С.П. Синеокий[1], С.П. Воронин[2], М.Д. Каширская[2] **687**

НОВЫЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ РЕКОМБИНАНТНЫЙ ПРОДУЦЕНТ КОРМОВОГО ФЕРМЕНТА ЭНДО – 1,4-B-D-КСИЛАНАЗЫ НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕЙ *PICHIA PASTORIS*
А.Н. Калинина, Л.Н. Борщевская, Т.Л. Гордеева, С.П. Синеокий **688**

ПОЛИСАХАРИДЫ ИЗ КОРНЕКЛУБНЕЙ ТОПИНАМБУРА *(HELIANTHUS TUBEROSUS)*
А.И. Ашуров, А.С. Джонмуродов, З.К. Мухидинов, С.Р. Усманова, К. Партоев* **689**

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОБНОГО ХИТОЗАНА
Е.А. Мотина, С.Ф. Яковлева, В.О. Минакова, К.В. Чекудаев, Н.А. Матвиенко **691**

ПОЛУЧЕНИЕ МЕЛАНИНА И ИССЛЕДОВАНИЕ ЕГО БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
Е.А. Прутенская, Э.М. Сульман, М.Г. Сульман, М.Д. Мельничук **692**

ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ *ASTRAGALUS LEHMANNIANUS*, ПРОДУЦЕНТА ЦИКЛОАРТАНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ
Р.П. Закирова, М.А. Агзамова, Э.А. Эшбакова **697**

ВЛИЯНИЕ ДОБАВКИ НА ОСНОВЕ АВТОЛИЗАТА САХАРОМИЦЕТОВ В СОСТАВЕ РЕЦЕПТУР ПРОДУКЦИОННЫХ КОРМОВ НА РОСТ ТИЛЯПИИ
А.С. Пырсиков, А.А. Соловьёв **698**

ДЕЙСТВИЕ УФ-ЛУЧЕЙ НА ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПРОДУЦЕНТА *ЛЕВАНАА. VINELANDII* ШТАММА Д-08 ПО МОРФОЛОГО-КУЛЬТУРАЛЬНЫМ ПРИЗНАКАМ И АКТИВНОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ ПОЛИСАХАРИДА
Н.А. Ракова, Н.В. Новокупцев **700**

СОСТАВ БИОМАМАССЫ ОБЛИГАТНОГО МЕТИЛОТРОФА METHYLOBACILLUSMETHANOLIVORANS
Н.В. Доронина, Е.Н. Капаруллина **702**

УВЕЛИЧЕНИЕ ПРОДУКЦИИ L-ТРЕОНИНА ШТАММАМИ *ESCHERICHIA COLI* ПУТЁМ ЭКСПРЕССИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ ЦИТРАМАЛАТСИНТАЗЫ
Т.В. Выборная, Д.М. Бубнов, С.С. Филиппова, С.П. Синеокий **704**

УВЕЛИЧЕНИЕ ВЫХОДА L-ТРЕОНИНА В ПРОЦЕССЕ БИОСИНТЕЗА ШТАММАМИ *ESCHERICHIA COLI* ПУТЁМ РЕГУЛИРОВАНИЯ АКТИВНОСТИ 4-ГИДРОКСИ-ТЕТРАГИДРОДИПИКОЛИНАТСИНТАЗЫ
С.С. Филиппова, Д.М. Бубнов, Т.В. Выборная, С.П. Синеокий **706**

СВОЙСТВА УРОБАКТЕРИЙ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИХ ИНДУЦИРОВАННОЕ ОСАЖДЕНИЕ КАЛЬЦИЯ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ИХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ
Н.Б. Градова*, Чеканова Д.А*., М.Г· Семёнова[1] **707**

DEVELOPMENT OF FUNCTIONAL FOODS FOR NUTRITION & HEALTH 707
Vandana Sanjeev Panda, Prin. K. M. Kundnani **707**

РАЗРАБОТКА ОСНОВНЫХ ПРОФЕССТОНАЛЬНЫХ ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ ПРОГРАММ НА ОСНОВЕ ПРИМЕРНЫХ ОСНОВНЫХ ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ ПРОГРАММ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО СТАНДАРТА ПО НАПРАВЛЕНИЮ «БИОТЕХНОЛОГИЯ»
Р.Р. Биглов **709**

РАЗВИТИЕ ПЕРСОНАЛА ПРЕДПРИЯТИЙ АГРОПРОМЫШЛЕННОГО КОМПЛЕКСА
Л.И. Назина, Н.Л. Клейменова, О.А. Орловцева **713**

ОСОБЕННОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ АККРЕДИТАЦИОННОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ ВЫСШИХ УЧЕБНЫХ ЗАВЕДЕНИЙ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
М.Г. Сульман, Э.М. Сульман, Г.Н. Демиденко, Ю.Ю. Косивцов **716**

ОСОБЕННОСТИ ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ ПРОГРАММ ПОДГОТОВКИ КАДРОВ ПО ПИЩЕВЫМ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМ НАПРАВЛЕНИЯМ В СООТВЕТСТВИИ С ФГОС 3++
О.Я. Мезенова **718**

ОПЫТ РАЗРАБОТКИ ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ ПРОГРАММ В ОБЛАСТИ БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ
Ю.Г. Базарнова, Е.Б. Аронова **723**

ОПЫТ ОРГАНИЗАЦИИ НИР ПРИ ПОДГОТОВКЕ БАКАЛАВРОВ ПО НАПРАВЛЕНИЮ «БИОТЕХНОЛОГИЯ»
Л.П. Лазурина **726**

К ВОПРОСУ РАЗРАБОТКИ ТЕХНОЛОГИИ ГЕЛЕСОДЕРЖАЩИХ КОМПОЗИЦИЙ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО НАЗАНАЧЕНИЯ
К.В. Завидовская, М.М. Самохвалов **728**

Секция 1. Пищевая, сельскохозяйственная и лесная биотехнология

УДК 637.5.039

ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОЙ МЕТАЛЛОПЕПТИДАЗЫ М9

А.А. Махова, М.Ю. Минаев

ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова, РАН, Москва, Россия

В пищевой промышленности используется множество протеаз [1]. В большинстве случаев основным инструментом пищевой биотехнологии для производства этих ферментов служат клетки дрожжей, в частности штамм Pichia pastoris. Для использования в мясной промышленности, а именно для тендеризации мяса в клетках Pichia pastoris была экспрессирована внеклеточная аспартатная протеаза Rhizomucor miehei [2].

Ранее в статье мы описывали способ получения рекомбинантной пептидазы М9 *Aeromonas salmonicida* для обработки мясного сырья с целью его умягчения.

Целью данной работы стало изучение влияния рекомбинантной пептидазы на цельное мясо и мясной котлетный фарш после термической обработки и оценка безопасности ее применения. При оценке воздействия рекомбинантного фермента на мышечную и соединительную ткань мяса использовали гистологический метод. Изучение образцов и их фотографирование проводили на компьютерной системе анализа изображения Axio Imager A1 на объективе с 20х. Полученные изображения обрабатывали с помощью программы корректировки ACDS 8 PRO для улучшения качества.

При оценке безопасности рекомбинантного фермента проводились исследования с использованием биологических методов острой токсичности, местно-раздражающего и сенсибилизирующего действия.

При оценке влияния фермента на мышечную и соединительную ткань цельнокусковой говядины, было отмечено неравномерное его распределение. Распределение ограничивалось ближайшим к месту инъекции пространством без проникновения внутрь первичных пучков мышечных волокон и в эндомизий. Препарат воздействовал преимущественно на коллагеновые структуры, не оказывая протеолитического воздействия на эластин (рисунки. 1–3).

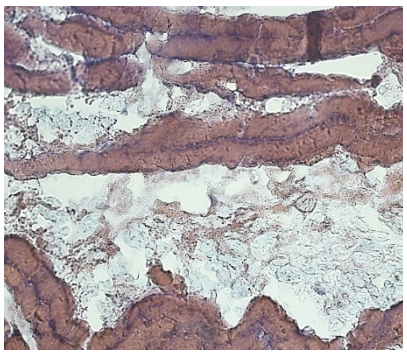


Рис. 1. Структура коллагеновой соединительной ткани. Контроль. Об.20х.

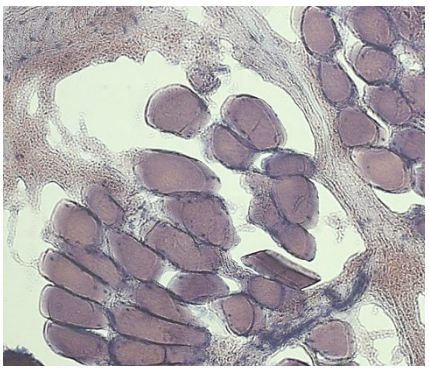


Рис. 2. Структура контакта ферментного препарата с мышечной и коллагеновой соединительной тканями. Об.20х.

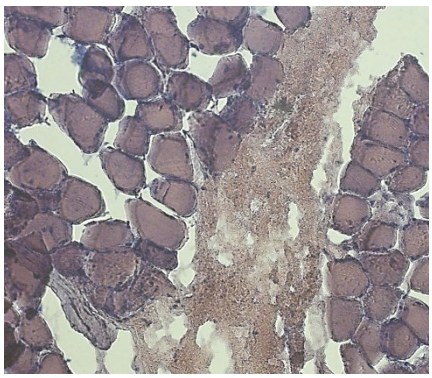


Рис. 3. Ферментный препарат в перимизии. Об.20х.

При оценке влияния фермента на мышечную и соединительную ткань фарша котлетного из говядины было отмечено увеличение мелкозернистой белковой массы (продукта разрушения тканевых ингредиентов), однако существенного роста деструктивных изменений мышечных волокон

не наблюдалось. Что еще раз подтверждало специфичное действие рекомбинантного фермента на белки соединительной ткани и отсутствие активности к мышечным белкам. Микроструктурные особенности соединительной ткани в котлетном фарше (клеточного и волокнистого компонента) свидетельствовали о наличии протеолитического воздействия препарата на компоненты фаршевого образца. В клетках соединительной ткани ядра выявлялись в умеренной степени. Эластические волокна без морфологических изменений и набухания. На углеводные (сухари) составляющие котлетного фарша использованный ферментный препарат не оказывает видимого воздействия (рис. 4,5).

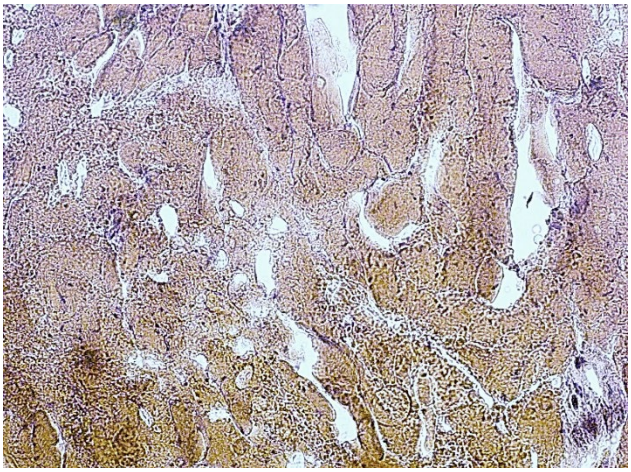


Рис. 4. Структура мышечной ткани в фарше после воздействия рекомбинантной пептидазы

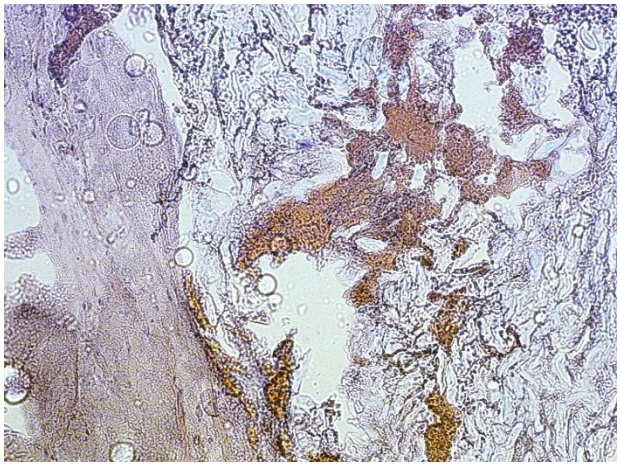


Рис. 5. Структура соединительной ткани в фарше после воздействия рекомбинантной пептидазы

Результаты оценки безопасности рекомбинантной металлопептидазы М9:

– рекомбинантная пептидаза с активностью 0,011 Ед. при однократном внутрижелудочном введении обладает малотоксичным действием: согласно ГОСТ 32644 можно отнести к 5 классу в СГС (2000 мг/кг < DL50/LD50 < 5000 мг/кг), согласно ГОСТ 12.1.007 – к IV классу опасности (веществам малоопасным), согласно классификации веществ по токсичности Медведя (ЛД50 > 1000 мкг/ кг) – к малотоксичным веществам;

– при определении раздражающего действия на кожу кроликов установлено, что рекомбинантная пептидаза с активностью 0,011 Ед. обладает слабым раздражающим действие;

– рекомбинантная пептидаза с активностью 0,011 Ед. не обладает сенсибилизирующим действием на кожный покров морских свинок.

ЛИТЕРАТУРА

Bekhit AA1, Hopkins DL, Geesink G, Bekhit AA, Franks P Exogenous proteases for meat tenderization. Critical reviews in food science and nutrition, 2014, 54(8) : 1012–31. DOI: 10.1080/10408398.2011.623247.

Sun Q., Chen F., Geng F., Luo Y., Gong S., Jiang Z. A novel aspartic protease from Rhizomucor miehei expressed in Pichia pastoris and its application on meat tenderization and preparation of turtle peptides. Food Chem. 2017; 245: 570–7. URL: https:// doi.org / 10.1016/j.foodchem.2017.10.113

Minaev, M., & Makhova, A.A. (2019). Recombinant metalloprotease as a perspective enzyme for meat tenderization. Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences, 13(1), 628–633. https://doi.org / 10.5219/1087

УДК 631.53.011 + 57.043 + 633.81

ВЛИЯНИЕ РЕЖИМОВ ИМПУЛЬСНОГО ОСВЕЩЕНИЯ НА ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ ЗМЕЕГОЛОВНИКА И КАЛЕНДУЛЫ В ЗАКРЫТОЙ СИСТЕМЕ СИНЕРГОТРОНА 1.01

В.Н. Зеленков[1,2,3], В.В. Латушкин[1], М.И. Иванова[3], Н.Ю. Свистунова[2], С.В. Гаврилов[1], П.А. Верник[1]

[1] Институт стратегий развития, Москва, Россия
[2] Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, Москва, Россия
[3] Всероссийский научно-исследовательский институт овощеводства – филиал Федеральный научный центр овощеводства, Московская область, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Изучение влияния света на прорастание семян лекарственных и эфиромасличных культур имеет большое научное и практическое значение. Известно, что семена многих культур могут прорастать как в темноте, так и на свету, в то же время другие культуры требуют темноты или света [1]. Например, согласно ГОСТ 12038–84 и ГОСТ Р 55294–2012, для прорастания семян змееголовника молдавского наиболее благоприятна темнота. Для многих культур воздействие облучения имеет неспецифический характер, воздействие света можно заменить другими факторами – температурным, химическим и т. д. [2,3]. Мало изучен вопрос о влиянии на растения облучения в импульсных режимах, при которых ответная реакция растений изменяется [4]. Поэтому целью настоящей работы явилось изучение влияния импульсного режима освещения на динамику прорастания семян некоторых лекарственных культур – змееголовника и календулы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент проводили в синерготроне модели 1.01 конструкции АНО «ИСР» (закрытой камере с цифровым программным управлением) и в термостате ВИЛАР.

Объектом исследований служили семена и проростки змееголовника молдавского и календулы лекарственной из коллекционного фонда ВИЛАР. Проращивание семян проводили в чашках Петри согласно ГОСТ 12038–84 с изменениями – использовалась подложка из минеральной ваты фирмы «Агрос». Увлажнение проводили по мере подсыхания подложки водопроводной водой. Количество семян по 25 семян в чашке Петри, повторность трехкратная. Длительность эксперимента 12 суток. После достижения сеянцами крышки чашек Петри крышки снимались, чтобы дать возможность сеянцам свободно расти. Температура проращивания в синерготроне 23–25° С. Уровень интенсивности света, создаваемый светодиодными светильниками красного и синего света на уровне субстрата в период действия импульса составил 240–290 мкМоль/ $м^2$ * с, 24 ч в сутки. Использовались следующие режимы импульсного облучения: 1с / 3 с (длительность импульса 1 с, перерыв – период следования импульса 3 с); 1 с / 2 с; 1 с / 1 с; 1 мс / 3 мс. Контроль – проращивание в темноте, проводили в термостате ВИЛАР при температуре для семян календулы 20 С, остальных видов – переменная 20° С (16 часов в сутки) и 30° С (8 часов).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Импульсное облучение в режиме 1/3мс стимулировало прорастание семян календулы (ЭП увеличивалась на 6,4 %, всхожесть – на 11,25 %, тогда как в режиме 1/1 с всхожесть снижалась на 8,8 % при одинаковой с контролем энергии прорастания (рис. 1–2).

Энергия прорастания семян змееголовника увеличивалась при импульсном освещении (в варианте 1/3 мс до 30 %), тогда как всхожесть была меньше, чем в контроле, до 20 %. В меньшей степени (на 6,7 %) всхожесть снижалась в варианте 1/3 мс.

Для семян календулы энергия прорастания и всхожесть практически совпали, что говорит о биологически высокой интенсивности прорастания и высоком качестве использованных семян. Основная масса семян проросла на 3–4 сутки во всех вариантах, включая контроль.

Семена змееголовника характеризовались более длительным периодом прорастания, появление новых взошедших растений наблюдали до 11 дня после посева семян (рис. 3)

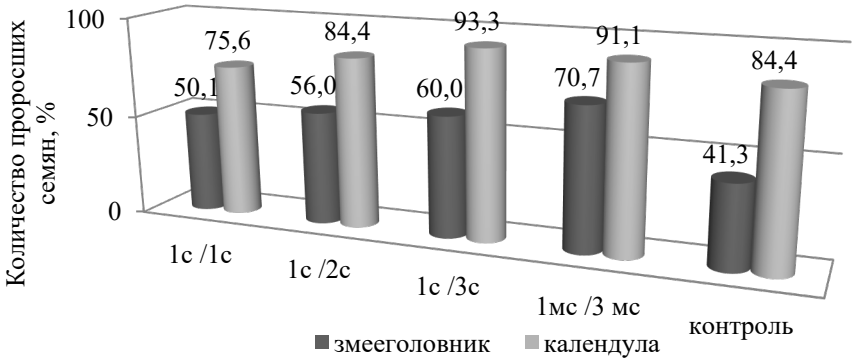


Рисунок 1 – Энергия прорастания семян при разных режимах импульсного облучения, %

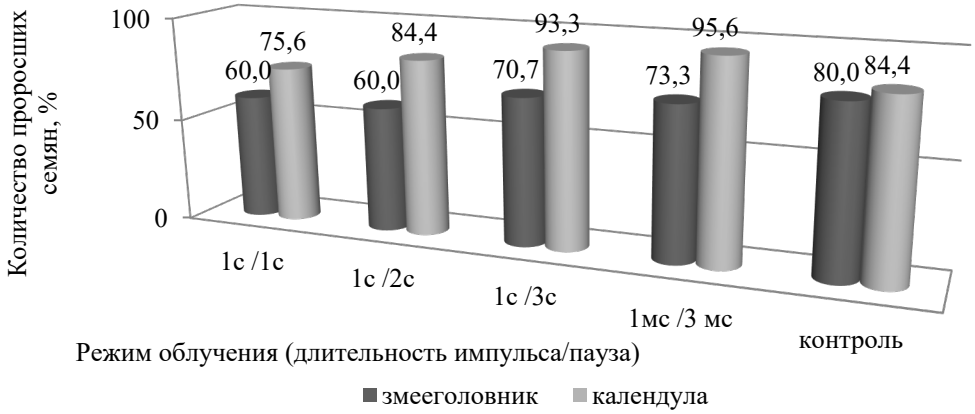


Рисунок 2 – Всхожесть семян при разных вариантах импульсного облучения

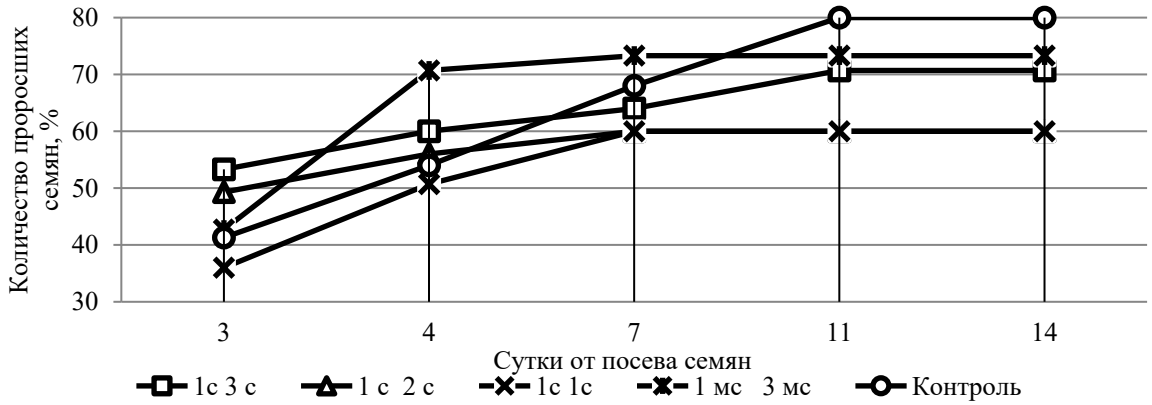


Рисунок 3 – Влияние импульсного облучения на динамику прорастания семян змееголовника, %

Измерения высоты сеянцев в динамике показали (рис. 4–5), что первые несколько дней наблюдался активный рост сеянцев во всех вариантах, однако впоследствии (примерно через 11 суток после посева семян) рост прекращался практически полностью. Предположительно, не происходило полномасштабного переключения растений на автотрофный тип питания (фотосинтез), а запасы питательных веществ семени к этому моменту практически исчерпываются. Для выявления причин данного явления необходимо проведение углубленных исследований.

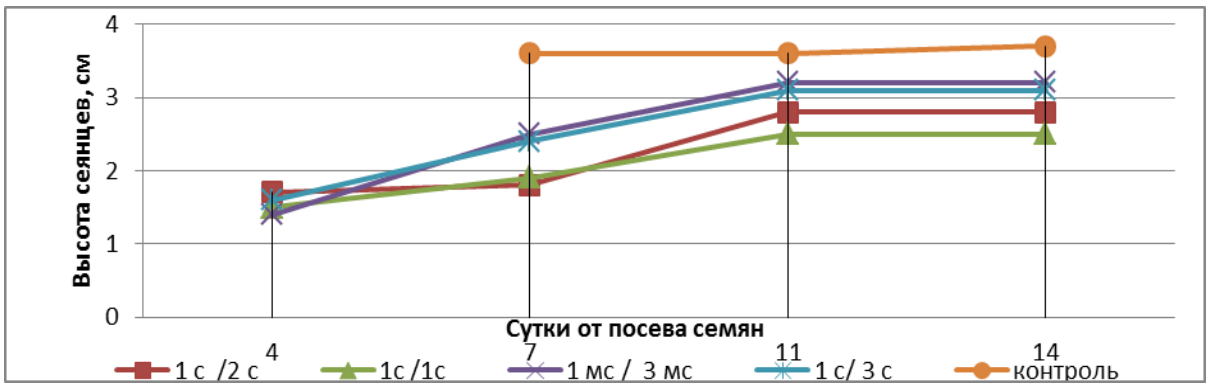


Рисунок 4 – Влияние импульсного облучения на динамику роста сеянцев календулы

Растения календулы и змееголовника в контрольных вариантах (в темноте) вытягивались, высота их превышала высоту растений при импульсном освещении. Сеянцы этиолированные в связи с отсутствием света.

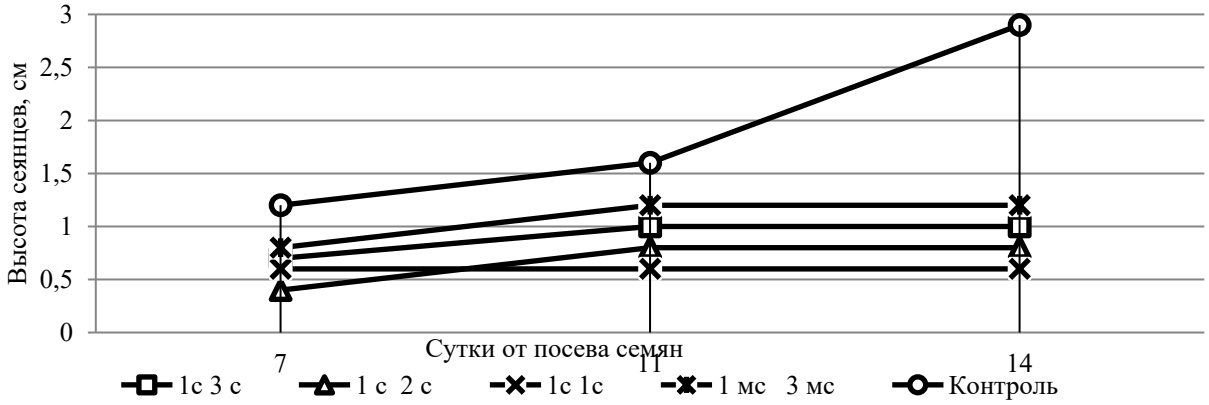


Рисунок 5 – Влияние импульсного облучения на динамику роста сеянцев змееголовника

Определение надземной биомассы сеянцев в конце периода выращивания (рис. 6) показало значительное увеличение данного показателя при импульсном облучении по сравнению с контролем (темнота, отсутствие фотосинтеза). Так, при режиме 1/3 мс прирост составил для змееголовника 60 %, для календулы 112 %, По эффективности к режиму 1/3 мс близок режим 1/3 с, наименее эффективен -1/1 с.

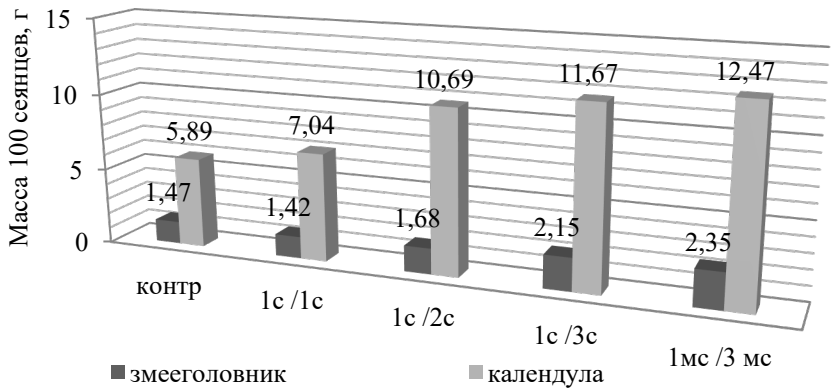


Рисунок 6 – Биомасса 100 сеянцев на 14-е сутки после посева семян при разных режимах импульсного облучения

Необходимо отметить, что различия вариантов по высоте сеянцев не были столь значительны, как различия по биомассе (рис. 7).

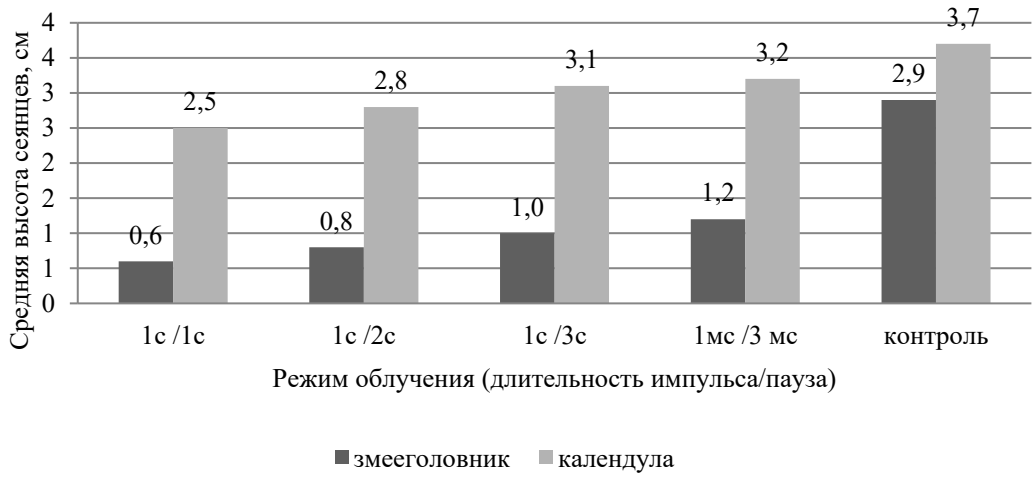


Рисунок 7 – Влияние импульсного облучения на высоту сеянцев в конце периода проращивания

В темноте формировались тонкие этиолированные, вытянутые растения. Для всех культур наименьшая средняя высота сеянцев зафиксирована при облучении в режиме 1/1 с.

ВЫВОДЫ

1. Импульсное облучение в режиме 1/3мс стимулировало прорастание семян календулы (энергия прорастания увеличивалась на 6,4 %, всхожесть – на 11,25 %). В режиме 1/1 с всхожесть снижалась на 8,8 %.

2. Импульсное облучение семян змееголовника повысило энергию прорастания семян (в варианте 1/3 мс до 30 %), но понизило всхожесть (на 6,7 %). Особенно неблагоприятное воздействие оказывают режимы облучения режим 1/1 с, а также 1/2 с 3. Семена календулы прорастали через 3–4 суток, и в дальнейшем количество проросших семян практически не увеличивалось. Количество проросших семян змееголовника увеличивалось в течение 11 суток с момента посева семян.

4. Активный рост сеянцев при всех исследованных режимах импульсного облучения практически прекращается на этапе образования 1-го настоящего листа, вероятно, вследствие исчерпания запасов питательных веществ семени и недостаточно активному переходу к автотрофному питанию (фотосинтез).

5. Надземная биомасса сеянцев в конце периода выращивания увеличивается при импульсном облучении по сравнению с контролем (темнота, отсутствие фотосинтеза).

6. Различия вариантов по высоте сеянцев не были столь значительны, как различия по биомассе. В темноте формировались тонкие этиолированные, вытянутые растения. Для всех культур наименьшая средняя высота сеянцев зафиксирована при облучении в режиме 1/1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зависимость прорастания семян от света [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.activestudy.info/zavisimost-prorastaniya-semyan-ot-sveta (дата обращения 02.08.2018).

2. Физиология и биохимия покоя и прорастания семян. – М.: Наука, 1982. – 495 с.

3. Крокер В., Бартон Л. Физиология семян. – М.: Наука, 1955. – 399 с.

4. Хит О. Фотосинтез (Физиологические аспекты). – М., Мир, 1972. – 315 с.

УДК 637.5.039

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ФЕРМЕНТА АСТАЦИНА ДЛЯ ОБРАБОТКИ МЯСА

М.Ю. Минаев, А.А. Махова

ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова, РАН, Москва, Россия

Потребительские свойства пищевых продуктов в основном обусловлены качеством сырья. Мясо и мясо продукты служат основным источником белка, усвояемость которого от содержания соединительной ткани. Наибольший процент содержания соединительной ткани характерен для говядины. Наиболее ценное мясо идет на производство крупнокусковых полуфабрикатов, при этом нормы выхода при разделке говядины на крупнокусковые полуфабрикаты составляют в среднем всего 30 % от убойного выхода. Высокая жесткость мяса наиболее ценных частей туши КРС снижает рентабельность производства говядины. С целью предотвращения излишней жесткости мясного сырья используют различные приемы воздействия на соединительную ткань, в частности, механические и биотехнологические способы [1, 2].

Ассортимент ферментных препаратов, доступных для промышленного использования мал. Это связано с сокращением числа выпускающих их предприятий и стоимостью имеющихся импортных ферментов (бромелаин, папаин). Одним из отечественных ферментных препаратов, нашедших применение в технологии мясопродуктов, является продукт переработки гепатопанкреаса камчатского краба (RU 2 280 076 C1), представляющий собой смесь различных протеиназ, включая коллагеназу семейства M12 астацинов [3].

В работе описывается изучение возможности использования рекомбинантного астацина (UniProtKB/Swiss-Prot: P07584) в качестве фермента для обработки мясного сырья с целью его умягчения.

Гепатопанкреас камчатского краба относится к полиферментным препаратам, содержащий большое количество пищеварительных ферментов, гидролизующих все классы природных полимеров и обладающих широкой специфичностью и необычно высокой активностью. В настоящее время из гепатопанкреаса крабов выделяют в очищенном или гомогенном состоянии коллагенолитические протеиназы, аминопептидазу, трипсин, эластазу и Ca, Mg-зависимую ДНКазу.

Препарат проявляет активность ко всем белкам мяса, воздействуя на соединительную и мышечную ткани мяса. Общепротеолитическая активность препарата может негативно сказываться на структурные свойства готовой продукции. Препарат может потенциально содержать ксенобиотики и так как его получают из крабов, продукцию, выработанную с его применением необходимо маркировать как содержащую аллерген ракообразных.

Астацин – пищеварительный фермент из речного рака – был впервые описан в 1967 году, обладает активностью в отношении коллагена II и III типов. Астацины участвуют в различных физиологических процессах – пищеварении, процессинге внеклеточных белков, морфогенезе, вылуплении мальков рыб (ферменты, участвующие в этом процессе, называются хориолизинами) [4].

При расщеплении пептидных связей в белковых субстратах астацин проявляет предпочтение к аминокислотным остаткам с короткими боковыми цепями (Ala, Thr, Ser, Gly) в положении P1′, к пролину в положениях P2′ и P3′, к гидрофобным остаткам в положениях P3′ и P4′ (рисунок 1). Субстратами служат также синтетические нитроамидоподобные соединения Suc–Ala–Ala–Ala–NHPhNO [3].

P1	**P1'**	**P2'**
Gly	Gly	Pro
Ala	Gly	Pro
Ala	Ala	Pro
Ser	Ser	Pro
Gly	Ser	Pro

Рис. 1 Примеры аминокислотных сайтов узнавания пептидазы M12 *Astacus astacus*

Целью работы являлось получение рекомбинантного фермента астацина семейства M12 с использованием дрожжевого штамма Pichia pastoris для его дальнейшего применения в обработке мяса.

Нативная молекула астацина состоит из 200 аминокислотных остатков. Оптимум pH действия астацина находится в интервале pH 6–8 и зависит от субстрата. Активность астацина определяется по гидролизу казеина, азоказеина, желатина, коллагена при нейтральном значении pH.

Как было ранее установлено, у рекомбинантного астацина не происходит автокаталитического удаления пропептида и он обладал желатиназной активностью только после активации трипсином. Поэтому по сайту отщепления пропептида была добавлена аминокислотная последовательность узнавания рекомбинантной WELQut протеазой (рисунок 2).

SPIIPEAARALYYNDGMFEGDIKLRAGRQPARVGWELQAAILGDEYLWSGGVIPYTFAG
VSGADQSAILSGMQELEEKTCIRFVPRTTESDYVEIFTSGSGCWSYVGRISGAQQVSLQA
NGCVYHGTIIHELMHAIGFYHEHTRMDRDNYVTINYQNVDPSMTSNFDIDTYSRYVGED
YQYYSIMHYGKYSFSIQWGVLETIVPLQNGIDLTDPYDKAHMLQTDANQINNLYTNECS
LRH

Рис. 2 Оптимизированная аминокислотная последовательность пептидазы M12 *Astacus astacus*

Нуклеотидная последовательность, кодирующая астацин, была оптимизирована под Pichia pastoris и синтезирована в IDT как gBlocks Gene Fragments.

Проведено клонирование оптимизированной последовательности в векторную плазмиду pPic9K с последующей трасформацией *Pichia pastoris*.

Была наработана культуральная жидкость, содержащая рекомбинантный астацин, его концентрирование сульфатом аммония, активация WELQut протеазой и проведена оценка его ферментативной активности в отношении коллагена, желатина и казеина.

Кроме этого была проведена сравнительная оценка воздействия рекомбинантного астацина и коммерческого ферментного препарата на основе гепатопанкреаса камчатского краба на мясное сырье (котлетный фарш). Результаты гистологической оценки образцов представлены на рисунках 3–4.

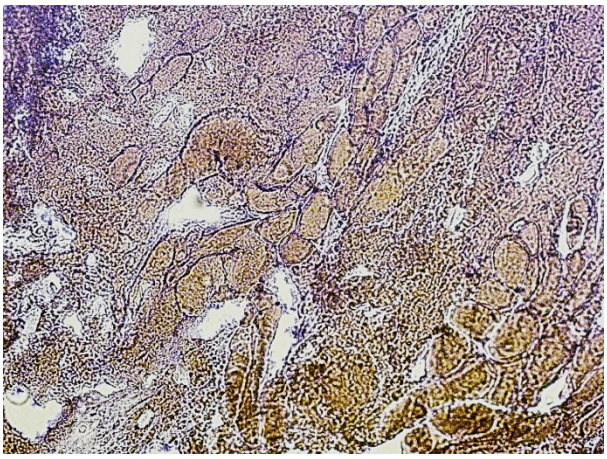


Рис. 3 Микроструктура образца, обработанного коллагеназой камчатского краба (об. х40)

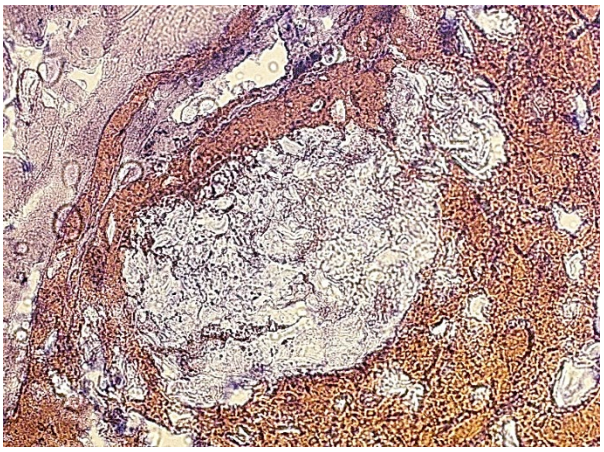


Рис. 4. Микроструктура образца, обработанного рекомбинантным астацином (об. х40)

При исследовании микроструктурных особенностей фарша котлетного с введением протеолитического фермента (рис. 3), выделенного из гепатопанкреаса краба установлено наличие его выраженного воздействия на все ингредиенты модельной мясной системы. Крупные фрагменты мышечной ткани практически не обнаруживаются. В мышечных волокнах наблюдались многочисленные разрывы и фрагментация с существенным возрастанием содержания в фарше мелкозернистого материала. Клеточные ядра в мышечных волокнах лизированы (кариолизис) и практически не воспринимали базофильные красители. Поперечная исчерченность в мышечных волокнах не выявлялась. Соединительнотканные ингредиенты, преимущественно коллагеновой природы, разрыхляются и местами приобретали зернистый характер. Ядерные структуры в них не прослеживались. В частицах полисахаридной зерновой природы (сухари) также отмечались и набухание, и разрыхление всех составляющих элементов.

При исследовании микроструктурных особенностей фарша котлетного с введением рекомбинатного фермента (рис. 3) установлено наличие его воздействия преимущественно на соединительную ткань. В мышечных волокнах наблюдались некоторое количество разрывов. Фрагментация мало выражена и соответствовала результатам механического воздействия при изготовлении фарша. Клеточные ядра в мышечных волокнах частично лизированы и плохо воспринимали базофильные красители. Поперечная исчерченность в мышечных волокнах стертая. Эластические волокна без морфологических изменений и набухания. Элементы жировой ткани без значимых микроструктурных изменений. В составе сухарей отчетливо выявлялись мелкие зерна крахмала с явлениями гидратирования, являющимися результатом термообработки. Наблюдалось частичное протеолитическое воздействие на белковый компонент зерна сухарей.

Таким образом, в результате проведенных гистологических исследований установлено воздействие рекомбинантного фермента в большей степени на соединительную ткань мясного сырья.

Данное свойство фермента может быть использовано для направленного воздействия на белки соединительной ткани мяса с целью повышения его сортности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Патиева С.В., Багирян М.А., Бабченко Л.Ю. Ферментные препараты в технологии производства ветчины из низкосортного сырья // Молодой ученый. – 2016. – № 9. – С. 263–265. – URL https://moluch.ru/archive / 113/29320 / (дата обращения: 17.01.2019).

2. Журавская Н.К., Алехина Л.Т., Отряшенкова Л.М. Методы исследования и контроля мяса и мясопродуктов. Учебное пособие. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1985. – 295 с.

Балабан Н.П., Металлоэндопептидазы клана метцинков: классификация, свойства, структурные особенности. – Учебные записки Казанского государственного университета, том 115, кн. 2.

СЕМЕЙСТВО АСТАЦИНОВЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ, С.А. Семенова*, Г.Н. Руденская, Биомедицинская химия, 2008 том 54, вып. 5, с. 531–554.

Электронный ресурс – база данных MEROPS – https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/substrate_index? action = A

УДК 630 165.6: 631.147(075.8)

ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ В ЛЕСНОМ ХОЗЯЙСТВЕ ЦЧР

А.И. Сиволапов[1], В.А. Сиволапов[2]

[1] Воронежский государственный лесотехнический университет им. Г.Ф. Морозова, Воронеж, Россия
[2] Филиал ФБУ «Рослесозащита» «ЦЗЛ Воронежской области, Воронеж, Россия

В лесном хозяйстве Центрально-Черноземного района находят практическое применение следующие направления биотехнологии:

1. Применение биотехнологий для плантационного лесовыращивания. Клональное микроразмножение, как один из путей биотехнологии, позволяет за короткий срок получать большое количество генетически однородного посадочного материала, значительно ускоряя селекционный процесс, сокращая сроки получения товарной продукции новых сортов до 2–3 лет вместо 10–12. Кроме того, чрезвычайно важно, что при этом методе размножения происходит освобождение растений от патогенных микроорганизмов и во многих случаях от вирусов, т. е. происходит оздоровление посадочного материала. Методом тканевых культур удается размножить растения, которые не плодоносят и с трудом или совсем не размножаются вегетативно [6 и др.].

В Воронежской и Липецкой области заложены опыты плантационных культур березы, ольхи и тополя регенерантами in vitro. Плантационные культуры с коротким периодом ротации также используют на получение мелкотоварной древесины для целей прессования, в связи с высокой эффективностью ее использования. За культурами ведутся ежегодные наблюдения [1–4, 6, 7].

Влияние происхождения посадочного материала на интенсивность роста опытных культур, созданных сеянцами и регенегантами in vitro показано ниже. Результаты инвентаризации 2018 года обработаны однофакторным дисперссионным анализом (таблица 1).




Рисунок 1 – Культуры березы повислой, созданные регенерантами in vitro и сеянцами

Таблица 1 – Итоговая таблица однофакторного дисперсионного анализа роста культур березы по диаметру, созданных сеянцами и регенегантами in vitro

Источники вариации	Степени свободы	Сумма квадратов отклонений	Средний Квадрат (σ^2)	$F_ф$	F_{st}	
					P = 0,05	P = 0,01
Межгрупповая	1	82,36	82,36	9,66	3,9	6,9
Внутригрупповая	112	955,6	8,53			
Общая	113	1038,0	–			

Дисперсионный анализ влияния фактора происхождения посадочного материала на интенсивность роста по диаметру показал достоверность результатов. Нулевая гипотеза отвергается с вероятностью ***(P = 0,99)*** в отношении влияния происхождения посадочного материала на рост по диаметру регенерантов и сеянцев. В 22 года средний диаметр на высоте 1,3 м у регенерантов больше на 3,6 см. Поскольку $F_ф > F_{st}$ в достоверности найденных показателей сомневаться не приходится. Сила влияния изучаемого фактора не высокая $\eta^2 = 8\ \%$. В условиях лесных супесчаных почв Конь-Колодезского лесничества в 22 года средний диаметр деревьев березы повислой семенного происхождения составляет 11,2 см, у регенерантов – 14,8 см, что подтверждает перспективность использования регенерантов в лесокультурной практике [6]. По высоте также наблюдается превышение (таблица 2).

Таблица 2 – Итоговая таблица однофакторного дисперсионного анализа роста культур березы по высоте, созданных сеянцами и регенегантами in vitro

Источники вариации	Степени свободы	Сумма квадратов отклонений	Средний Квадрат (σ^2)	$F_ф$	F_{st}	
					P = 0,05	P = 0,01
Межгрупповая	1	26,1	26,1	6,07	4,2	7,6
Внутригрупповая	28	121	4,3			
Общая	29	147	5,06			

Дисперсионный анализ влияния фактора происхождения посадочного материала на интенсивность роста по высоте показал достоверность результатов. Нулевая гипотеза отвергается с вероятностью **(*P = 0,95*)** в отношении влияния происхождения посадочного материала на рост по высоте регенерантов и сеянцев. Средняя высота у регенерантов больше в 22 года на 3,7 м. Поскольку $F_ф > F_{st}$ в достоверности найденных показателей сомневаться не приходится. Сила влияния изучаемого фактора не высокая $\eta^2 = 18\ \%$. В условиях лесных супесчаных почв Конь-Колодезного лесничества в 22 года средняя высота деревьев березы повислой у сеянцев составляет 12,9 м, у регенерантов – 16,6, что подтверждает перспективность использования регенерантов в лесокультурной практике [6, 7]. Качество стволов, наоборот, выше у сеянцев.

В результате проведенного опыта можно сделать вывод о том, что происхождение исходного материала существенно влияет на рост и продуктивность березовых насаждений. Лучшее результаты показывают регенеранты in vitro по сравнению с сеянцами.

Осенью (8 октября) 2011 года для лесовосстановления горельников регененеранты сортов тополя сереющего были высажены как опушечные ряды вдоль дороги. Корнеотпрысковая способность этих тополей позволит от небольшого количества маточных растений получить в будущем (примерно через 10 лет) насаждение этих тополей [6, 8]. Почвы супесчано-песчаные свежие, подготовка почвы плугом ПКЛ – 70 прямолинейными бороздами. Посадка проведена в дно борозды под лопату с размещением 1,5×3,0 м. Весной 2012 г. проведен учет приживаемости, а осенью – сохранности (таблица 3). В коллекции популетума Правобережного лесничества на темно-серых суглинистых свежих почвах одновременно высажены регенеранты Тополя Приярского и Хоперский 1. Приживаемость тополя Хоперский 1 была выше на 8 %, чем у тополя Приярский. Сохранность к осени 2012 года в Левобережном лесничестве составила 75 % тополя Хоперский 1 и 23 % тополя Приярский.

Таблица 3 – Характеристика регенерантов тополя сереющего Хоперский 1 и Приярский на горельниках Левобережного лесничества Учебно-опытного лесхоза ВГЛТУ

Место закладки, лесораст. услов.	Название сорта тополя	Приживаемость (весной), %	Сохранность (осенью), %	Средняя высота, см	Состояние сохранившихся
Горельник Левобережного л-ва, (A_2)	Хоперский 1	98	75	112 ± 9,5	хор.
	Приярский	90	23	0,82 ± 8,5	хор.

На супесях в условиях A_2 тополь Приярский сохранился на 23 %, тополь Хоперский 1 на 75 % (рисунок 2).

Летом 2018 года проведена инвентаризация культур тополя в Левобережном лесничестве (таблица 4).

Таблица 4 – Характеристика регенерантов тополя сереющего Хоперский 1 и Приярский на горельниках Левобережного лесничества Учебно-опытного лесхоза ВГЛТУ

Место закладки, лесораст. услов.	Название сорта тополя	Сохранность, %	Средняя высота, см	Состояние сохранившихся
Горельник Левобережного л-ва, (A_2)	Хоперский 1	60 %	3,9 ± 0,34	2,9 ± 0,39
	Приярский	0	–	–

Тополь Приярский погиб полностью.

2. Применение биотехнологий для управления лесонасаждениями [9 и др.].

Одним из приоритетных направлений развития лесных биотехнологий является молекулярное (ДНК) маркирование, направленное на решение следующих задач лесного хозяйства:

– совершенствование принципов и подходов лесосеменного районирования (Центр защиты леса);

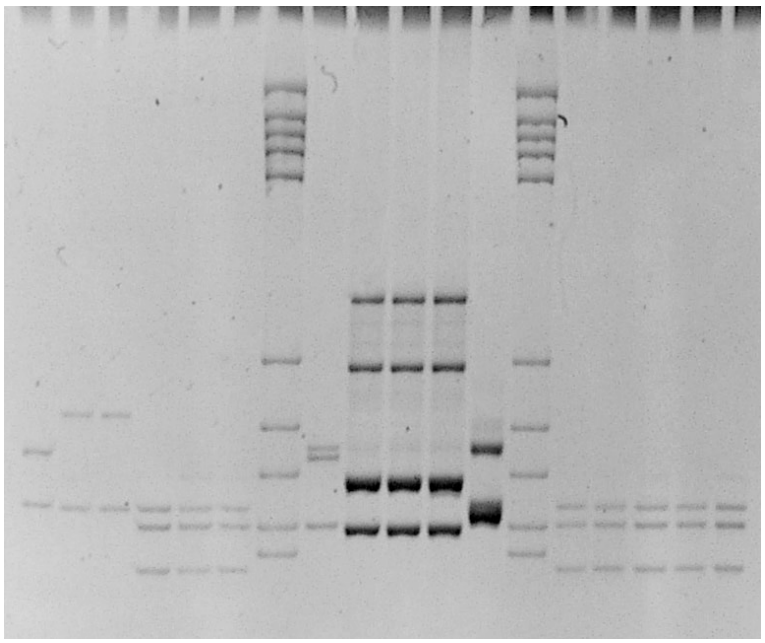
– мониторинг фитосанитарного состояния питомников и лесонасаждений (Центр защиты леса);

– генетическая паспортизация ценных генотипов (ИОГЕН РАН совместно с ВГЛТУ).

Выполнены крупные исследования по паспортизации отселектированных форм тополя и осины. С помощью подобранных микросателлитных праймеров и проведенного ПЦР-анализа установлены уникальные многолокусные комплексные генотипы исследованных образцов осины, диплоидных и ряда триплоидных клонов тополя сереющего. В то же время образцы тополя белого представлены всего тремя клонами: 1) идентичными оказались образцы 1, 2, 5, 6, 8; 2) имеющие другой генотип образцы 3, 4, 7 и 3) уникальный генотип был у образца 9. Для триплоидных гибридов тополей примененный метод показал высокую эффективность в подтверждения триплоидности, о чем свидетельствует наличие у одного и того же образца трех аллелей по использованным микросателлитным локусам. При этом образцы 18–20 (Хоперский 1) оказались идентичными между собой, как и образцы 23–24 (триплоид Гуляева), что подтверждает клональное происхождение этих образцов (рис. 3).



Рисунок 2 – Тополь Хоперский 1 на песчаных почвах Левобережного лесничества (конец июля 2018 г.). Высота дерева 7,0 м



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

Рисунок 3 Изменчивость по локусу WPMS19. 1–3 – гибриды тополь×осина; 4–6, 14–18 – тополь сереющий «Хоперский 1»; 7,13 – маркер длины pBR322 HaeIII; 8 – тополь сереющий “Приярский»; 9 – Э.С. – 38 «Воронежский гигант»; 10 – триплоид № 2 клон № 9; 11 – триплоид № 2 клон № 4; 12 – тетраплоид тополя бальзамического

Таким образом, используя ДНК – анализ, осуществлен подбор и тестирование микросателлитных локусов для генетической паспортизации посадочного материала тополя и осины. Все локусы, использованные при генотипировании представителей рода *Populus*, проявили достаточно высокую степень полиморфизма, и могут быть рекомендованы для использования в паспортизации, как уже существующих плантаций и архивов клонов, так и для закладки новых.

3. Создание биотехнологических форм деревьев с заданными признаками.

Экономическая эффективность лесонасаждений (лесных плантаций в частности) в первую очередь зависит от продуктивности и устойчивости к биотическим и абиотическим факторам среды используемых лесных пород. В свою очередь эти характеристики зависят от генетической ценности и качества посадочного материала. В Воронежском лесотехническом университете на базе Учебно-опытного лесхоза отселектированным материалом созданы экспериментальные культуры сортов тополя и березы регенерантами in vitro, культуры модифицированной осины, полученной в ИБХ РАН. Культуры модифицированной осины полностью погибли, так как неграмотно подобраны почвы, то есть надо соблюдать лесоводственные технологии выращивания на основе экологии осины.

4. Другим направлением использования быстрорастущего леса является его использование в качестве сырья для биотоплива. В лесхозах Курской области запущено производство получения пеллетов из отходов деревообработки (опилки, кора, щепа и т. п.). Быстрорастущие деревья являются также одним из эффективных способов борьбы с изменением климата в качестве поглотителей углекислого газа.

Таким образом, в лесном хозяйстве ЦЧР внедряется три направления биотехнологии: микроклональное размножение и создание плантационных культур, молекулярное (ДНК) маркирование для диагностики заболеваний растений и паспортизации селекционных форм и сортов древесных растений и производство получения пеллетов из отходов деревообработки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Исаков, И.Ю. Биотехнология в лесном хозяйстве [Текст] учебное пособие/ И.Ю. Исаков, А.И. Сиволапов, М.Ю. Нечаева. – Воронеж: ВГЛТУ, 2017. – 208 с.

2. Лесной кодекс Российской Федерации. Комментарии [Текст]: изд. 2-е, доп. / Под общ. Ред. Н.В. Комаровой, В.П. Рощупкина. – М.: ВНИИЛМ, 2007. – 856 с.

3. Сиволапов, А.И. Цитологические, молекулярные и лесоводственно-селекционные исследования коллекции полиплоидных тополей/ А.И. Сиволапов, Д.В. Политов, О.С. Машкина, М.М. Белоконь, В.А. Сиволапов, Ю.С. Белоконь, Т.М. Табацкая // Сибирский лесной журнал. – 2014. – № 4. – С. 50–58.

4. Сиволапов, А.И. Селекция и семеноводство древесных растений: уч. пособие [Текст] / А.И. Сиволапов. – Воронеж: ВГЛТА, 2011. – 204 с.

5. Сиволапов, В.А. Применение молекулярно-генетической диагностики для фитосанитарного обследования лесных питомников [Текст] / В.А. Сиволапов, Н.А. Карпеченко, В.Н. Вепринцев // Лесотехнический журнал. – 2014. – № 4. – С. 53–61.

6. Сиволапов, В. Плантационное лесовыращивание березы, ольхи и тополя с использованием биотехнологии in vitro / В. Сиволапов, А. Сиволапов, Т. Благодарова. Saarbrücken, Deutschland: LAP LAMVERT Academic Publishing, 2014. – 120 с. Электронная книга. http://dnb.d-nb.de

7. Сиволапов, А.И. Перспективные направления биотехнологии в подготовке специалистов для лесного комплекса ЦЧР [Текст] / А.И. Сиволапов, А.С. Черных, В.А. Сиволапов // Актуальная биотехнология, 2017. – № 2 (21). – С. 118 – 122.

8. Sivolapov A, Blagodarova T, and Sivolapov V Forty-five-year monitoring of selection stands of white (Populus alba L.), gray (Populus canescens Sm.), black poplar (Populus nigra L.) and willow (Salix alba L.) in Khoper State Natural Reserve. FORESTRY 2018. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 226 (2019) 011001. pp. 1–9.

9. Kulju K.K.M., Pekkinen M., Varvio S. Twenty-three microsatellite primer pairs for *Betula pendula* (Betulaceae) // Molecular Ecology Notes. 2004. V. 4. P. 471–473.

УДК 577.152.1

РАЗРАБОТКА НОВЫХ ФОРМ БИОПОЛИМЕРНЫХ НОСИТЕЛЕЙ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТОВ

П.Ю. Стадольникова, Б.Б. Тихонов, А.И. Сидоров

Тверской государственный технический университет, Тверь, Россия

Метод внутреннего гелеобразования (emulsification/internal gelation) является альтернативой экструзионному (внешнему) гелеобразованию в процессах инкапсуляции различных биологически активных веществ и иммобилизации ферментов [1]. Данный метод может использоваться для массового получения микросфер на основе альгината натрия малого диаметра (от десятков до сотен микрометров). Реакционная среда для получения гелевых шариков содержит, кроме альгината натрия, растительное масло, нерастворимый кальциевый комплекс, поверхностно-активное вещество и органическую кислоту. Внутреннее гелеобразование (желирование диспергированных в масляной фазе альгинатных капель) начинается с высвобождения катионов кальция из нерастворимого комплекса (соли кальция) посредством понижения pH [1, 2]. Таким образом, формирование микросфер происходит из водно-масляной эмульсии.

Целью работы был синтез альгинатных микросфер модифицированным методом внутреннего гелеобразования и оценка их внешних морфологических признаков.

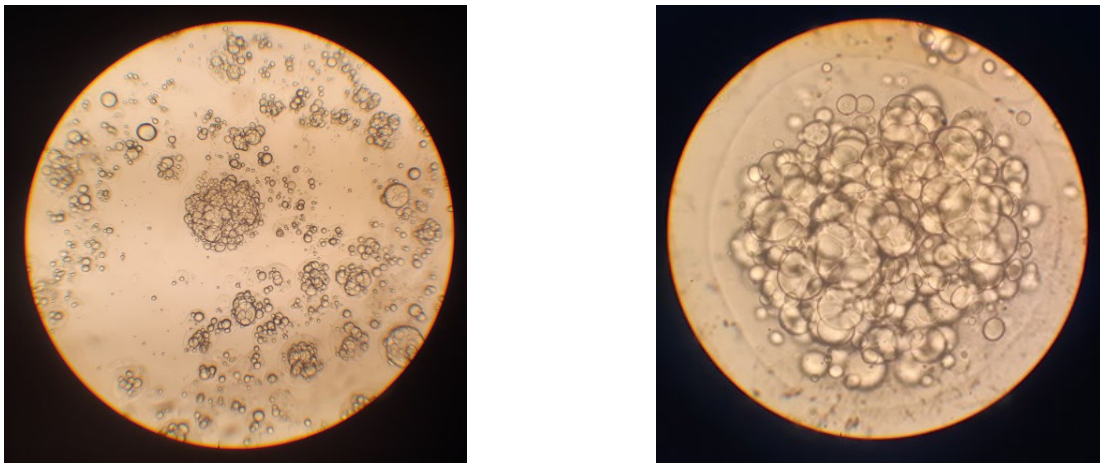
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Альгинатные микросферы были получены с помощью модифицированного метода внутреннего гелеобразования раствора альгината натрия, превращенного в эмульсию в растительном масле [2, 3]. Нерастворимый в воде карбонат кальция равномерно распределяется в растворе альгината, 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 $Ca^{2}+$ 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 мг 1,5 % раствора альгината 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 меньшей интенсивности в течение 30 минут. Для отделения образовавшихся гелевых кальций-альгинатных шариков от масляной фазы добавляется 250 мл 0,05 М раствора хлорида кальция, содержащего 1 % (об.) Tween 80. Полученные микросферы осаждаются из масляной фазы. Масло удаляется из системы путем декантации. Далее осадок альгинатных микросфер промывается 0,05 М раствора хлорида кальция, содержащего 1 % (об.) Tween 80. Микрочастицы отмываются несколько раз с помощью растворителя (в качестве которого могут использоваться вода, 1 % (об.) раствор Tween 80, ацетатный буферный раствор pH 4,0) до полного удаления следов масла, что контролировалось наблюдением в оптический микроскоп. Полученные частицы наблюдаются в световом поле оптического микроскопа при различных увеличениях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Свойства полученных микросфер – морфология, расположение, наличие и форма агрегатов, визуально оценивались с помощью оптического микроскопа Биомед-2. До начала промывки кальций-альгинатные гелевые частицы сферической формы преимущественно сгруппированы в отдельные кластеры, окруженные прозрачными оболочками (рисунок 1).

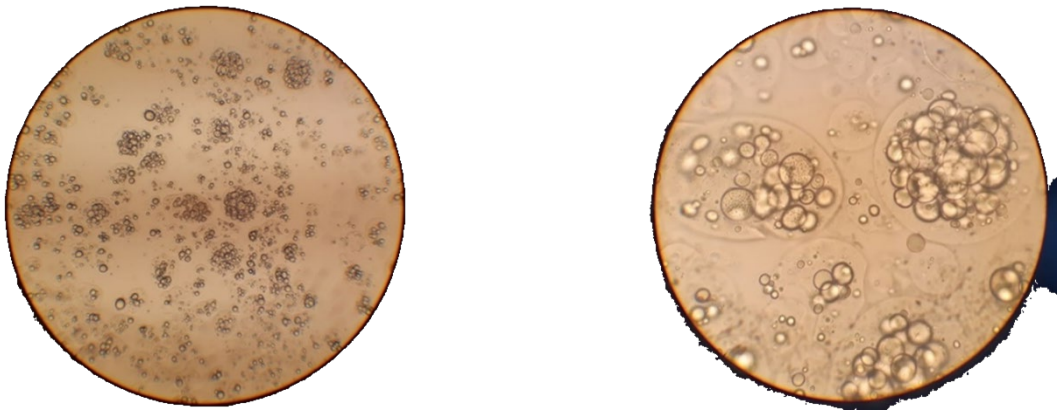


а) б)

Рисунок 1 – Альгинатные сферы, сгруппированные в агрегаты, до промывки (присутствуют следы растительного масла): а) – увеличение в 150 раз; б) – увеличение в 600 раз

Осадок альгинатных частиц отмывается от масла несколько раз с помощью растворителя, в качестве которого были использованы дистиллированная вода, 1 % (об.) раствор Tween 80, ацетатный буферный раствор pH 4,0. Микроскопирование образцов альгинатных шариков после осуществления промывок различными растворителями показывает, что структура и форма агрегатов претерпевает в ходе промывания тем или иным растворителем определенные изменения. Следует отметить, что при этом во всех случаях промывка не только удаляет все следы масла из образцов, но и превращает агрегаты в более оформленные отдельные структуры, дробя слипшиеся и неоформленные «агрегаты» частиц.

Внешние свойства кластеров кальций-альгинатных микросфер представлены на рисунках 2–4.



а) б)

Рисунок 2 – Альгинатные сферы, сгруппированные в агрегаты, после промывки водой: а) – увеличение в 150 раз; б) – увеличение в 600 раз

Очевидно, что промывка водой практически не изменяет изначальную структуру кластеров, не разбивая их на отдельные микросферы и не нарушая компоновки частиц внутри оболочек (рисунок 2). Промывка раствором сурфактанта (Tween 80) также не вносит кардинальных изменений в структуру агрегатов, оставляя такой же группировку микросфер внутри оболочек (рисунок 3).



а) б)

Рисунок 3 – Альгинатные сферы, сгруппированные в агрегаты, после промывки 1 % (об.) раствором Tween 80: а) – увеличение в 150 раз; б) – увеличение в 600 раз

Промывка буферным раствором привносит заметные изменения в структуру агрегатов, растворяя их оболочку и таким образом разбивая кластеры, в результате чего микросферы отделяются друг от друга (рисунок 4). Таким образом, происходит постепенное разрушение изначальных плотных агрегативных структур.



а) б)

Рисунок 4 – Альгинатные сферы, сгруппированные в агрегаты, после промывки ацетатным буферным раствором с pH 4,0: а) – увеличение в 150 раз; б) – увеличение в 600 раз

ВЫВОДЫ

С помощью модифицированной методики внутреннего гелеобразования были получены альгинатные микросферы. Морфология, расположение, наличие и форма агрегатов, визуально оценивались с помощью оптического микроскопа. Исследования показали существенные различия в форме и расположении микросфер, полученных с использованием различных растворителей при промывке.

Авторы благодарят Российский фонд фундаментальных исследований (грант № 18–08–00424) за финансовую поддержку.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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.

2. 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.

3 Poncelet 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.

УДК 637.523: 339.13

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛОКА КРОЛИКА В РАЗРАБОТКЕ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ ДЛЯ НОВОРОЖДЕННЫХ И НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ

Л.В. Антипова, А.О. Дарьин

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

На сегодняшний день остро стоит проблема здоровья детей и, особенно, новорожденных в России. Одним из демографических индикаторов выступает детская смертность, характеризующая состояние здоровья детей и новорожденных. Среди главных причин смерти грудничка можно назвать врожденные пороки новорожденных и патологии перинатального периода. Важным фактором поддержания здорового и слаженного формирования детского организма на ранних так и последующих этапах жизни является питание. Фактор питания имеет важную значимость в периоды заболеваний детей, что определено возрастными физиолого-биохимическими особенностями, незрелостью ряда органов и систем, потребностями в основных питательных веществах и энергии, а также ограничением резервных запасов и быстрым их истощением.

По данным Росстата показания детской смертности в РФ снизились до 5,1 случая в 2018 году и до 4,3 за первые три месяца 2019 года на 1000 родившихся. Но все-таки ситуация остается острой и требует разработки действующих мер, порой улучшающие ситуацию. На начальных этапах кормления молоко занимает основное место в становлении здоровья, т. е. женское молоко сложная биологическая жидкость, которая образуется в молочной железе самок млекопитающих и обладает высокой пищевой ценностью, иммунологическими и бактерицидными свойствами. Рождение детей в неплановые периоды изменяет характеристики молока или нелактации, в результате чего создает негативные условия выхаживания детей и обеспечения питанием требуемого качества. Поэтому перспективный путь решения проблемы – поиск новых сырьевых источников, как альтернатива женскому молоку. Особый интерес представляет кроличье молоко, за счет которого у крольчат увеличивается масса тела в 40 раз за 4 недели, стимулируя развитие организма [1,5].

Целью работы состояла в сравнении, оценке молока кроликов, как источника основных питательных веществ, для оценки возможности использования питания недоношенных детей.

Показатели определяли на базе известных современных методов исследований в условиях сертифицированных лабораторий. Как видно из данных таблицы 1 молоко кроликов по содержанию белка превышает в 4 раза коровье и козье, а женское молоко в 9 раз, но уступает по содержанию сахара – лактозы примерно в 5 раз [2, 3].

Органолептические показатели кроличьего молока: имеет белый цвет с кремовым оттенком, сливкообразной консистенцией, без запаха с солоноватым привкусом [4].

В таблице 2 представлен сравнительный анализ аминокислотного состава белков различных видов молока. В ходе экспериментальных исследований показано, что лимитирующими аминокислотами в коровьем и козьем молоке являются метионин, в то время как в кроличьем помимо метионина, также лимитирующими являются фенилаланин и триптофан.

Таблица 1. Физико – химические показатели

Наименование показателя	Коровье молоко	Кроличье молоко	Козье молоко	Женское молоко (стадия гестации 30 неделя)
Массовая доля жира, %	3,6	10,0	3,8	3,0
Массовая доля белка, %	3,3	12,6	3,3	1,36
Массовая доля сахара (лактозы), %	4,7	0,899	4,1	6,8

Установлено, что расчетная биологическая ценность кроличьего молока по аминокислотам находится между коровьим и козьим молоком, но также отмечено увеличение в составе белков незаменимой аминокислоты для детского организма – аргинина, оно превысило коровье, козье в 4,5 – 5,0 раз, но в 1,5 раза меньше чем в грудном молоке. Выявлено уменьшение в 3 раза содержания незаменимой аминокислоты метионина в женском молоке (стадии гестации 30 неделя) в сравнении с другими видами молока.

Исследовав минеральный состав, можно сказать, что кроличье молоко по основным минеральным веществам превосходит женское молоко (таблица 3). Большое значение для формирования костных тканей организма человека, особенно в детском возрасте, имеют соли кальция, содержание которых в кроличьем молоке составило 1,08 мас %, что значительно (в 9 раз больше), чем в женском молоке (стадия гестации 30 неделя), а также увеличение калия, натрия, фосфора, создающие и поддерживающие осмотическое давление и буферные системы крови [2].

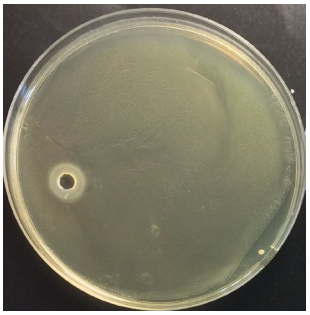
На рисунках 1 и 2 представлены результаты исследований активности лизоцима. При сравнении женского (грудного) молока на стадии гестации 30 недели и молока кролика установлено, что в последнем зона лизиса увеличилась в 1,5 раза. Это свидетельствует о том, что молоко кроличьихи обладает больше иммунологическим и бактерицидным действием

Таблица 2 Аминокислотный состав

Наименование аминокислоты	Шкала ФАО / ВОЗ, г / 100г белка	Содержание незаменимых аминокислот, г / 100г белка			
		коровье молоко	козье молоко	Женское молоко (стадия гестации 30 неделя)	кроличье молоко
Валин	5,0	6,4	6,48	4,27	5,46
Изолейцин	4,0	4,7	4,18	3,88	4,25
Лейцин	7,0	9,5	8,45	7,65	9,01
Лизин	5,5	7,8	7,29	5,48	6,34
Метионин	3,5	3,3	3,0	0,05	2,6
Треонин	4,0	4,4	4,88	3,73	4,48
Триптофан	1,0	1,4	1,22	0,64	0,65
Фенилаланин	6,0	8,2	8,7	3,22	4,3
Аргинин	5,8	3,5	2,67	26,72	15,16
		Аминокислотный скор, %			
Изолейцин		117,5	104	97	106
Лейцин		136	120	109	128
Лизин		142	132	100	115
Метионин		94	85	1,4	74
Треонин		110	122	93	112
Триптофан		140	122	64	65
Фенилаланин		170	145	54	72
Валин		128	129	85	109
КРАС, %		31,2	34,8	74,03	32,6
БЦ, %		68,8	65,2	25,9	67,4

Таблица 3 Минеральный состав

Минеральные вещества	Кроличье молоко, мас %	Женское молоко (стадия гестации 30 неделя), масс %
Натрий	0,25	0,15
Магний	0,075	0,017
Алюминий	0,011	0,011
Кремний	0,025	0,023
Фосфор	0,69	0,063
Сера	0,35	0,078
Хлор	0,37	0,25
Калий	0,47	0,26
Кальций	1,08	0,11



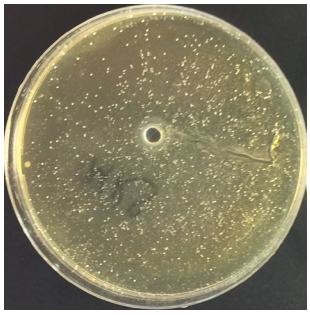


Рисунок 1 Определение активности лизоцима в женском (грудном) молоке (стадия гестации 30 неделя) на питательной среде МПА и МРС с культурой стрептококка





Рисунок 2 Определение активности лизоцима в молоке кролика на питательной среде МПА и МРС с культурой стрептококка

Из полученных данных установлено, что кроличье молоко, обладая высокой пищевой ценностью, а также иммунологическим и бактерицидным действием, рекомендуется использовать, как альтернатива женскому молоку, а также в создании функциональных продуктов питания для питания новорожденных, в частности недоношенных детей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антипова Л.В. Комплексная переработка кроликов: традиции и инновации [Текст]: Л.В. Антипова, С.А. Сторублевцев, М.Е. Успенская, Я.А. Попова, М.С. Болдырева / Воронеж, 2017. – 377 с.

2. Горбатова К.К. Биохимия молока и молочных продуктов: учеб. К.К. Горбатова, П.И. Гунькова; под общ. ред. К.К. Горбатовой. – 4-е изд., перераб. и доп. – С П б .: ГИОРД, 2010. – 336 с 3. Трухачев В. Безопасность производства и повышение качества молока – основа принципов ХАССП / В. Трухачев, О. Сычева, Н. Сарбатова, Н. Злыднев, П. Миткалов // Молочное и мясное скотоводство. – 2008 – № 1 С. – 15–16.

4 Комлацкий В.И. Эффективное кролиководство: учеб. пособие / В.И. Комлацкий, С.В. Логинов, Г.В. Комлацкий, Я.А. Игнатенко. – Краснодар: КубГАУ, 2013. – 224 с.

5 Антипова, Л.В. Молекулярно-биологические основы питания [Текст]: Учебник/Л.В. Антипова, С.А. Сторублевцев, М.Е. Успенская / Воронеж-ВГУИТ. – 2015. – 542 с

УДК 579.64

АНТАГОНИСТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ РИЗОСФЕРНОЙ БАКТЕРИИ *PSEUDOMONAS ASPLENII* 11RW ПРОТИВ ПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР

С.Н. Масленникова, С.Д. Каракотов

Марийский государственный университет, Йошкар-Ола, Россия
АО «Щелково Агрохим, Щелково, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Фитопатогенные грибы ежегодно приводят к значительным потерям и повреждению сельскохозяйственной продукции, снижают урожайность, негативно влияют на хранение зерновых и овощных культур и представляют серьезную опасность для здоровья человека и животных из-за синтеза и накопления микотоксинов.

Одним из наиболее многообещающих способов контроля фитопатогенных грибов является использование микробиологических агентов [1–4]. Использование бактерий, способствующих росту растений (PGPR), с антифунгальными свойствами является более безопасной альтернативой химическим средствам защиты [5]. Бактерии рода *Pseudomonas* в этом отношении являются одними из наиболее перспективных объектов благодаря синтезу различных биологически активных веществ: фитогормонов (ИУК, цитокинины, гиббереллины), гидролитических ферментов [6], хелатирующих железо сидерофоров, циклических липодепсипептидов [7], антибиотиков [8, 9] (2,4 – диацетилфлороглюцин, пиолютеорин, пирролнитрин и цианистый водород) и др. Поэтому поиск новых эффективных штаммов является перспективной и актуальной задачей сельскохозяйственной микробиологии.

Целью данного исследования явился анализ антагонистической активности ризосферного штамма *Pseudomonas asplenii* 11RW против фитопатогенных грибов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали бактериальный штамм *Pseudomonas asplenii* 11RW, выделенный из ризосферной почвы озимой пшеницы (Краснодарский край).

Изучаемую культуру выращивали на жидкой среде King’s B в шейкере-инкубаторе (Infors HT Ecotron) при 220 об/мин и 30 °С в течение 24 ч.

Анализ фунгицидной активности штамма

Для анализа в чашки Петри разливали по 20 мл стерильной картофельно-сахарозной среды с 2 % агара. Готовили суспензию спор и мицелия гриба. Для этого 1/8 часть агара, засеянного грибом,

переносили в стерильную чашку Петри, добавляли 10 мл стерильной воды и смывали конидии и мицелий стерильным шпателем. После чего добавляли 20 мкл полученной суспензии в 4,98 мл остуженной до 45 °С картофельно-сахарозной среды с 1,2 % агара, тщательно перемешивали и разливали в чашки Петри вторым слоем. Через 1 час в агаре делали «лунки», в которые вносили по 100 мкл суспензии *P. asplenii* 11RW. Посевы культивировали 4–10 суток при температуре 20 °С, после чего регистрировали наличие или отсутствие зон угнетения роста фитопатогенов.

Изучение активности летучих органических соединений

Для *in vitro* анализа эффекта летучих органических соединений (ЛОС) использовали методику, описанную Гарбевой с соавт. [10]. Анализируемая бактериальная суспензия вносилась в стерильный картофельно-сахарозный агар (40–45 °С) и разливалась по 20 мл на дно чашек Петри. В качестве контроля выступал КСА без внесения бактериальной суспензии. На крышки чашек разливали по 12 мл стерильного водного агара, в центр которых помещали блоки агара диаметром 1 см, вырезанные из посевов фитопатогенных грибов. Чашки Петри закрывали, стык заклеивали парафильмом. Посевы инкубировали при 25 °С в течение 4–10 суток (в зависимости от скорости роста гриба), после чего измеряли средний диаметр колонии, сравнивали с контрольными значениями и оценивали влияние ЛОС на развитие гриба.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фунгицидная активность исследуемой культуры проверялась на 46 штаммах фитопатогенных грибов различной таксономической принадлежности (р. *Alternaria, Fusarium, Cercospora, Phytophthora, Bipolaris, Pyricularia* и др.) из коллекции патогенных микроорганизмов АО «Щелково Агрохим». Результаты анализа выявляют мощное фунгицидное действие штамма *P. asplenii* 11RW: данная бактерия активно ингибирует рост 44 из 46 проанализированных тест-объектов различного таксономического положения при высокой нагрузке фитопатогенного фона. Результаты представлены в табл. 1.

Особой группой антифунгальных соединений являются летучие бактериальные экзометаболиты, к которым относятся цианиды. Благодаря активному выделению летучих цианидов, обладающих высокой проникающей способностью, ризобактерии могут обладать активными защитными свойствами. Многие штаммы *Pseudomonas*, обладающие фунгицидной активностью, могут продуцировать цианиды в виде летучего цианистого водорода в присутствии предшественника глицина, широко встречающегося в корневых экзометаболитах [11].

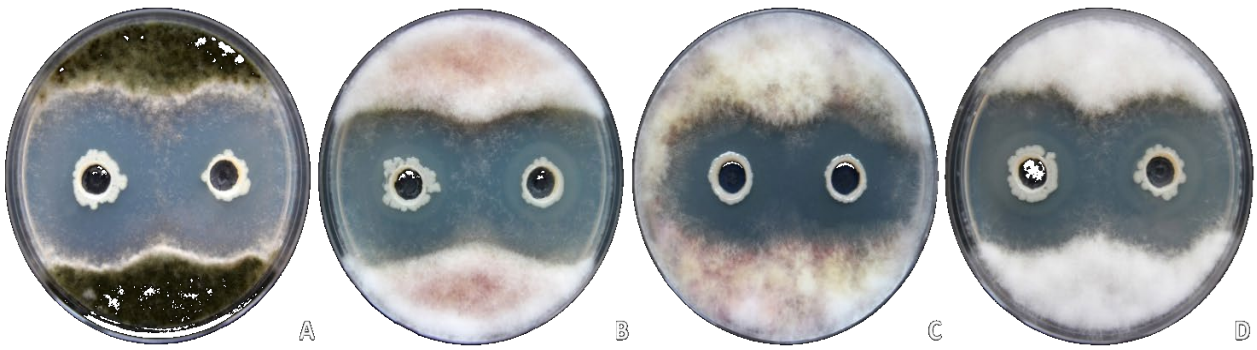
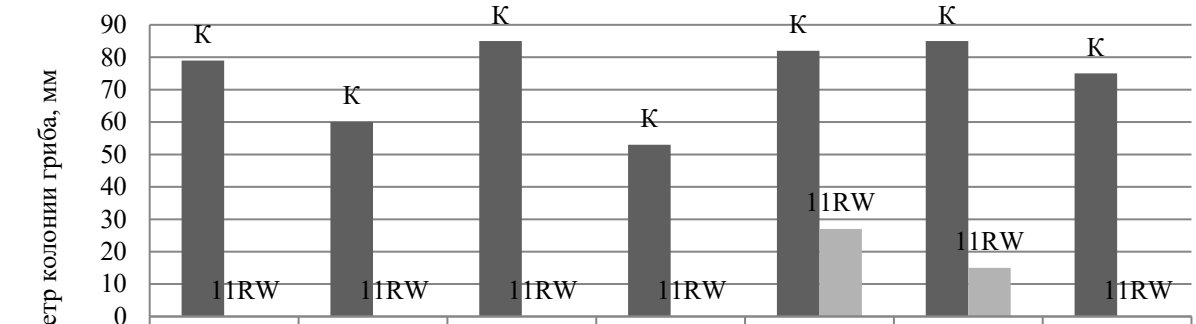


Рисунок 1 – Результаты анализа фунгицидной активности штамма Pseudomonas asplenii 11RW против Alternaria tenuissima 481–101 (A), Fusarium culmorum 63 (B), Fusarium graminearum 58918 (C), Fusarium oxysporum F-55071 (D)

Показано, что штамм *P. asplenii* 11RW продуцирует летучие органические соединения, обладающие антагонистическим действием против фитопатогенных грибов (рисунок 2), к примеру, в бесконтактных системах разрастание мицелия грибов *A. tenuis, D. avenae, Rh. solani* и *Septoria* sp. под влиянием летучих метаболитов штамма 11RW полностью отсутствовало.

Таблица 1 – Результаты анализа фунгицидной активности штамма

Источник выделения	Фитопатоген	Средний диаметр зоны подавления роста фитопатогенного гриба, мм
Пшеница	Alternaria tenuissima 481–101	47
	Bipolaris sorokiniana	42
	Fusarium avenaceum 45	25
	Fusarium graminearum 58918	35
	Fusarium graminearum 159811	25
	Fusarium oxysporum F-55071	44
	Fusarium oxysporum 96801	0
	Fusarium solani 104803	17
	Fusarium sporotrichioides 58871	35
	Fusarium sporotrichioides 58878	35
	Fusarium tricinctum 58869	18
	Fusarium verticillioides 58919	18
	Fusarium ussurianum 29813	72
	Septoria sp.	70
Ячмень	Fusarium culmorum 30	70
	Fusarium sibiricum 11007	72
	Fusarium sporotrichioides 88503	20
Овёс	Drechslera avenae	53
	Fusarium poae MFG 103403	32
	Penicillium sp. 126900	19
Рожь	Fusarium culmorum 63	40
Сахарная свёкла	Alternaria alternata	51
	Cercospora beticola B-3191	58
	Cladosporium herbarum	58
	Epicoccum purpurascens	37
	Fusarium solani	0
	Helminthosporium sativum	45
	Phoma betae	46
Картофель	Alternaria solani 473	47
	Phytophthora infestans 40	24
Лён	Colletotrichum lini 707	52
	Colletotrichum lini 713	39
	Fusarium oxysporum 352	22
	Ozonium vinogradovi 2	72
Рис.	Pyricularia oryzae 16	77
	Pyricularia oryzae 18	72
Хлопчатник	Verticillium dahliae 34/1	33
	Verticillium dahliae TA-4	52
Подсолнечник	Aspergillus niger	25
Нут	Ascochyta rabiei	33
Дыня	Fusarium sp. F-846	33
Фитопатогены, выделенные из почвы	Alternaria alternata 245	43
	Bipolaris sorokiniana 130	40
	Microdochium nivale	18
	Monilia fructigena 483	60
	Rhizoctonia solani 170	60



	Alternaria tenuis	Drechslera avenae	Rhizoctonia solani	Septoria sp.	Fusarium oxysporum F-55071	Fusarium sporotrichioides 58871	Fusarium ussurianum 29813
Контроль	79	60	85	53	82	85	75
11RW	0	0	0	0	27	15	0

Рисунок 2 – Средний диаметр колоний грибов, культивируемых в условиях влияния ЛОС штамма *Pseudomonas asplenii* 11RW в сравнении с контролем (К)

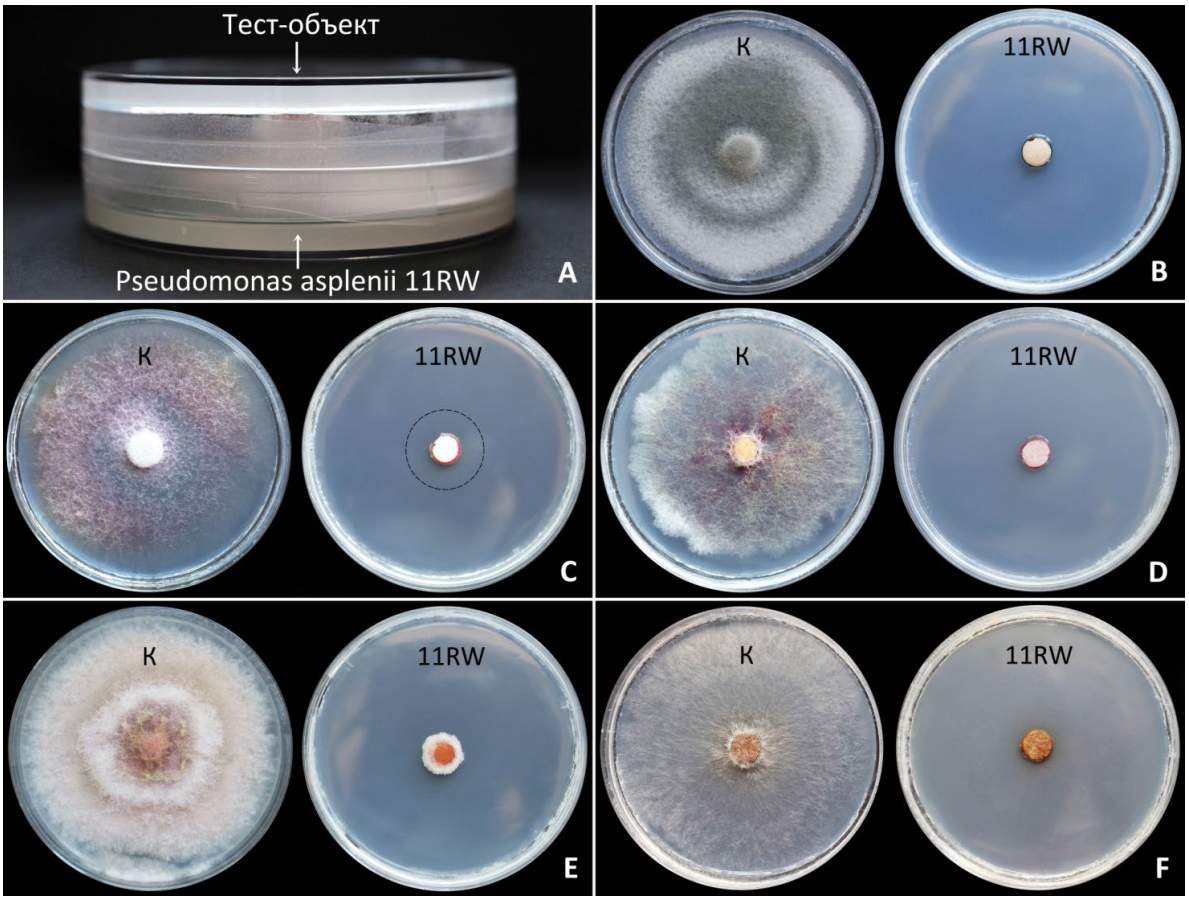


Рисунок 3 – Вид бесконтактной системы (A) и результаты оценки влияния ЛОС, выделяемых штаммом Pseudomonas asplenii 11RW, на рост Alternaria tenuis (B), Fusarium oxysporum F-55071 (C), Fusarium ussurianum 29813 (D), Fusarium sporotrichioides 58871 (E) и Rhizoctonia solani 170 (F) в сравнении с контролем (К)

Таким образом, было продемонстрировано, что изучаемый штамм *Pseudomonas asplenii* 11RW обладает высоким антагонистическим потенциалом и способен активно ингибировать рост фитопатогенов за счет синтеза биологически активных соединений при совместном культивировании гриба и бактерии, а также подавлять развитие патогенов без непосредственного контакта за счет синтеза летучих органических соединений. При этом отмечается широкий спектр фунгицидной активности штамма. Поэтому ввиду высокой перспективности штамма планируется дальнейшее исследование возможности использования *Pseudomonas asplenii* 11RW для создания эффективной системы биоконтроля.

ЛИТЕРАТУРА

Khokhar M.K., Gupta R., Sharma R. Biological Control of Plant Pathogens using Biotechnological Aspects: A Review. 2012; 1:277;

Perez-Gracia A., Romero D., Zeriouh H., Vicente A. Biological control of phytopathogenic fungi by aerobic endospore-formers. In: Logan NA, Vos PDe. Endospore-forming Soil Bacteria. Soil Biology 27, Berlin Heidelberg: Springer; 2011; 157–180;

Cal A., Larena I., Guijarro B., Melgarejo P. Use of Biofungicides for Controlling Plant Diseases to Improve Food Availability. 2012; 2:109–124;

Recep K., Fikrettin S., Erkol D., Cafer E. Biological control of the potato dry rot caused by Fusarium species using PGPR strains. 2009; 50:194–198;

Compant S., Duffy B., Nowak J., Clement C., Barka E.A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects, Applied and Environmental Microbiology, 2005; 71(9), 4951–4959;

Chernin L., Chet I. Microbial enzymes in biocontrol of plant pathogens and pests, in Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications. 2002; 171–225;

Dalla Serra M., Menestrina G., Carpaneto A., Gambale F., Fogliano V., Ballio A. Molecular mechanisms of action of syringopeptins, antifungal peptides from Pseudomonas syringae pv. syringae, in Pore-Forming Peptides and Proteins Toxins, G. Menestrina, M. Dalla Serra, and P. Lazarovici, Eds. 2003; 272–295;

Raaijmakers J.M., Vlami M., de Souza J.T. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents, Antonie van Leeuwenhoek. 2002; 81(1–4), 537–547;

Ramette A., Frapolli M., Defago G., Moënne-Loccoz Y. Phylogeny of HCN synthase-encoding hcnBC genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability, Molecular PlantMicrobe Interactions. 2003; 16(6), 525–535;

Garbeva P., Hordijk C., Gerards S., de Boer W. Volatiles produced by the mycophagous soil bacterium *Collimonas*. FEMS Microbiol Ecol. 2014; 87: 639–649;

Voisard C., Bull C.T., Keel C., Laville J., Maurhofer M. Biocontrol of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: current concepts and experimental approaches. O'Gara F., Dowling D.N., Boesten B. (eds) Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms. 1994; 67–89.

УДК 615.28

ПОИСК БАКТЕРИОЦИНОГЕННЫХ ШТАММОВ СРЕДИ ИНДИГЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ МЯСА И ПЕРСПЕКТИВА ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОТИВ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ.

Е.В. Зайко, Д.С. Батаева

Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, Москва, Россия

В 1928 году британский бактериолог Александр Флеминг обнаружил пенициллин, первый в мире антибиотик [1]. С тех пор было открыто большое количество различных антибиотиков, которые широко использовались для лечения заболеваний в клинической медицине, спасая бесчисленное количество жизней [2]. Однако злоупотребление антибиотиками для лечения людей и бесконтрольное использования их в животноводстве привело к формированию полирезистентных штаммов бактерий. И как следствие этому, последнее десятилетие ознаменовалось мировой борьбой с распространением устойчивых к антибиотикам штаммов бактерий, которые представляют опасность как для человека, так и для животных. Продукты питания являются одним из звеном в передачи микроорганизмов, в том числе устойчивых, к человеку.

Сопротивление лекарственным средствам представляет серьезную угрозу для здоровья населения и безопасности пищевых продуктов и является главной проблемой современного общества. Поэтому необходима замена традиционных антибиотиков новыми противомикробными веществами, которые вызывают меньше побочных эффектов и к которым микроорганизмы менее склонны к резистентности. В настоящее время в качестве подходящей альтернативы рассматриваются применения некоторых бактериальных пептидов с антимикробным потенциалом. Среди них большое внимание уделяется бактериоцинам, благодаря их высоким терапевтическим показателям и нетоксичной природы. Одними из основных продуцентами бактериоцинов являются молочнокислые бактерии (LAB). Они встречаются в большинстве ферментированных продуктов как в качестве естественной микрофлоры, так и в качестве исходных культур, добавленных в процессе производства.

Будучи потенциальными ингибиторами различных патогенов и не вызывающими устойчивость у бактерий бактериоцины повысили интерес многочисленных ученых к работе в области создания лекарств на основе бактериоцинов [6].

Одним из вариантов компенсации недостатка новых антибиотиков является введение бактериоцинов в качестве терапевтических средств в клинической медицине. Бактериоцины являются синтезированными рибосомами антимикробными пептидами, продуцируемыми бактериями, и могут проявлять как узкий спектр активности (нацеленные на представителей одного и того же вида), так и более широкий спектр активности (нацеленные на другие виды и роды бактерий) (Cotteretal., 2013). Поэтому бактериоцины считаются перспективными альтернативами традиционным антибиотикам [7].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования были использованы штаммы молочнокислых бактерий, выделенные с поверхности туш КРС путем взятия смывов. Для этого смывы заливали MRS бульоном (Merck) и культивировали при температуре 30 °Св течение 48 часов. По истечении времени инкубации делали рассев на питательную среду MRS агар (Merck). Принадлежности выделенных бактерий к молочнокислым микроорганизмам проводили согласно ГОСТ 10444.11–2013 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчета мезофильных молочнокислых микроорганизмов». Культуры, относящиеся к молочнокислым, исследовали на способность продуцировать бактериоцины.

Для оценки их бактериоциногенных свойств в качестве тест штамма использовали Salmonella enteritidis, проявляющую устойчивость к тетрациклину в концентрации 30 мкг. Для исследования потенциальной бактериоциногенности проводили исследования методом двухслойных агаров. В чашки Петри заливали слой полужидкого MRS агар, после застывания среды в неё вносили уколом культуру МКБ в область полурадиуса чашки Петри. Чашки с посевами инкубировали при температуре (30 ± 2)°С в течение 3 сут для разрастания культуры и накопления бактериоцина в питательной среде. По истечении этого времени поверх слоя полужидкого агара MRS заливали тонкий слой мягкого питательного агара, зараженного целевым тест-штаммом. В качестве контрольного образца инкубировали зараженный патогеном мягкий питательный агар, залитый в стерильную чашку Петри. Чашки инкубировали при температуре (37 ± 2)°С в течение 24 часов (совместное культивирование), после чего проводили визуальную оценку ингибирования роста.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из отобранных смывов с туш КРС были выделены 36 культур, из которых только 14 штаммов по результатам идентификации были отнесены к молочнокислым бактериям и были отобраны для изучения их бактериоциногенности.

В результате исследования антагонистической активности 14 штаммов к Salmonella enteritidis, устойчивой к тетрациклину, были отобраны 2 штамма молочнокислых бактерий проявляющих наибольшую активность (рис. 1,2).

В дальнейшем штаммы, проявляющие наибольшую антимикробную активность были идентифицированы как Lactobacillus plantarum (БЦ1) и Lactobacillus brevis (БЦ 16).

Отобранные 2 штамма были исследованы на антимикробную активность к бактериям рода Salmonella, выделенным из пищевых продуктов и устойчивых к различным видам антибиотиков. Результаты представлены в таблице 1.



Рисунок 2. Чашки Петри с ростом целевого тест-штамма Salmonella enteriditis поверх роста МКБ: 1) рост колоний МКБ в MRS-агаре; 2) зона ингибирования роста целевого тест-штамма в верхнем слое агара

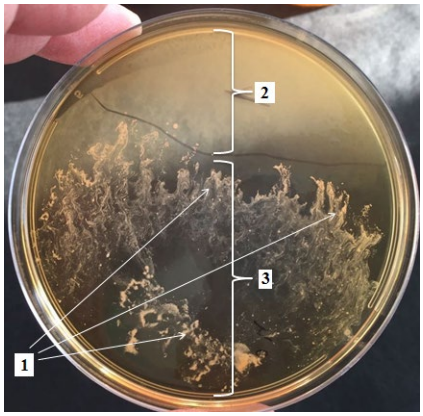


Рисунок 3. Чашки Петри с ростом Salmonella enteriditis поверх роста МКБ: 1) рост колоний МКБ в MRS-агаре; 2) зона сплошного роста целевого тест-штамма в верхнем слое агара; *3*) зона отсутствия роста целевого тест-штамма в верхнем слое агара

Таблица 1

Идентификация бактерий рода Salmonella	Фенотипический профиль устойчивости к антибиотикам	Зона ингибирования роста БЦ 1, мм	Зона ингибирования роста БЦ 16, мм
S1	Тетрациклин 30 мкг	8	7
S3	Бензилпенициллин 10 ЕД	10	8
S4	Амоксициллин 20 мкг	11	9
S5	Гентамицин 10 мкг	8	5
S6	Тетрациклин 30 мкг Амоксициллин 20 мкг	9	9
S7	Ципрофлоксацин 5 мкг	12	10

Таким образом, в результате проведенных исследований были отобраны штаммы молочнокислых бактерий Lactobacillus plantarum (БЦ1) и Lactobacillus brevis (БЦ 16) проявляющих антагонистическую активность как к монорезистентным штаммам бактерий рода Salmonella, так и к мультирезистентным штаммам.

ЛИТЕРАТУРА

Guzman J.D. Antimycobacterials from natural sources: ancient times, antibiotic era and novel scaffolds // J.D. Guzman , A. Gupta, F. Bucar, S. Gibbons , S. Bhakta / Frontiers in bioscience. – 2012. – 17. – 1861–1881.

Alharbi S.A. What if fleming had not discovered penicillin? // S.A. Alharbi, M. Wainwright? T.A. Alahmadi, H.B. Salleeh, A.A. Faden, A. Chinnathambi / Saudi Journal of Biological Sciences. – 2014. – 21(4). – 289–293.

БатаеваД.С. Риски, связанные с наличием в мясе и в продуктах убоя животных остаточных количеств антимикробных препаратов // Д.С. Батаева, Е.В. Зайко / Теория и практика переработки мяса. – 2016. – 1(3). – 4–13.

Blackburn P. In International Patent No. PCT/US89 / 02525 // J. Polak, S. Gusik, S.D. Rubino / International Publication no. W089 / 12399. – 1989. New York USA.

Severina E. Antibacterial efficacy of nisin against multidrug-resistant Gram-positive pathogens // E. Severina, A. Severin, A. Tomasz / J. Antimicrob. Chemother. – 1998. – 41. – 341–347.

Cotter P.D. Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics // P.D. Cotter, R.P. Ross, C. Hill / Nature Reviews Microbiology. – 2013. – 2(11). – 95–105.

Bastos M.C.F. Staphylococcal antimicrobial peptides: relevant properties and potential biotechnological applications // M.C.F. Bastos, H. Ceotto, M.L.V. Coelho, J.S. Nascimento /Current Pharmaceutical Biotechnology. – 2009. – 10. – 38–61.

УДК 57.042

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ОСВЕЩЕННОСТИ НА КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРОВОДОРОСЛИ CHLORELLA SOROKINIANA В ЛАБОРАТОРНОМ БИОРЕАКТОРЕ

М.С. Никитина, Т.А. Кузнецова

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Высшая школа биотехнологий и пищевых производств, Санкт-Петербург, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Одноклеточная водоросль Chlorella sorokiniana – перспективный объект биотехнологического исследования, обладающий интенсивными темпами роста, неприхотлива к условиям культивирования [4]. Биомасса C. sorokiniana является источником ценных компонентов: белков, углеводов, липидов и биологически активных веществ [1]. Высокое содержание пигментов (3,5 % в сухой биомассе), в том числе каротиноидов, позволяет использовать биомассу в получении концентратов пигментного комплекса, которые можно использовать в пищевых производствах. Известно, что пигменты обладают выраженными антиоксидантными свойствами [6].

Ряд факторов, влияющих на обмен веществ в клетках микроводорослей в период культивирования, позволяют увеличить синтез метаболитов, что является основой направленного культивирования.

Дозированное ультрафиолетовое излучение (УФ), по мнению ряда авторов, может оказывать и стимулирующее, и угнетающее влияние [3]. Малые дозы УФ в сочетании с фотосинтетически активной радиацией (ФАР) во время роста популяции клеток *C. sorokiniana* могут оказывать положительное влияние на фотозищитные механизмы водорослей, что предполагает интенсивный синтез каротиноидов [3].

Цель исследования – определение влияния дозированного УФ излучения на процесс культивирования одноклеточных водорослей *C. sorokiniana*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования использовали штамм *C. sorokiniana* 211–8k. Культивирование проводили в лабораторном биореакторе цилиндрической формы объемом 0,5 л [5] [8], в универсальной питательной среде, сбалансированной по макро- и микроэлементам [2]. Перемешивание осуществляли барботированием воздухом с помощью компрессора Xilon AP-001, в режиме 1,5 л/мин. Температурный диапазон культивирования 20–23 °С.

Режимы освещенности «день-ночь» (16–8 ч.):

вариант 1 – контроль, лампа дневного света (ФАР), интенсивность – 2500 ± 200 Лк, Т(К) – 400;

вариант 2 – УФ1, периодическое УФ-облучение в течение 15 мин. в сутки ртутной газоразрядной лампой со спектральной областью светового потока 320–400 нм (УФ А), интенсивность 1300 Лк и дальнейшим освещением лампой дневного света (интенсивность – 2500 ± 200 Лк, Т(К) – 400);

вариант 3 – УФ2, освещенность лампой дневного света (интенсивность – 2500 ± 200 Лк, Т(К) – 400), ультрафиолетовое облучение в течение 30 мин. на завершающей фазе культивирования (стабилизации).

Культивирование проводили в двукратной повторности.

Для определения концентрации клеток в суспензии водорослей была найдена линейная зависимость между оптической плотностью (при 750 нм, в кювете сравнения питательная среда) и концентрацией клеток в суспензии. Концентрация клеток в суспензии была определена с помощью камеры Горяева.

Отделение жидкой фазы от биомассы проводили центрифугированием в режиме 6000 об./мин. в течение 5 мин. с дальнейшим декантированием надосадочной жидкости. Биомасса в дальнейшем высушивалась на воздухе при 20–23 °С в темном месте. Содержание влаги в воздушно сухой биомассе не превышало 2 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кривая культивирования *C. sorokiniana* представлена на рисунке 1. Начальная концентрация клеток – 4,6 млн. кл./мл. Лаг-фаза составляет 1 сутки во всех вариантах эксперимента.

Фаза интенсивного роста в контрольном варианте и варианте УФ2 составляет 10–11 суток, а в варианте УФ1 сокращена до 8–9 суток. Фаза стабилизации в варианте УФ2 характеризуется изменением цвета, суспензия приобретает желтый оттенок.

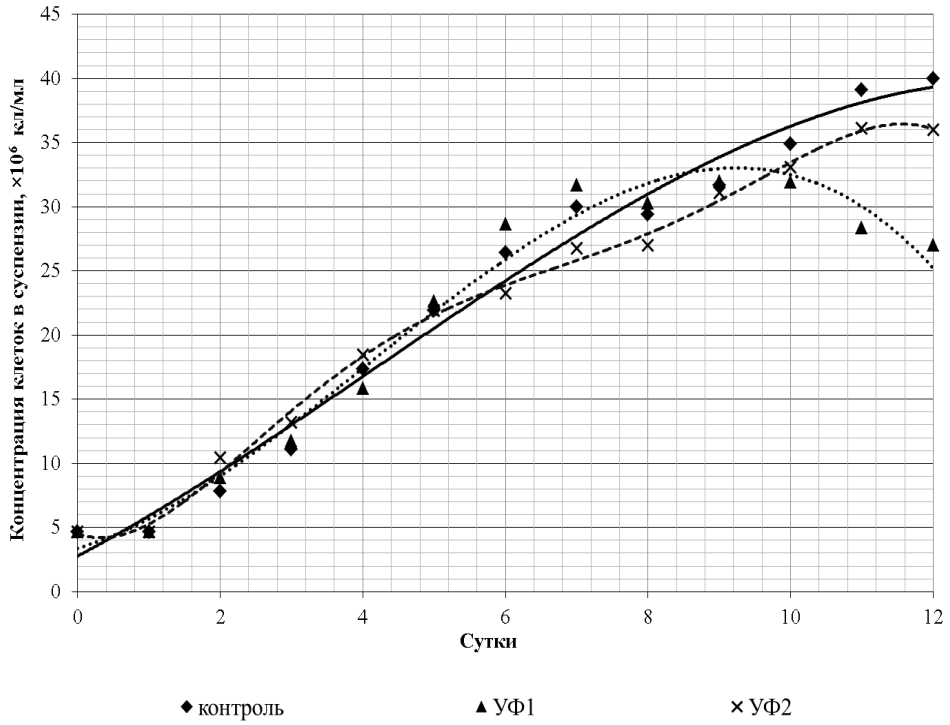


Рисунок 1 – Кривые культивирования C. sorokiniana в различных условиях освещенности: ── – контроль (освещение лампами дневного света); ····· – УФ 1 (периодическое воздействие ультрафиолетовым излучением); ---- – УФ 2 (воздействие ультрафиолетом в фазу истощения)

На рисунке 2 изображен выход сухой биомассы, полученной в ходе культивирования при разных условиях освещенности. Отмечено, что при однократном воздействии УФ-облучения уменьшения выхода биомассы не имеет достоверных отличий, а периодическое облучения (УФ1) приводит к существенному снижению выхода биомассы, в среднем на 48 %. Подобное уменьшение, судя по кривой культивирования, происходит в заключительную фазу культивирования после 9 суток.

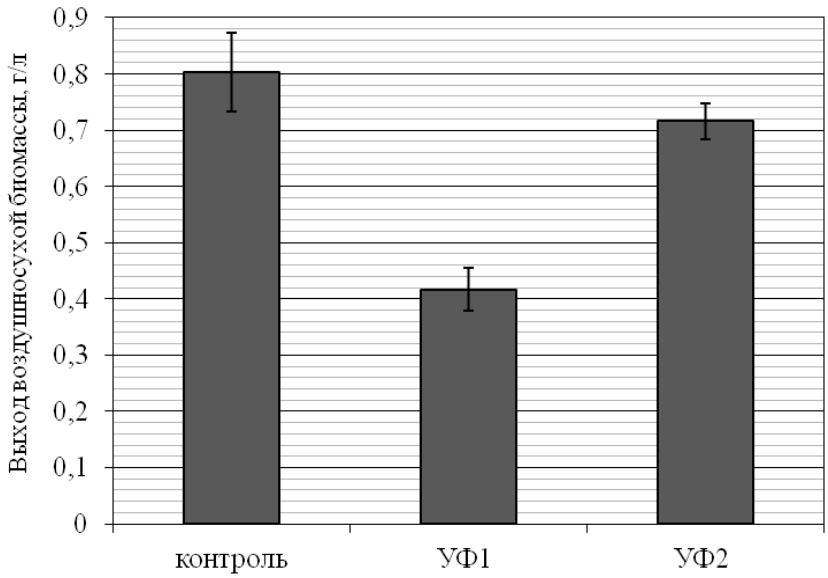


Рисунок 2 – Выход воздушно сухой биомассы, полученной при культивировании в различных условиях освещенности: УФ1 – периодическое ультрафиолетовое воздействие; УФ2 – воздействие ультрафиолетом в фазу стабилизации.

Приём материалов статей по адресу: actbio@mail.ru

Таким образом, периодическое ультрафиолетовое облучение негативно влияет на рост популяции *C. sorokiniana*. что проявляется только на 9 сутки, выход биомассы существенно снижается. Однократное УФ облучение в течение 30 минут приводит к незначительному снижению выхода воздушно сухой биомассы, что при дальнейшем росте популяции может быть скомпенсировано.

ЛИТЕРАТУРА

Belkoura M., Benider A., Dauta A. Influence de la température, de l'intensité lumineuse et du stade de croissance sur la composition biochimique de *Chlorella sorokiniana* Shihira & Krauss // *Annls Limnol*. – 1997. – 33 (1). – Pp. 3–11.

Crofcheck C., Shea A., et al. Influence of media composition on the growth rate of Chlorella vulgaris and Scenedesmus acutus utilized for CO_2 mitigation // J Biochem Tech., 2012. – 4(2). – Pp. 589–594.

Gracia L., Cianca, K., Montero, L. et al. Carotenoids production of the microalgae *Chlorella sorokiniana* response to stress induced by uv-a radiation // Sociedad Latinoamericana de biotecnologia ambiental y algal. November 8 to 14, 2015, Florianopolis, Brazil. – Pp. 1–5.

Lizzul A.M., Lekuona-Amundarain A., Purton S. and Cintra L. Campos Characterization of Chlorella sorokiniana, UTEX 1230 // Biology. – 2018. – 7(25). Режим доступа: www.mdpi.com/journal/biology

Politaeva N., Smyatskaya Y., Trukhina E., Ovchinnikov F. Impact of various physical exposures on Chlorella Sorokiniana microalgae cultivation // International Journal of Applied Engineering Research. 2017.12(21), c. 11488–11492.

Дымова О.В., Головко Т.К. Фотосинтетические пигменты: функционирование, экология, биологическая активность // Известия уфимского научного центра ран. 2018. № 3(4). С. 5–16.

Кузнецова Т.А., Базарнова Ю.Г., Боргоякова А.С. Исследование влияния процесса автофлокуляции клеток микроводоросли Chlorella sorokiniana в аквакультуре на получение комплекса пигментов // Известия КГТУ, 2018. – № 51. – С. 69–80.

Политаева Н.А., Базарнова Ю.Г., Трухина Е.В., Смятская Ю.А. Способ культивирования микроводоросли Chlorella RU 2 668 162 C1. Патент РФ. Патентообладатель: ФГАОУ ВО "СПбПУ".

УДК 581.481 + 581.143.6

ТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГИБРИДНОГО РАСТЕНИЯ *PHALENOPSIS* ИЗ НЕЗРЕЛЫХ СЕМЯН В АСЕПТИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

В.О. Климентова[1], Е.В. Бучугина[1], В.В. Назаров[1], Л.А. Хасанова[2]

[1] Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Россия
[2] Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы, Уфа, Россия

Многочисленные гибриды, выведенные на базе природных видов Phalenopsis, устойчиво занимают лидирующее место в индустриальном и любительском цветоводстве по всему миру. Несмотря на длительное изучение исследование технологии культивирования этих растений в условиях in vitro по-прежнему чрезвычайно актуально, в первую очередь, по причине медленного роста протокормов и сеянцев в асептических условиях и их плохого последующего укоренения на септических субстратах [2–4].

Посадка орхидных незрелыми семенами широко применяется при микроклональном размножении наземных видов из умеренных зон [1]. Для размножения тропических видов обычно используются зрелые семена из уже открытых коробочек. Основной задачей настоящего исследования была адаптация к гибридам *Phalenopsis* технологии выращивания орхидных из незрелых семян в асептических условиях *in vitro* с целью получения кондиционного посадочного материала.

При посадке использовались незрелые коробочки одного из гибридов *Phalenopsis* линии «*Pico fantasy*» Опыление цветков проводили вручную при помощи пинцета и бинокулярной лупы с учетом известных биологических особенностей опыления видов *Phalenopsis* [4]. Спустя 2–2,5 месяца с момента опыления цветков коробочки срезались для посадки до их вскрытия. Срезанные коробочки стерилизовались в 50 % растворе гипохлорита натрия (белизна), содержащего активный хлор, в течение 30–45 мин в зависимости от состояния эпидермиса коробочек, после чего в стерильных же условиях производилась отмывка незрелых коробочек дистиллированной водой и последующее их вскрытие. Незрелые семена из вскрытых коробочек высаживались в чашки Петри на искусственную

питательную среду, в качестве которой использовалась 1/2 среды Мурасиге и Скуга с концентрацией сахарозы 15 г./л. В последующем чашки Петри с семенами выдерживались 1 месяц в термостате при +18–20 °С в темноте. По истечении означенного срока наблюдалось массовое развитие протокормов из зародышей незрелых семян. Чашки Петри с полученными протокормами переносились в климатическую камеру, где содержались также при +18–20 °С с 8 часовым чередованием темной и освещенной фаз.

В дальнейшем осуществлялся мониторинг динамики роста 25 отобранных протокормов, для чего производились замеры протокормов каждые 3–4 дня с использованием графической программы Cell Science Olympus и бинокулярного микроскопа Olympus SZX16 (разрешение от 40х до 70х). Результаты измерений показали резкое увеличеие темпов линейного роста по длине и ширине протокормов при переносе их в климатическую камеру с освещением и заданной температурой (рис. 1, 2). При регулярном освещении наблюдалось быстрое (в течение 1–2 дней) позеленение протокормов. Через неделю после начала подсветки происходила закладка листового валика в апексе и образование многочисленных эпидермальных волосков в базальной части протокормов.

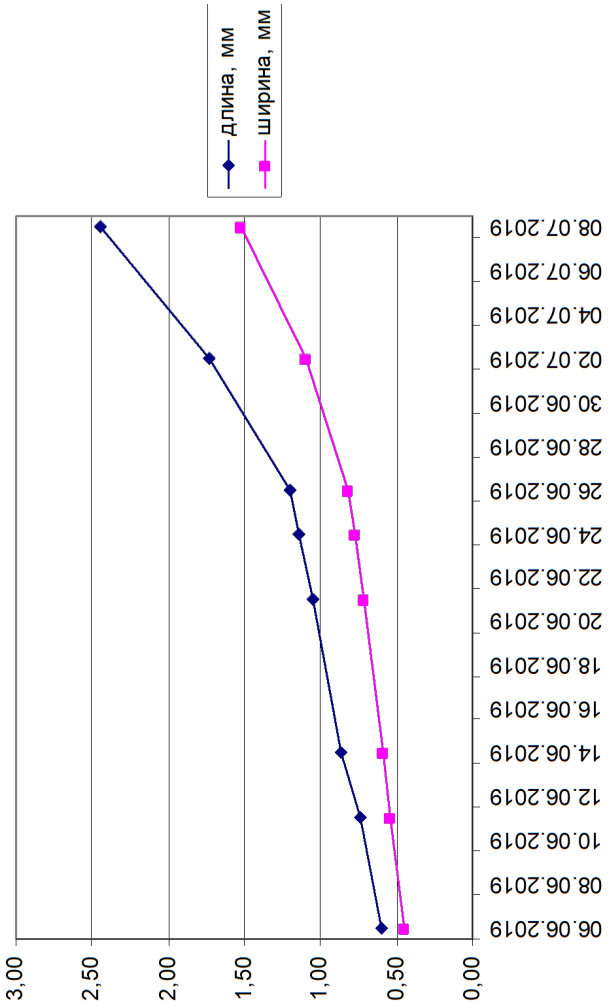


Рисунок 1. Динамика линейного роста протокормов гибридов Phalenopsis линии «Pico fantasy» при +18–20 °С: 06.06.2019 – 21.06.2019 – культивирование в темноте; 22.06.2019 – 08.07.2019 – культивирование в климатической камере с 8 часовым чередованием темной и освещенной фаз

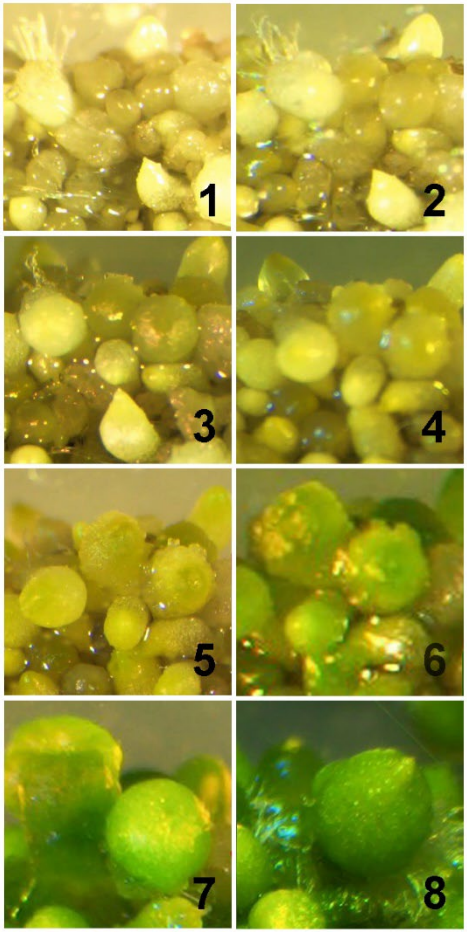


Рисунок 2. Динамика морфогенеза протокормов гибридов Phalenopsis линии «Pico fantasy»: 1–4 – протокормы, выращенные на свету; 5–8 – протокормы, выращенные с подсветкой. Номера на фотографии соответствуют по времени узлам на рисунке 1

Полученные данные свидетельствуют об эффективности технологии культивирования незрелых семян в асептических условиях *in vitro* для микроклонального размножения гибридов *Phalenopsis*.

ЛИТЕРАТУРА

Андронова Е.В. О биологическом разнообразии, семенном размножении *in vitro* и репатриации орхидных // Вестник Тверского государственного университета, 2007. – Т. 35. – № 7. – С. 8–11.

Kee Yoeup Paek, Eun Joo Hahn, So Young Park. Micropropagation of *Phalaenopsis* Orchids via Protocorms and Protocorm-Like Bodies / in: Trevor A. Thorpe and Edward C. Yeung (eds.), Plant Embryo Culture: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, 2011. – Vol. 710. – P. 293–306.

Lesar H., Čeranič N., Kastelec N., D., Luthar Z. Asymbiotic seed germination of *Phalenopsis* Blume orchids after hand pollination // Acta agriculturae Slovenica, 2012. – Vol. 99 (1). – P. 5–11.

Yuan Shin-Chang, Chin S.W., Chen Fure-Chyi. Current trends of *Phalaenopsis* orchid breeding and study on pollen storage // Acta horticulturae, 2015. – Vol. 1078 (1078). – P. 19–23.

УДК 635.21; 631.589; 581.133.8; 632.938

БИОТЕХНОЛОГИЯ РАЗМНОЖЕНИЯ И АДАПТАЦИИ ВИНОГРАДА В LED-ФИТОКУЛЬТУРЕ

[1] Е.Н. Олешук,[2] Т.В. Никонович,[1] Е.Г. Попов

[1] Институт экспериментальной ботаники НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь
[2]Белорусская государственная сельскохозяйственная академия, Горки, Республика Беларусь

При культивировании растений в искусственных моделируемых условиях, в результате проведения биотехнологических работ нередко возникают трудности в процессе адаптации растений-регенерантов, полученных в культуре *in vitro*, в принципиально иные для них условия выращивания *ex vitro*. При воздействии неблагоприятных абиотических факторов у саженцев отмечается нарушение гомеостаза, стресс, вследствие чего значительно замедляются процессы роста и развития. Как и большинство растений, виноград испытывает высокую потребность в достаточном уровне освещенности и определенном спектральном составе света, особенно в самом начале развития в ювенильный период, а также во время адаптации микроклональных растений к условиям *ex vitro* [1, 2].

Вопросы влияния спектрального состава света на процессы роста и развития саженцев винограда в искусственных условиях в настоящее время детально не исследованы. При проведении биотехнологических манипуляций, которые предусматривают выращивание растений, применяются различные источники света, наиболее перспективными из которых в настоящее время являются светодиоды (*LED*), обладающие высокой энергоэффективностью и позволяющие конструировать светильники с оптимизированным для конкретной культуры спектральным составом излучения [3, 4]. Основными преимуществами светодиодных светильников являются долговечность, экономичность, возможность получения излучения исключительно в фитоактивной части спектра (ФАР), низкая потребляемая мощность, незначительное тепловыделение, что позволяет устанавливать светодиоды вплотную к растениям без риска их повредить. В современных энергоэффективных фитолампах используются узкополосные светодиоды, позволяющие конструировать светильники со спектральным составом излучения максимально приближенным к спектру солнечного света. Из всего спектра ФАР для растений наиболее активными и значимыми считаются красный и синий свет. При узкополосном излучении светодиодов позитивное влияние эффективно только при комплексном и взаимодополняющем воздействии света красных и синих светодиодов. Освещение с явным преобладанием синего или красного спектра света в отдельности воспринимается растительным организмом как стрессовый фактор и вызывает накопление активных форм кислорода (АФК), что приводит к активации системы антиоксидантной защиты [3–5]. Эффективность фотосинтеза в листьях растений в значительной мере определяется интенсивностью, продолжительностью и качественным составом освещения. Как известно, растения поглощают только часть спектрального диапазона света с длиной волны примерно 400–730 нм. Наибольшее стимулирующее влияние на развитие растений имеет синий свет в диапазоне около 450–470 нм и красный в диапазоне активности 660–680 нм. Синий свет стимулирует выработку хлорофилла и рост листьев, способствует устойчивости растений к неблагоприятным абиотическим факторам и защите от патогенов [3, 5]. Активность фотосинтеза

и образование пластических веществ зависит в первую очередь от красного света, однако для оптимизации роста и развития растений при их адаптации необходимо также наличие спектра синего света, который отвечает за стрессоустойчивость. У растений, выращиваемых под монохромным светом, может возникать окислительный стресс, который сопровождается накоплением АФК и усилением процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [6]. В случае совместного применения красных и синих светодиодов при удачном их сочетании, адаптация протекает более интенсивно и оказывается более эффективной. Подбор интенсивности различных спектров и соотношение диодов проводится эмпирическим путем.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опытах использовались перспективные для Республики Беларусь интродуцируемые сорта винограда различной генетической природы и происхождения *Бианка, Маршал Фош, Маркетт*. Саженцы винограда получены путем микроклонального размножения *in vitro*, с последующей адаптацией растений-регенерантов *ex vitro* на ионообменном субстрате «*Триона*» в условиях биотехнологического комплекса.

В исследовании применялись промышленные светодиодные (*LED*) фитолампы «Светодар» мощностью 68 Вт, потоком фотонов (в диапазоне 380–800 нм) 143 мкмоль/с. Общий световой поток 8500 лм, соотношение спектров красный / синий (*r/b*) в зависимости от модели в пределах от 1,30 до 9,86 (рис. 1). В качестве контрольного варианта применялись лампы ДНаТ-400.



Рис. 1 – Спектральные характеристики использованных в работе LED-источников

Оценка развития и состояния растений проводилась биометрическими и биохимическими методами (нативный электрофорез, спектрофотометрия). Определение активности изоферментов пероксидазы осуществлялось с помощью нативного гель-электрофореза. Полученные электрофореграммы обрабатывали с помощью компьютерной программы *Total/Lab*. Условия культивирования растений-регенерантов в биотехнологическом комплексе: 16-часовой фотопериод, температура в пределах + 23 – 25º С.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

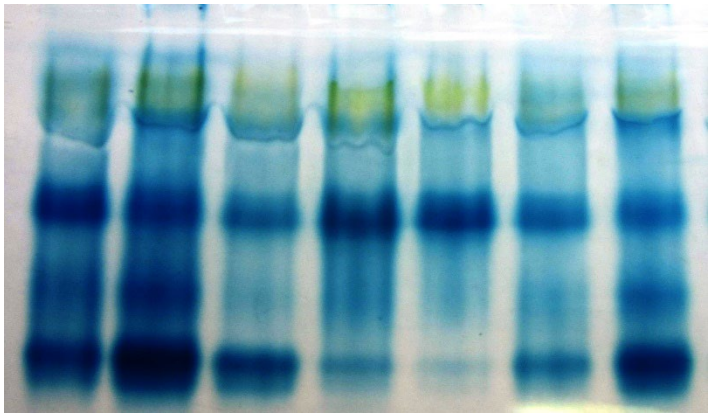
Исследовано влияние качества, интенсивности света и продолжительности фотопериода в условиях биотехнологического комплекса. Изучалась стрессоустойчивость растений-регенерантов (саженцев) различных сортов винограда при их адаптации и выращивании под *LED*-источниками с разным соотношением красного (*r*) и синего (*b*) светового диапазона с помощью биохимических методов (по активности изоферментов пероксидазы). Выявлено, что адаптивные процессы в клетке модулируются изменениями в спектре синтезирующихся белков и значительном варьировании содержания АФК и *Red/Ox*–ферментов (пероксидазы, супероксиддисмутазы (СОД) и др.). Как известно, в естественных условиях адаптация и развитие саженцев происходят в пределах, обусловленных генотипом конкретного сорта. Необходимо отметить, что успешное развитие северного виноградарства связано с внедрением в практику устойчивых к болезням и стрессу высокоадаптивных сортов раннего срока созревания, потенциально пригодных для выращивания в зоне рискованного земледелия [1, 5]. Однако в моделируемых искусственных условиях растения предъявляют особые требования к среде произрастания, и в частности, к условиям искусственного освещения. При микроклональном размножении винограда *in vitro* процессы онтогенеза и формирования растений в значительной мере обусловлены генетическими особенностями культивируемых сортов и условиями их выращивания, в частности, спектральными параметрами освещенности.

На рисунке 2 представлены растения-регенеранты винограда, полученные при различном спектральном составе *LED*-фитоламп. Выявлены существенные различия в формировании побегов, фотосинтетического аппарата и морфометрическом развитии растений винограда одного и того же сорта в условиях *in vitro* в зависимости от варианта освещения. А также установлены сортовые особенности регенерации растений в контролируемых условиях.



Рисунок 2 – Растения-регенеранты винограда *in vitro* (слева – сорт *Маркетт*, справа – сравнение развития сортов *Маркетт* и *Маршал Фош*)

Кроме изучения особенностей морфогенеза, проводились также исследования функционального состояния ферментов *RedOx* – системы винограда при адаптации саженцев *ex vitro*. Выявлено что, адаптация и последующее развитие саженцев винограда имеет определенную сортоспецифичность и лучше проходит при тех вариантах освещения, где в используемых *LED*-источниках доминирование красного спектра по отношению к синему является незначительным, то есть в моделях фитоламп с меньшим соотношением *r/b* (красный / синий), в частности, при значениях *r/b* 1,30; 3,06; 4,22. При адаптации под данными фитолампами саженцы винограда визуально чувствовали себя наиболее комфортно. Это подтверждается и результатами биохимических исследований (по активности изоферментов пероксидазы) (рис. 3).



1 2 3 4 5 6 7

Рисунок 3 – Активность пероксидазы у растений сорта *Маркетт* при разных вариантах освещения

Как представлено на рисунке 3, индукция изоферментов пероксидазы в листьях винограда в зависимости от интенсивности и спектрального состава *LED*-освещения различна. Согласно полученным данным спектрофотометрии установлено, что при адаптации саженцев различных сортов *ex vitro* высокая активность пероксидазы отмечалась у стрессоустойчивого сорта Маркетт, в меньшей степени выражена у сорта Бианка (в варианте с соотношением красного и синего спектра *r/b* 4,22).

Это свидетельствует о том, что в отличие от, например, сорта Бианка, сорт Маркетт североамериканской селекции является биологически пластичным, он выделяется также быстрым возобновлением роста и развития после завершения процессов адаптации в условиях биотехнологического комплекса.

На основе проведенных исследований и оценки особенностей процессов адаптации и развития саженцев винограда, различных по генетической природе и происхождению сортов к стрессообразующим световым факторам, можно сделать следующие выводы:

1) активность изоферментов пероксидазы в листьях растений различается и в значительной степени обусловлена сортоспецифичностью винограда;

2) механизм антиоксидантной защиты у саженцев винограда *in vitro* и *ex vitro* в моделируемых условиях наиболее полно реализуется при оптимальном количестве синего и красного света в суммарном спектре общего потока фотонов ФАР с длиной волн 400÷800 нм, при определенном преобладании красного света. Оптимальное соотношение спектра красный / синий (*r/b*), при котором растения чувствуют себя наиболее комфортно, должно находиться в пределах 1,30÷4,22;

3) согласно биохимическим критериям оценки стрессоустойчивости растений, спектральный состав света *LED*-источников на основе узкополосных светодиодов не является стрессообразующим и лимитирующим фактором при культивации винограда в условиях искусственного освещения при оптимизированном соотношении красного и синего спектра (*r/b*) в пределах от 1,30 до 4,22;

4) исследованные нами модели светодиодных фитоламп показали потенциальную пригодность для адаптации растений-регенерантов винограда *ex vitro*. Моделируемый по красному и синему диапазону спектральный состав *LED*-осветителей может быть востребован с целью депонирования микросаженцев винограда *in vitro* для увеличения сроков их хранения;

5) по комплексу генетических, биометрических и биохимических критериев оценки следует выделить стрессоустойчивые и биологически пластичные сорта винограда Маркетт и Маршал Фош, как наиболее перспективные для культивирования в природно-климатических условиях Беларуси, поскольку обладают повышенной адаптационной способностью.

Работа выполнена по гранту № Б17–155 БРФФИ от 18.04.2017 «Оценка морфогенеза и функционального состояния ферментов RedOx-системы винограда в культуре in vitro и ex vitro при различном светодиодном освещении».

ЛИТЕРАТУРА

1. Янчевская, Т.Г. Опыт решения проблем интродукции и технологии промышленного выращивания винограда в условиях Беларуси / Т.Г. Янчевская, Е.Н. Олешук, Е.Г. Попов, А.Н. Гриц, Т.Б. Макарова. – Минск: Право и экономика, 2012. – 16 с.

2. Янчевская, Т.Г. Оптимизация минерального питания растений. / Минск: Беларуская навука, 2014. – 458 с.

3. Олешук, Е.Н. Физиолого-биохимическая оценка стрессоустойчивости винограда к абиотическим факторам / Е.Н. Олешук, Т.Г. Янчевская, А.Н. Гриц // Вестн. Белорус. Сельскохоз. Акад. – 2017. – № 1. – С. 52–57.

4. Янчевская, Т.Г. Биохимическая оценка развития саженцев винограда *ex vitro* под влиянием LED-источников различного спектрального состава / Т.Г. Янчевская, А.Н. Гриц, Е.Н. Олешук, Т.В. Никонович // Виноградарство и виноделие. – 2018. – № 3. – С. 61–63.

5. Олешук, Е.Н. Экспресс-оценка стрессоустойчивости интродуцируемых сортов винограда (Vitis) по активности окислительно-восстановительных ферментов/ Е.Н. Олешук, А.Н. Гриц, Т.Г. Янчевская // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2016. – № 4. – С. 33–41.

6. Шакирова, Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и её регуляция / Ф.М. Шакирова. – Уфа: Гилем, 2001. – С. 35–39.

УДК 637.146.1

ФАГОЧИПИРОВАНИЕ КАК СПОСОБ ЗАЩИТЫ ПРАВ НА ФЕРМЕНТИРОВАННЫЕ МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ

И.С. Полянская, А.В. Салахутдинова

Вологодская государственная молочнохозяйственная академия имени Н.В. Верещагина, Вологда, Россия

Развитие биотехнологий ферментированных молочных продуктов, в частности сыроделия, непрерывно развивается. В настоящее время часто производители используют в качестве заквасочных собственные патентованные культуры, которые необходимо защищать не только от несанкционированного использования другими производителями, но оберегать марку самого продукта от подделок-имитаций [1]. Ясно, что такая защита должна быть многоуровневой.

В частности в настоящее время исследования по способам защиты своих культур ведутся в Цюрихскомуниверситете, Швейцарском государственном техническом институте ETH, Федеральной исследовательской станция Agroscope [1].

В том случае, если регламентируется запрет на применение и отсутствие ГМО микроорганизмов в продукте (как в России), получение новых штаммов с улучшенными свойствами включает [2,3]:

1. Селекцию посредством естественного отбора практически ценных форм. После выделения из природных или производственных источников штамма микроорганизмов, обладающих полезными свойствами, проводится отбор наиболее продуктивных штаммов среди них.

2. Применение искусственного мутагенеза, позволяющего усилить появление различных мутаций. В качестве мутагенов используются ионизирующие излучения, некоторые химические вещества, а также ультрафиолетовое излучение, обладающее хотя и низкой проникающей способностью, но достаточной для появления мутаций у микроорганизмов.

3. Генетические методы рекомбинации между близкородственными видами (конъюгация, трансформация, трансдукция т. д.).

При селекции посредством естественного отбора практически ценных форм используют естественную изменчивость с отбором групп генетически идентичных клеток – клонов. При применении естественного отбора отдельный клон подвергается многократному пересеву на питательную среду с контролем на образование требуемого продукта. Цель такого многократного клонирования – получение наиболее однородной популяции клеток. После получения продуктивных штаммов приступают к накоплению биомассы. Использование данной технологии позволило селекционерам получить штаммы, продуктивность которых в сотни и тысячи раз выше по сравнению с исходными штаммами микроорганизмов, взятыми из природы.

Для выделения микроорганизмов выбирают объекты, где обитание того или иного вида микроорганизмов наиболее предпочтительно в связи с выбранными для него критериями оценки (сырое молоко, молочная сыворотка, силос, квашеные продукты, молочные продукты, части растений (листья, ягоды), фрукты, овощи, stercus и др.) [3].

Известно, что даже среди природных культур одного вида могут быть уникальные культуры, обладающие более высокими качествами, среди которых определяющими их производственную ипробиотическую ценность могут быть [2–5]:

– антагонистическая активность заквасочных бактерий в отношении технической, патогенной и условно-патогенной микрофлоры обусловленная их способностью синтезировать антибиотические вещества (лактацины, лантабиотики и др.), перекись водорода, лизоцим и др.;

– кислотообразование, высокая кислоообразующая активность в сочетании со стоп-окислительным эффектом, или способность к ограничительному накоплению кислых продуктов ферментации; сообщающих готовому продукту излишне кислый вкус;

– образование ароматических веществ;

– иммуномодулирующие свойства с помощью различных механизмов;

– способность образовывать супероксиддисмутазу:

– особенности протеолитических или липолитических свойств штаммов,

– кислото-, желче- и ферментативную устойчивость в требуемом диапазоне значений, характеризующим ЖКТ группы лиц, для которых пробиотик предназначен;

– возможность использования штаммов в консорциуме, без подавления, как друг друга, так и отсутствие угнетения индигенной нормобиоты человека;

– другие производственно-ценные свойства штаммов: фагоустойчивость, устойчивость в лиофилизированном виде, возможность капсулирования или «квазикапсулирования» как методы повышения выживаемости в ЖКТ и / или уменьшения возможных антагонистических взаимоотношений с индигеннойнормобиотой у некоторых лиц;

– колонизационнная резистентность (КР), или способность заселять (с некоторой степенью постоянства – аутохтонно) слои, прилежащие к клеткам ворсинок в дистальных отделах тонкого и толстого кишечника, участвуя в процессах пищеварения, детоксикации субстратов, обеспечивая питание клеток слизистой оболочки, препятствуя её заселению патогенной и условно-патогенной микрофлорой.

Известно, что аллохтонные микроорганизмы, не способные колонизировать кишечник, также могут оказать некоторый пищеварительный, антагонистический, иммуногенный и др. пробиотические эффекты [3].

При отборе культур с несколькими названными качествами методом естественной селекции надземные части растений (стебли, листья, цветы), особенно прикорневая зона, является одним из объектов выделения молочнокислых бактерий, бифидобактерий, пропионовокислых культур и др.

При отборе образцов для выделения, исходит из следующего основного положения: эпифитная микрофлора культурных растений, ягод, овощей и фруктов представлена бóльшим разнообразием видов и большей плотностью популяции (до 10^6 КОЕ/г), чем диких (до 10^3 КОЕ/г) [3].

Лучшим источником выделения новых штаммов естественной селекцией являются самоквасные кисломолочные продукты. В некоторых случаях ценные пробиотические штаммы получены естественной селекцией от биотопов здоровых особей (людей, животных).

Еще более гетерогенны по перечисленным свойствам культуры, отобранные индуцированной селекцией. Так, например, методами индуцированной селекции (которые не превращают микроорганизмы в ГМО, т. к. не используется межвидовой перенос генов) получали увеличение протеолитической активности в 2,5–4,6 раза, повышение кислотообразования в 3–4 раза, увеличение образования ароматических веществ (диацетила, ацетоина) в 2–5 раз [3].

К методам исследования безопасности пробиотических штаммов относят также изученный профиль внехромосомных элементов (плазмид, транспозонов, бактериофагов и др.). При наличии внехромосомных элементов должна быть охарактеризована и доказана их неспособность к генному трансферу и др. [5].

В последнее время для более четкой дифференцировки микроорганизмов на уровне рода и вида (подвида), когда биохимические и основанные на молекулярно-биологических подходы ПЦР-диагностики недостаточны, предлагают использовать, наряду с определением последовательностей нуклеотидов (секвенированием), многокоординатную таксономию. Более тонким методом оценки генетического сходства организмов является метод молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот, с помощью которого определяют число и степень сходства гомологичных участков в геномах сравниваемых видов [7].

Фагочипирование предложено нами, как дополнительный методмногоуровневой защиты ферментированного продукта от подделки.

Основные положения, характеризующие актуальность использования такого способа:

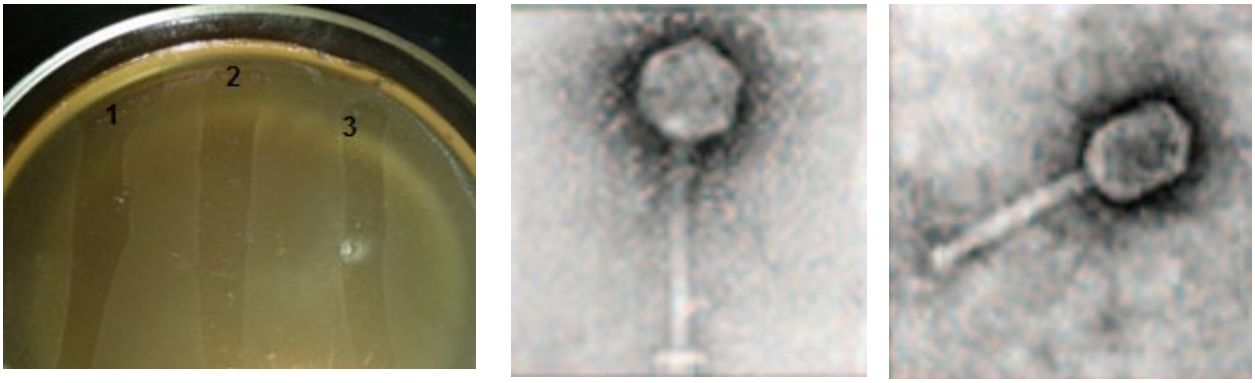
– многие виды сыров (кроме свежих) к концу своего созревания не содержат в своём составе исходные заквасочные микроорганизмы, которые можно бы было выделить, то же относится к термизованным продуктам;

– бактериофаг, как показали наши исследования, при 73 $\pm$ 1 в течение 20–30 с, так и при 65 $\pm$ 1 в течение 30 мин, в целом более жизнеспособен, по сравнению с заквасочной культурой и может быть, сравнительно чаще выделен из ферментированных продуктов;

– не имея лицензированных культур (из сыра с длительнымсроком созревания их не выделить), бактериофаг к этим культурам поддельному производителю не размножить с целью имитации оригинального продукта;

– многие производители стартовых заквасочных культур определяют фаготип культур (рис. 1), из которых подбирают консорциумы для многоштаммовых производственных заквасок (бактериальных концентратов);

– многие производители стартовых заквасочных культур имеют коллекцию гомологичных коллекционным культурам бактериофагов, для которых периодически перепроверяют спектр литической активности.



а) б) в)

Рисунок 1. Бактериофаги заквасочных микроорганизмов: а) индикация чашечным методом, б) бактерифаг В1 типа, в) бактериофаг В2 типа (электронное фото: Смыков И.Т.)

Чип (гомологичный бактериофаг) к заквасочной культуре в данном случае не нужно вводить специально, это сделала природа. Для работы с бактериофагом, как вирусом, абсолютно безопасным для человека, и представляющим собой природный механизм обмена удачными «эволюционными находками» [1], не требуется аккредитация работающим с ним лаборатории, на том уровне, как для работы с патогенными микроорганизмами.

Развитие относительно недорогих методов ПЦР-диагностики, предполагающих амфликацию генетического материала, предрасполагает к последующей унификации этого метода (фагочипирования) для выявления в торговой сети продуктов-фальсификатов, в том числе для продуктов, не содержащих заквасочные культуры, но содержащих гомологичный к ним бактериофаг.

Предлагаем следующее определение фагочипирования заквасочных микроорганизмов:

Фагочипирование лицензионных стартовых заквасочных культур с целью идентификации ферментированных продуктов – подтверждение, что продукт произведён именно с данной лицензионной культурой на основе выделения бактериофага из продукта, исследования спектра его литической активности, возможно с последующим применением других методов идентификации: микрофотографирования (рис. 2), ПЦР и др.

ЛИТЕРАТУРА

1. Agroscope создаёт ДНК швейцарских сыров http://nashagazeta.ch/news/le-coin-du-gourmet/agroscope-sozdaet-dnk-shveycarskih-syrov

2. PolyanskayaI, Semenikhina V, Popova V. QUASICAPSULATION OF PROBIOTICS // Journal of Hygienic Engineering and Design. – 2018. – Vol. 24, no. September. – P. 31–38. http://jhed.mk/filemanager/JHED%20Vol.%2024/03.%20FPP/01.%20Full%20paper%20-%20Irina % 20Polyanskaya.pdf

3. Тераевич А.С., Полянская И.С., Корюкина М.В. Эффективные пробиотики в животноводстве. Подбор, получение и применение // Saarbrucken, – 2016. – Р.

4. FUNCTIONAL FOOD PRODUCTS. CLASSIFICATION. Bio-elements in functional foods / I. Polyanskaya, A. Teraevich, P. Valentina et al. / *Journal of Hygienic Engineering and Design*. – 2017. – Vol. 21. – P. 70–76.

http://jhed.mk/filemanager/JHED % 20Vol.%2021/03.%20FPP/05.%20Full % 20paper % 20-%20Irina % 20Polyanskaya.pdf

5. МУ 2.3.2.2789–10. 2.3.2. Продовольственное сырье и пищевые продукты. Методические указания, по санитарно-эпидемиологической оценке, безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов. – Законодательство России, подп. Онищенко Г.Г. – 2010 г.

6. Лысак В.В. Микробиология: учеб. пособие / В.В. Лысак. – Минск БГУ. – 2007. – 426 с.

УДК 37.018.523

РАЗРАБОТКА РЕЦЕПТУРНЫХ КОМПОЗИЦИЙ КОРМОВ ДЛЯ ОБЪЕКТОВ ХОЛОДНОВОДНОЙ АКВАКУЛЬТУРЫ (НА ПРИМЕРЕ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ)

О.П. Дворянинова, А.В. Соколов, А.Е. Куцова, А.Р. Меркулова

Воронежский государственный университет инженерных технологий, г. Воронеж, Россия

Известно, что прудовая рыба имеет низкую себестоимость, хотя и не уступает по качеству и может заменить морскую и океаническую в рационах человека, а, следовательно, может и должна быть объектом для крупномасштабного производства. Вместе с тем, устойчивое и поступательное развитие прудовых хозяйств возможно только при стабильной кормовой базе [1].

Развитие аквакультуры требует особого внимания к процессу кормления и использования полноценных и экологически безопасных кормов для всех видов рыб промышленного разведения. В составе сбалансированного рациона должно содержаться 40–55 % сырого протеина для быстрого роста рыбы. Недостаточное содержание белка в рационе приводит к общему перерасходу кормов на единицу прироста, что экономически нерентабельно.

Главными игроками на рынке кормов для рыб в Российской Федерации в настоящее время являются Дания, Франция, Германия и др. Если говорить о кормах отечественного производства, то здесь главными игроками на рынке являются такие фирмы как Акварекс, ЛимКорм и другие.

Однако стоимость предлагаемых к реализации кормов достаточно велика и составляет для импортных кормов 180–280 рублей за килограмм, а отечественных – 110–180 в зависимости от рекомендуемых возрастных групп рыбы [2].

Учитывая состояние и перспективу развития аквакультуры в Воронежской области, актуальным является вопрос возможностей рыбных хозяйств в обеспечении кормовой базы за счет собственных ресурсов.

Важность организации и развития собственного кормопроизводства подтверждается выступлением руководителя Росрыболовства на заседании коллегии Минсельхоза, где было отмечено, что для аквакультуры в стране за 2018 год произведено около 110 тыс. т комбикормов, а потребность отрасли превышает 230 тыс. т. Следовательно, более 50 % кормов для рыб представлены на рынке импортными производителями, поэтому возникает необходимость повышения объемов производства кормов для рыб, главным образом отечественного производства, для различных стадий «взросления» рыбы.

Дополнительно следует отметить, что из общего объема вылова горбуши и толстолобика в 2018 году на первичную переработку было направлено 85 и 70 % рыбы соответственно, при этом было получено 39 и 52 % практически не востребованных вторичных продуктов разделки. Что еще раз доказывает целесообразность и перспективность использования рыбных отходов в кормовой промышленности.

Проведенные исследования показали, что массовая доля белка во вторичных продуктах рыбной отрасли находится на достаточно высоком уровне и составляет от 11 до 22 % в зависимости от вида рыбы [5]. Расчеты доказали высокую биологическая ценность белков рыбных отходов, которая составила от 62 до 89 %, следовательно, данные сырьевые ресурсы могут служить белковой составляющей в кормопроизводстве, дефицит которой известен во всем мире.

Цель работы заключалась в моделировании и оптимизации рецептурно-компонентных решений продукционных кормов для радужной форели с заданными кормовыми свойствами на основе вторичных продуктов разделки рыб.

Отличительной особенностью разработанных рецептур является оптимизация их по аминокислотному и витаминно-минеральному составам, что главным образом влияет на протекание процессов пищеварения, повышение продуктивности и сохранности рыбы.

Данный подход позволяет реализовать безотходную технологию переработки вторичных продуктов разделки рыб [3] – толстолобика и горбуши и снизить себестоимость корма по сравнению с аналогами примерно в 2 раза.

Основными сырьевыми компонентами корма является маловостребованное сырье растительного и животного происхождения, в том числе вторичные продукты и отходы, полученные при разделке рыбы (рисунок 1).

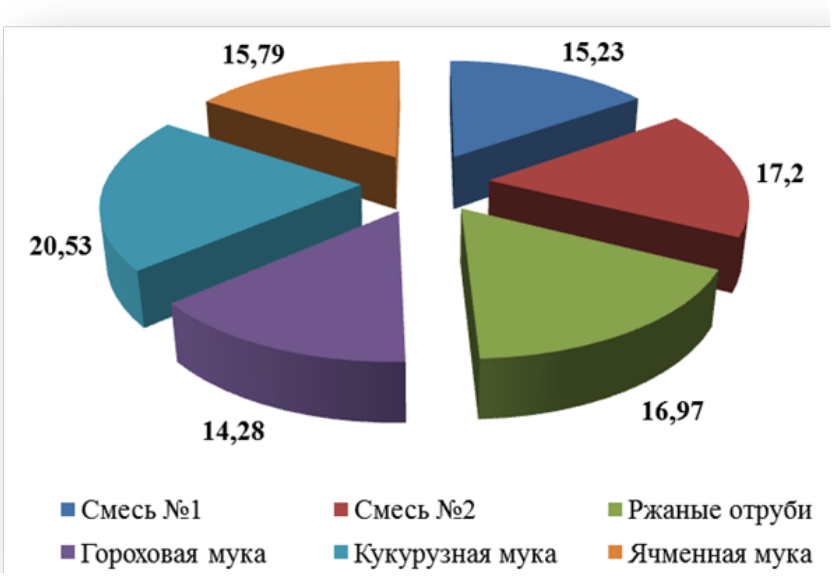


Рисунок 1 – Рецептура продукционного корма для радужной форели «ФишФуд», %

Расчетная функция желательности по аминокислотному составу составила 0,83, а функция желательности по витаминно-минеральному составу – 0,73, что доказывает сбалансированность корма по основным питательным веществам для холодолюбивых рыб (рисунок 2).

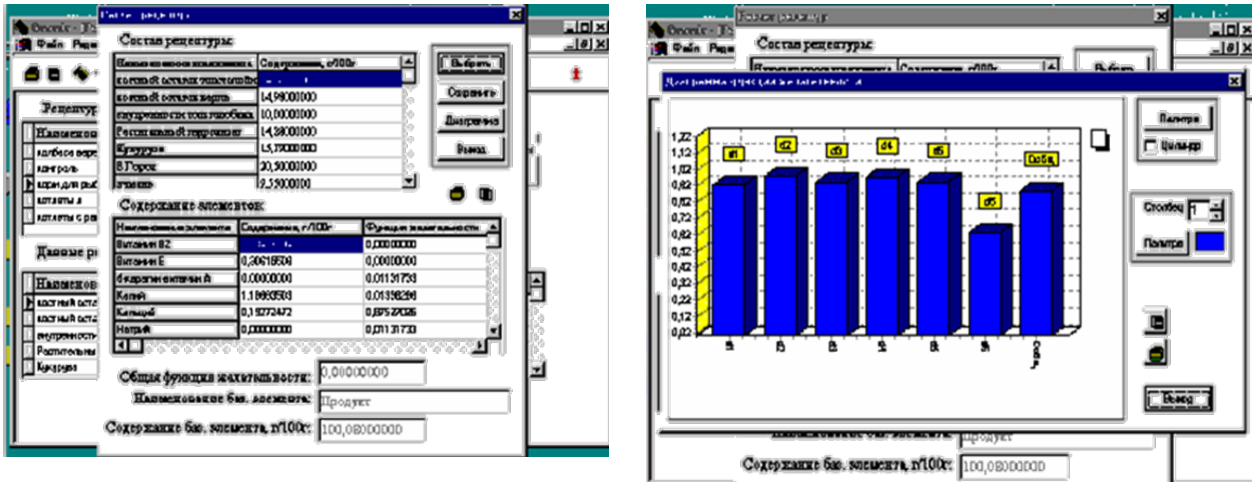


Рисунок 2 – Сбалансированность корма по аминокислотному и витаминно-минеральному составам

В результате проведенных исследований разработана технология производства продукционного корма «ФишФуд», основными стадиями которой являются: получение сухих белковых смесей, состоящих из побочных продуктов и отходов разделки рыб, взятых в определенных соотношениях, смешивании с растительными компонентами и экструдировании.

Преимуществом разработанной технологии является возможность выпуска корма в различных формах термической обработки: а именно экструдирование, гранулирование, сушка и замораживание.

Важно, что данная технология предусматривает замену ферментного препарата импортного происхождения [4] на стадиях ферментолиза растительного сырья на отечественный аналог (внутренности рыб). Доказано, что они обладают достаточно высокой ферментативной активностью, поэтому могу быть использованы в качестве перспективного сырьевого ресурса в отечественном кормопроизводстве.

Рыбохозяйственный опыт, проведенный на мальках радужной форели в условиях ИТЦ «Аквабиоресурс», показал, что расход корма для рыб на 1 кг прироста живой массы мальков в опытных группах по сравнению с контрольной уменьшился на 6,83 %. Сохранность мальков в ходе всего эксперимента была максимальной.

По результатам ранее проведенных исследований на прудовых рыбах (карп, толстолобик) была подана заявка на изобретение «Способ производства корма для прудовых рыб».

Разработанный корм имеет себестоимость 68 рублей за килограмм, что доказывает его конкурентоспособность на рынке кормопродуктов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Меркулова А.Р., Дворянинова О.П., Соколов А.В. Способ получения белковых компонентов для кормовых смесей в аквакультуре / Материалы студенческой научной конференции за 2018 год в 2-х частях. 2018. С. 482–483.

2. Дворянинова О.П., Соколов А.В., Спиридонова М.В., Черкесов А.З. Корма для рыб как основной элемент материально-производственной базы рыбоводства / Материалы X всероссийской научной конференции «Актуальные проблемы химии, биологии и биотехнологии». 2016. С. 314–315.

3. Дворянинова О.П., Антипова Л.В., Соколов А.В., Спиридонова М.В. Способ получения корма для прудовых рыб / патент на изобретение RUS 2621991 06.02.2016.

4. Дворянинова О.П., Соколов А.В., Алехина А.В. Исследование форм связи влаги в спецсмесях для рыбных кормов методом дифференциально-термического анализа / Сборник научных статей и докладов V Международной научно-практической конференции «Продовольственная безопасность: научное, кадровое и информационное обеспечение». Воронежский государственный университет инженерных технологий. 2018. С. 210–218.

5. Дворянинова О.П., Соколов А.В., Сьянов Д.А., Черкесов А.З. Биотехнологический потенциал вторичных продуктов разделки рыб как основа импортозамещения // Известия Международной академии аграрного образования. 2015. № 23. С. 148–152

УДК 579.64

ВЛИЯНИЕ *DELFTIA* SP. LP-1 НА ПОВЫШЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ САЛАТА (*LACTUCA SATIVA* L.) К *ERWINIA CAROTOVORA SUBSP. CAROTOVORA* B15

Н.В. Агафонова, Е.Н. Капаруллина, Н.В. Доронина

Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Пущино, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Erwinia carotovora subsp. carotovora – известный фитопатоген, вызывающий слизистый бактериоз растений, поражает широкий круг сельскохозяйственных культур: все виды капусты, салат, редис, репу, картофель, морковь, лук, томат, фасоль и др. Бактериоз причиняет наибольший вред в регионах с высокой температурой (~ 25 °С) и повышенной влажностью воздуха (выше 50 %) во время вегетационного периода. В настоящее время перспективными направлениями повышения урожайности растений являются исследования в области биотехнологий, использующих микроорганизмы, стимулирующие рост растений и обладающие выраженными антибиотическими свойствами. Аэробные метилотрофные бактерии используют метанол и другие C_1-метаболиты растений в качестве источников углерода и энергии и оказывают положительное влияние на рост растений. Ранее нами описан представитель рода *Delftia*, штамм *Delftia sp*. Lp-1, способный расти на метаноле – естественном продукте метаболизма растений, и обладающий широким спектром механизмов стимуляции роста различных растений (Агафонова с соавт., 2017). Штамм *Delftia* sp. Lp-1 обладает антифунгальной активностью против грибов рода Fusarium, антибактериальной активностью против некоторых представителей рода *Bacillus*, однако о его влиянии на патоген *Erw. carotovora* ранее не сообщалось.

Цель данной работы – выявление антибактериальной активности *Delftia* sp. Lp-1 к *Erwinia carotovora* B15, а также исследование влияния инокуляции семян салата (*Lactuca sativa* L.) на повышение устойчивости ростков к эрвинии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Delftia sp. Lp-1 (ВКМ В-3039) выращивали на минеральной среде «К» (г/л: KH_2PO_4 – 2,0; $(NH_4)_2SO_4$ – 2,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,025; NaCl – 0,5; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,002; $H_2O_{дист.}$ – 1 л; pH 7,4) в колбах Эрленмейера объемом 750 мл с 200 мл среды и 0,5 % метанола при 29 ºС, 180 об/мин в течение 3 сут. Штамм *Erw. carotovora* В15 выращивали на среде LB при 29 ºС, 180 об/мин в течение суток.

Изучение антагонистической активности. Антибактериальную активность *Delftia* sp. Lp-1 к *Erw. carotovora* В15 определяли при их совместном культивировании по наличию зоны подавления роста, как описано ранее (Агафонова с соавт., 2017).

Колонизация растений и изучение ростостимулирующей активности. Семена салата (*Lactuca sativa* L., сорт Московский парниковый) стерилизовали в 5 % растворе $NaClO_4$ в течение 2–3 мин, затем трижды отмывали стерильной водой. Стерильные семена выращивали в условиях *in vitro* на водном агаре (0,7 %) при температуре 23–25 °С и 16 ч световом режиме в течение 7 дней. Инокуляцию проводили 10 мкл/семя суспензии клеток *Delftia* sp. Lp-1, *Erw. carotovora* В15 и смесью клеток (*Delftia* sp. Lp-1 + *Erw. carotovora* В15) плотностью 10^6-10^7 КОЕ/мл, контрольные растения обрабатывали стерильной средой «К». Семисуточные ростки высушивали до постоянной массы при 95 °С, сухой вес определяли из расчета на один росток. Содержание фотосинтетических пигментов определяли в 96 % этанольных экстрактах из листьев спектрофотометрическим методом по максимумам поглощения хлорофиллов и каротоиноидов (Корнилина, 2012).

Эксперименты проводили в трехкратной повторности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что исследуемый метилотроф подавлял рост *Erw. carotovora* В15 (рис. 1) с зоной лизиса 3–5 мм, при этом *Delftia* sp. Lp-1 выделял в среду темный пигмент, образование которого не наблюдали при культивировании без конкурентной культуры.

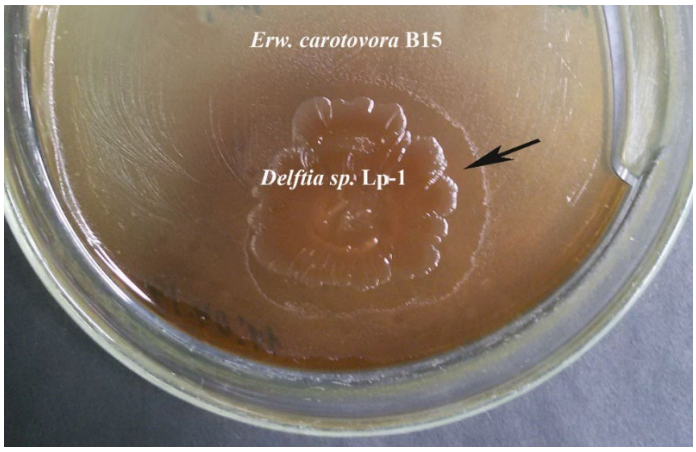


Рис. 1. Антагонистическая активность штамма Delftia sp. Lp-1 (пятно) против Erw. carotovora B15 (газон), стрелкой указана зона лизиса

В опытах *in vitro* через 5–7 суток после обработки ростков салата у зараженных *Erw. carotovora* В15 растений отмечали замедление роста и развития стеблей и корневой системы, пожелтение корней, уменьшение размеров листовых пластинок, в то время как состояние контрольных, колонизированных штаммом Lp-1 и обработанных смесью клеток (*Delftia* sp. Lp-1 + *Erw. carotovora* В15) растений оставалось без видимых изменений. Ростки, зараженные *Erw. carotovora* В15, имели меньшую высоту стебля, длину корней и сухой вес по сравнению с контрольными (на 40–45 %, 56–60 %, 8–10 %, соответственно), а также обработанными *Delftia* sp. Lp-1 (на 50–52 %, 63–65 %, 12–15 %, соответственно) и *Delftia* sp. Lp-1 + *Erw. carotovora* В15 (на 48–50 %, 54–58 %, 6–8 %, соответственно) растениями (таблица 1, рис. 2). Несмотря на то, что показатели инфицированных бактериозом ростков были довольно низкими, совместная инокуляция *Delftia* sp. Lp-1 + *Erw. carotovora* В15 способствовала улучшению роста, показатели выравнивались до уровня контрольных растений.

Таблица 1. Морфометрические показатели ростков салата (*Lactuca sativa* L.), контрольные и обработанные штаммами *Delftia* sp. Lp-1, *Erw. carotovora* B15, *Delftia* sp. Lp-1 + *Erw. carotovora* B15

Вариант	Высота стебля, мм	Длина корня, мм	Сухой вес из расчета на один росток, мг
Контроль	23	25	24,3
Delftia sp. Lp-1	27	27	26,0
Erw. carotovora B15	13	10	22,3
Delftia sp. Lp-1 + *Erw. carotovora* B15	25	24	24,2

Показаны средние значения результатов трех независимых экспериментов (стандартная ошибка не более ±5 %).

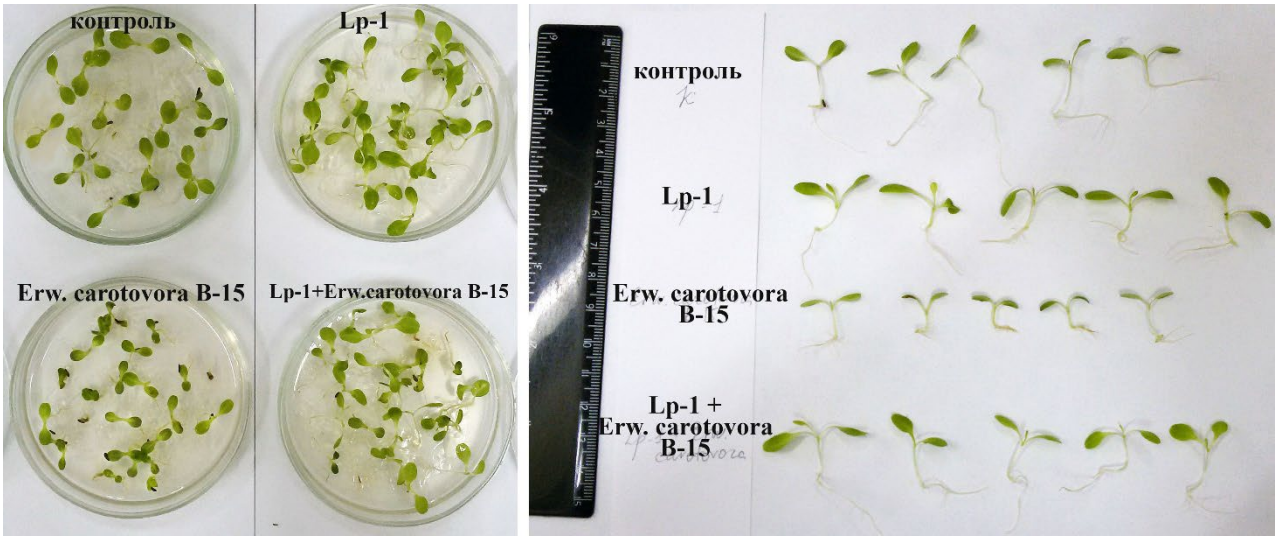


Рис. 2. Ростки салата (Lactuca sativa L.), контрольные и обработанные штаммами Delftia sp. Lp-1, Erw. carotovora B15, Delftia sp. Lp-1 + Erw. carotovora B15.

Кроме того, исследовали влияние инокуляции клетками *Erw. carotovora* B15 на пигментный состав фотосинтетического аппарата ростков салата, поскольку содержание хлорофиллов (*a, b*) и каротиноидов, свидетельствует о физиологическом состоянии растений. Полученные данные (таблица 2) также свидетельствовали о повреждающем действии заражения ростков салата эрвиниями, что проявлялось в негативном влиянии на работу фотосинтетического аппарата. Инокуляция зараженных ростков клетками *Delftia* sp. Lp-1 оказывала защитный эффект: суммарное содержание хлорофиллов (*a* + *b*) и каротиноидов отличалось от таковых у поврежденных *Erw. carotovora* B15 ростков, на 10–15 % и 15–20 %, соответственно.

Таблица 2. Содержание и соотношение фотосинтетических пигментов у ростков салата (*Lactuca sativa* L.), контрольных и обработанных штаммами *Delftia* sp. Lp-1, *Erw. carotovora* B15, *Delftia* sp. Lp-1 + *Erw. carotovora* B15

Вариант	ХЛ *a*, мг/г	ХЛ *b*, мг/г	ХЛ (*a* + *b*), мг/г	каротиноиды, мг/г
Контроль	0,264	0,129	0,393	0,159
Delftia sp. Lp-1	0,308	0,151	0,459	0,188
Erw. carotovora B15	0,256	0,127	0,383	0,154
Delftia sp. Lp-1 + *Erw. carotovora* B15	0,286	0,139	0,425	0,177

Показаны средние значения результатов трех независимых экспериментов (стандартная ошибка не более ±5 %)

Таким образом, показано, что метилотрофный фитосимбионт *Delftia* sp. Lp-1 подавляет рост *Erw. carotovora* B15, а при колонизации ростков салата улучшает их устойчивость к фитопатогену, оказывает положительное влияние на рост, развитие растений и работу их фотосинтетического аппарата. Следовательно, использование штамма *Delftia* sp. Lp-1 перспективно как для стимуляции роста, так и повышения устойчивости растений к бактериальным фитопатогенам.

ЛИТЕРАТУРА

Агафонова Н.В., Доронина Н.В., Капаруллина Е.Н., Федоров Д.Н., Гафаров А.Б., Сазонова О.И., Соколов С.Л., Троценко Ю.А. Новый фитосимбионт из рода *Delftia*, способный к автотрофной метилотрофии // Микробиология. 2017. Т. 86. № 1. С. 88–98.

Корнилина В.В. Влияние ложного осинового трутовика (*Phellinus tremulae Bond et Boriss*) на содержание пигментов в листьях осины в лесах Ульяновской области // Фундаментальные исследования. 2012. № 9. С. 668–572.

УДК 631.577.002.3

ГЛУБОКАЯ ПЕРЕРАБОТКА ОВОЩНОГО СЫРЬЯ НА ОСНОВЕ БИОТЕХНОЛОГИИ

Р.А. Дроздов, М.А. Кожухова, В.С. Коробицын, Т.А. Дроздова

Кубанский государственный технологический университет, г. Краснодар, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Актуальной задачей является глубокая и рациональная переработка сельскохозяйственного сырья с получением пищевых продуктов и ингредиентов для общего и функционального питания.

Увеличение объемов производства овощных соков является одной из тенденций развития отрасли, которая сохранится по прогнозам и в ближайшем будущем. В связи с этим актуальность приобретает рациональная и глубокая переработка сырья, используемые для производства соковой продукции [1]. Одним из эффективных способов ее решения является использование биотехнологических методов.

При выборе способов, позволяющих существенно повысить глубину переработки сырья, необходимо стремиться к максимальному сохранению и эффективному использованию его биопотенциала. Существенно увеличить выход сока и содержание в нем биологически активных веществ позволяет ферментативная обработка. Наибольший эффект она дает в сочетании с декантерной технологией, которая находит все большее распространение во всех областях пищевой промышленности где необходимо разделения фаз. Преимущества получения соков на декантерах: высокая эффективность, непрерывность процесса, минимальные размеры установки при высокой производительности, получение продуктов высокого качества [2].

Универсальным ферментным препаратом (ФП), который применяется для обработки как фруктов, так и овощей служит «Pectinex Ultra SP-L» компании Novozymes (Дания). Он содержит пектиназы и гемицеллюлазы и оказывает мацерирующее действие на растительную ткань [3, 4]. В результате увеличивается выход сока, который обогащается экстрактивными и биологически активными веществами, в том числе пектоолигосахаридами, обладающими пребиотической активностью.

В работах Огневой и Донченко показано, что использование продуктов ферментации фруктов и овощей препаратом «Pectinex Ultra SP-L» в составе молочно-растительных питательных сред способствует более быстрому росту и размножению пробиотических культур и ускорению кислотообразования в процессе ферментации [5, 6]. Таким образом, обработка мезги ФП «Pectinex Ultra SP-L» не только увеличивает выход сока, повышая содержание в нем тонкоизмельченной мякоти, но и обогащает конечный продукт факторами роста лакто- и бифидобактерий.

Обработка фруктового и овощного сырья ферментами позволяет сократить количество отходов, но не решает проблему глубокой переработки полностью. Более того, ферментативная модификация компонентов сырья, в частности деструкция пектиновых веществ, ставит задачу изучения химического состава, физико-химических свойств выжимок с целью определения экономически и технологически рациональных способов их дальнейшего использования.

Ценным и довольно распространенным растительным сырьем для производства соковой продукции служат тыква и морковь. Они обладают высоким содержанием каротина, богаты минеральными веществами, включая кальций, калий, магний, медь, цинк, фосфор, железо, широким спектром моно-, олиго- и полисахаридов. Благодаря содержанию физиологически активных компонентов морковный и тыквенный соки находят широкое применение в профилактическом, диетическом и лечебном питании [7, 8].

Цель работы – обосновать технологию комплексной и глубокой переработки тыквы и моркови с использованием биотехнологических методов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследований служили морковь сорта «Нантская» и тыква сорта «Витаминная», которые подготавливали следующим образом: 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» при различных условиях, затем отделяли сок на лабораторной центробежной соковыжималке «Bosch MES3500». В соке определяли массовую долю сухих веществ по рефрактометру, в выжимках – на анализаторе влажности «Эвлас-2М».

На первом этапе определяли влияние условий ферментативной обработки овощного сырья ФП «Pectinex Ultra SP-L» на выход сока (с мякотью) и содержание в нем сухих веществ (по рефрактометру). Для этого был спланирован и реализован полнофакторный эксперимент: независимые переменные – температура и pH среды, функция отклика – выход сока. Результаты представлены на рисунках 1 и 2.

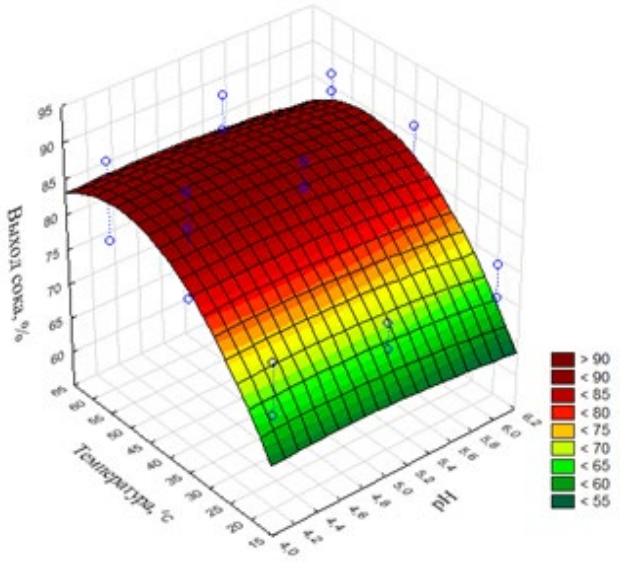


Рисунок 1 – График ависимости выхода морковного сока от pH среды и температуры ферментации

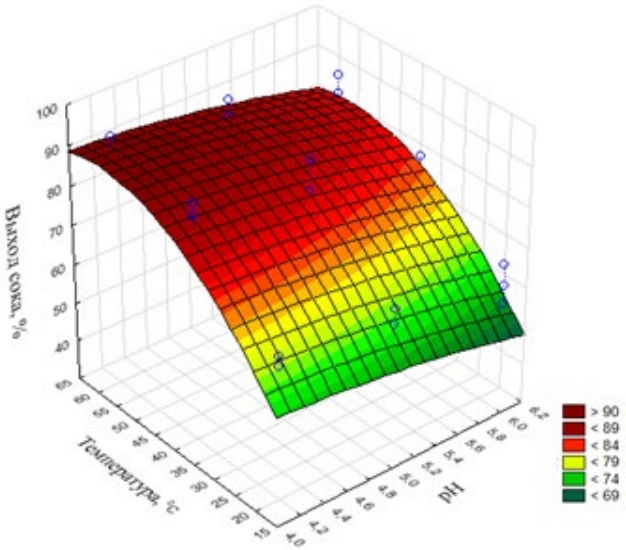


Рисунок 2 – График зависимости выхода тыквенного сока от pH среды и температуры ферментации

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из полученных графических зависимостей видно, что температурный оптимум ферментации оптимум четко выражен и составляет: для моркови – t = 50 ± 2˚C, для тыквы – t = 55 ± 5˚C. Выход сока в зависимости от pH увеличивается при смещении данного показателя в кислую сторону, однако это увеличение составляет не более 5–8 %. Это дает возможность выбирать в исследованном диапазоне pH такое значение, которое будет наиболее приемлемым с точки зрения дальнейшего применения как основного продукта, так и образующихся выжимок.

Для определения продолжительности ферментации изучали динамику выхода сока и содержания в нем сухих веществ. При этом температуру поддерживали на оптимальном уровне для каждого вида сырья, а величина pH составляла 4,9 ± 0,2

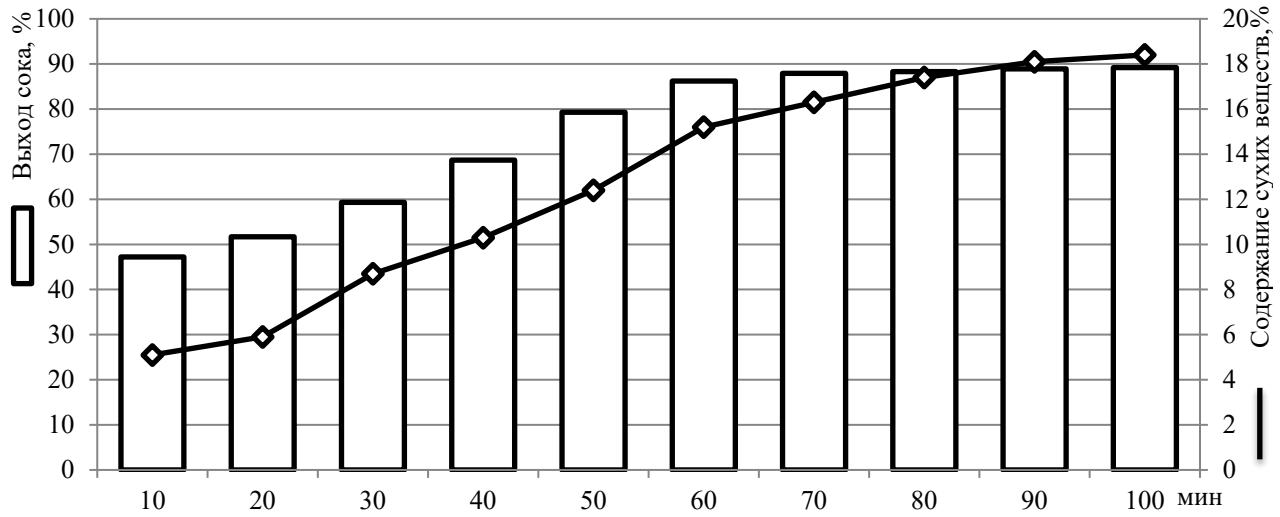


Рисунок 3 – Выход сока (с мякотью) и массовая доля растворимых сухих веществ в нем в зависимости от продолжительности ферментативной обработки моркови

Как видно, выход сока заметно увеличивается в течение первого часа обработки, затем изменяется незначительно. Повышение выхода сока сопровождается увеличением в нем массовой доли сухих веществ, что можно объяснить как улучшением экстрагируемости компонентов растительных клеток в результате их частичной деструкции, так и накоплением растворимых продуктов ферментативного гидролиза. Так, в работе [9] показано, что результате действия «Pectinex Ultra SP-L» в среде накапливаются моно- и олиго – галактурониды с различной степенью полимеризации, и с течением времени доля галактуроновой кислоты увеличивается, а олигомерных форм уменьшается.

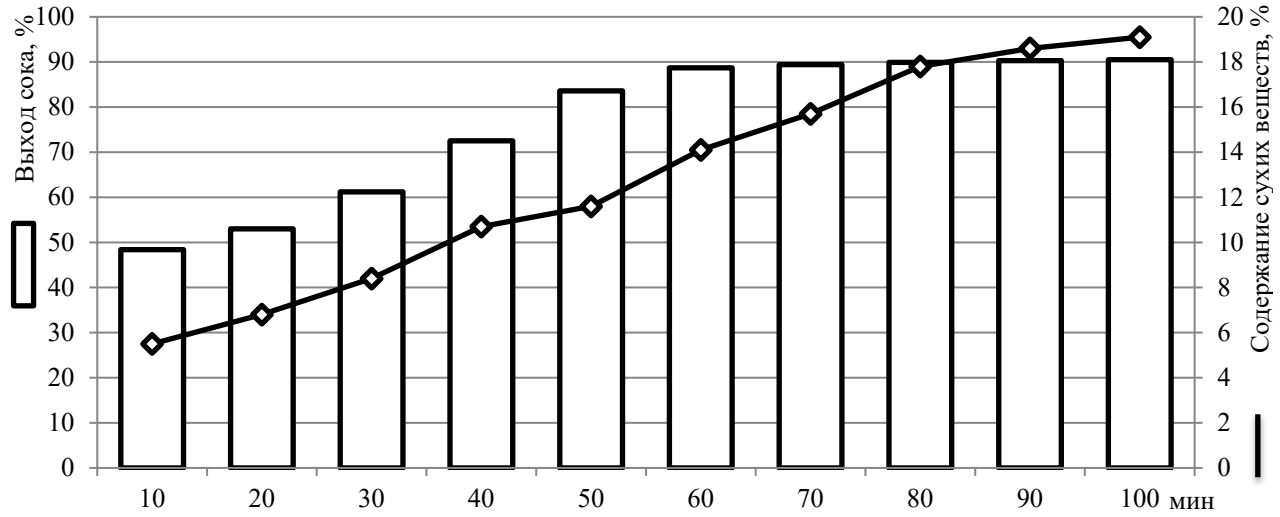


Рисунок 4 – Выход сока (с мякотью) и массовая доля растворимых сухих веществ в нем в зависимости от продолжительности ферментативной обработки тыквы

На основании анализа полученных результатов пришли к выводу, что рациональной продолжительностью процесса ферментативной обработки моркови является 70 минут, тыквы – 60 минут. Дальнейшее увеличение времени не влечет за собой существенного повышения выхода сока, однако увеличит технологический цикл, что приведет к удорожанию готового продукта.

После обработки сырья при установленных оптимальных условиях выход сока увеличился на 23 %, в сравнении с получением сока без предварительной ферментации, а количество отходов соответственно сократилось.

Для определения сферы дальнейшего использования отходов (выжимок), полученных после отделения сока, исследован их химический состав. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Химический состав выжимок

Наименование показателя	Морковь	Тыква
Массовая доля сухих веществ, %	23,6	24,3
Растворимые сахара, %	7,3	8,9
Пищевые волокна, %	15,7	16,3
Витамин С, мг / 100г	1,74	2,18
β-каротин, мг / 100 г.	12,52	13,97
Полифенолы, мг / 100 г.	143,0	130,7
Азотистые соединения, мг азота / 100 г.	288	234

Как видно, выжимки, полученные после отделения сока из ферментированной мезги моркови и тыквы, характеризуются высоким содержанием сухих веществ, растворимых сахаров, каротина, включают другие биологически активные вещества, а также азотистые соединения. Более половины сухих веществ составляют пищевые волокна, главным образом нерастворимые. Это дает основание рекомендовать их использовать в качестве источников пищевых волокон и других функциональных ингредиентов для обогащения кисломолочных и мясных продуктов, хлебобулочных и кондитерских изделий [10, 11].

В результате проведенных исследований установлены оптимальные условия ферментативной обработки моркови и тыквы, обеспечивающие повышение выхода сока до 85 % и увеличение содержания в нем сухих веществ. Изучен химический состав образующихся после отделения сока выжимок, что позволило характеризовать их как ценный источник комплекса функциональных ингредиентов, главным образом пищевых волокон, и рекомендовать для дальнейшего использования в различных пищевых отраслях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fruit and Vegetable Juice Market Size Analysis Report By Product (Fruit Juices, Fruit & Vegetable Blends, Vegetable Juices), By Region And Segment Forecasts, 2018–2025 // Grand View Research. – 2018. P.77

2. Мандреа А.Г. Сепараторы, декантеры и процессные линии для биотехнологии // Пищевая промышленность. Изд.: ООО «Пищевая промышленность». – 2007. – № 7. – С. 52–53

3. Zhou P. Application of Pectinex Smash XXL and Pectinex Ultra SP-L in Carrot Juice Processing // Science and Technology of Food Industry. – 2003. – № 9. – P. 62–63

4. SchSfer T. Enzymes for Technical Applications / T. SchSfer, O. Kirk, T.V. Borchert, C.C. Fuglsang, S. Pedersen, S. Salmon, H.S. Olsen, R. Deinhammer, H. Lund // Biopolymers. – 2002. – Chapter 13. – P. 377–437

5. Огнева О.А., Донченко Л.В. Пектиносодержащие напитки с пробиотическими свойствами // Научный журнал КубГАУ. Изд.: КубГАУ», г. Краснодар. – 2015. – № 107. – Р. 1–9

6. Донченко Л.В. Технология пектина и пектинопродуктов // Изд.: «ДеЛи» г. Москва. – 2000. – 255 с.

7. Habib Md. R. Processing of mixed vegetable juice from tomato, cucumber and pumpkin / Md. R. Habib, Ab. Iqbal // Food Science and Technology. – 2014. – № 26. – P. 83–91

8. Shafiya R. Development of probiotic carrot juice / R. Shafiya, Sh. Vasudha, N. Ambreena, R. Rafia, et al. // Journal of Nutrition & Food Sciences. -2016. – P.2–5.

9. Agnan M. Enzymatic production of pectic oligosaccharides from polygalacturonic acid with commercial pectinase preparations / M. Agnan, M. Combo, M. Aguedo, D. Goffin, B. Wathelet, M. Paquot // //Food and bioproducts processing. – 2012. – № 90. – P.588–596

10. Agnieszka Nawirska, Cecylia Uklanska. Waste products from fruit and vegetable processing as potential sources for food enrichment in dietary fibre // Acta Sci. Pol., Technol. Aliment. – 2008. – № 7. – P.35–42

11. Дроздов Р.А Оптимизация рецептуры ферментированного молочного продукта с функциональными свойствами / Р.А. Дроздов, Т.В. Бархатова, М.А. Кожухова, Л.А. Рыльская, И.А. Хрипко, Т.А. Дроздова // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. Изд.: Кубанский государственный технологический университет». г. Краснодар. – 2017 г. – № 4. – С. 42–48.

УДК 631.53.011 + 57.043 + 635.1

ВЛИЯНИЕ ОСВЕЩЕНИЯ НА РОСТ И АНТИОКСИДАНТНУЮ АКТИВНОСТЬ СЕЯНЦЕВ РЕДИСА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В РЕГУЛИРУЕМЫХ УСЛОВИЯХ СИНЕРГОТРОНА ИСР 1.01

В.Н. Зеленков[1,2,3], В.В. Латушкин[1], М.И. Иванова[3], А.А. Лапин[4], С.В. Гаврилов[1], П.А. Верник[1]

[1] Институт стратегий развития, Москва, Россия
[2] Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, Москва, Россия
[3] Всероссийский научно-исследовательский институт овощеводства – филиал Федеральный научный центр овощеводства, Московская область, Россия
[4] Казанский энергетический университет, Казань, Россия

ВВЕДЕНИЕ

При выращивании растений в искусственных условиях (закрытые агроэкосистемы) требуется четкое регулирование факторов роста растений, начиная с первых этапов онтогенеза [1, 2]. Одним из важных параметров является наличие или отсутствие света в период прорастания семян. В действующем ГОСТ 12038–84 на методы проращивания семян оговариваются условия определения всхожести – свет или в темнота. Семена ряда культур можно проращивать как на свету, так и в темноте, другие культуры требуют света или темноты при проращивании семян. Так, семена редиса проращивают в темноте. Однако, по литературным данным, механизмы воздействия света на прорастание семян носят комплексный, неоднозначный характер [3, 4]. Остается много неясного в оценке механизмов влияния освещения и других факторов на прорастание семян. Одним из важных моментов представляется оценка антиоксидантной активности как возможного маркера изменения метаболических процессов в растениях [5, 6]. Представляет большой интерес изучить изменение антиоксидантных свойств растений при проращивании в темноте и на свету. Поэтому целью настоящей работы являлось изучение прорастания семян редиса с учетом светового фактора и одновременным анализом антиоксидантной активности как маркера изменения метаболических процессов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент проводили в 2019 г. в опытном образце синерготрона (закрытой камере с цифровым программным управлением) модели 1.01. конструкции АНО «ИСР» Объектами исследований служили семена и проростки редиса сорта «Юбилейный».

Варианты эксперимента:

Проращивание в темноте, рост сеянцев на свету – в темноте первые 3 дня после посева (18–21.03.2019), затем сеянцы перемещены на свет (22.03.19).

Проращивание и дальнейший рост сеянцев – на свету

Проращивание семян проводили согласно ГОСТ 12038–84 с изменениями – использовались блоки из минеральной ваты. Повторность трехкратная. Уровень интенсивности света, создаваемый светодиодными светильниками красного и синего света составил 260–270 мкМоль/ $м^2$ * с. Контроль – проращивание в темноте, на 4-й день проращивания сеянцы помещали на свет. Полив проводили минеральным питательным раствором (по рекомендации компании «Рийк Цваан» для салатных культур). В период проведения эксперимента определяли высоту сеянцев и их биомассу. Суммарную антиоксидантную активность (САОА) измеряли кулонометрическим методом (в пересчете на г рутина на 100 г. образца на сухой (с.о.) образец) [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Семена редиса, использованные в эксперименте, характеризуются высокими посевными качествами. Энергия прорастания семян и всхожесть практически совпадали (табл. 1). Четко выраженного влияния света или темноты на всхожесть и энергию прорастания семян не установлено, возможно, из-за генетически быстрого и дружного прорастания семян данной культуры.

При прорастании семян редиса в темноте проростки вытягивались, их высота превышала высоту проростков, полученных при освещении (рис. 1). Анализ динамики роста сеянцев после прорастания показал, что различия по высоте постепенно уменьшались и к концу эксперимента практически исчезали.

Табл. 1. Энергия прорастания и всхожесть семян редиса при проращивании в темноте и на свету

Показатель	Проращивание на свету	Проращивание в темноте
Энергия прорастания, %	89,2	90,1
Всхожесть семян, %	91,4	91,1

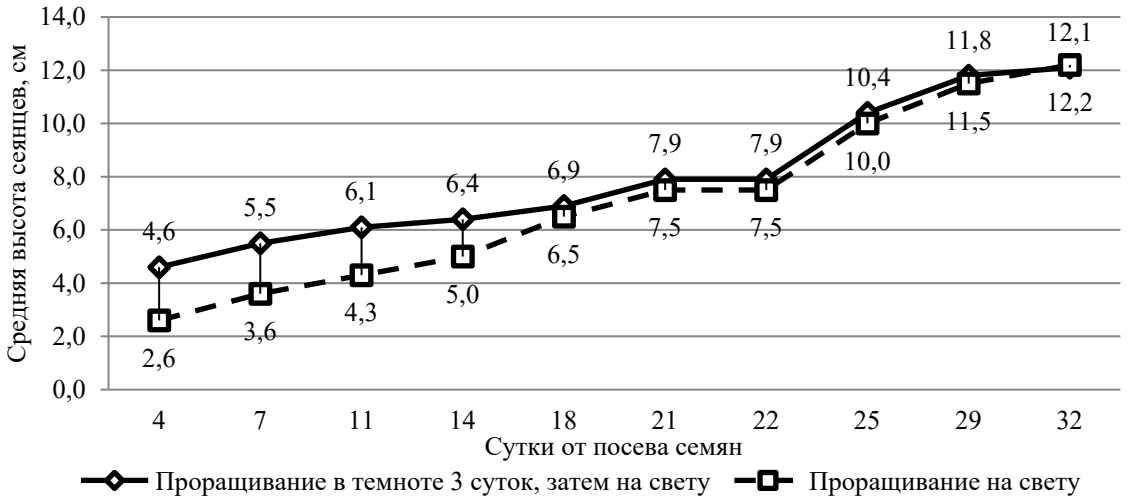


Рис. 1. Динамика роста сеянцев редиса при темновом и световом проращивании семян

Биомасса сеянцев редиса выше в варианте проращивания в темноте на 10,8 % на 14-е сутки после посева (рис. 2). Однако к концу эксперимента, на 32-е сутки после посева семян, различия уменьшились (в варианте темнового проращивания выше на 2,5 %).

В эксперименте оценивалось изменение антиоксидантной активности надземной части сеянцев в динамике (рис. 3). Первый срок (на 4-е сутки) – фаза полных всходов (сравнивались варианты проращивания в темноте и на свету). После взятия образцов на определение антиоксидантной активности все растения в темновом варианте перемещены на свет, т. е. в дальнейшем определялось последействие темнового проращивания.

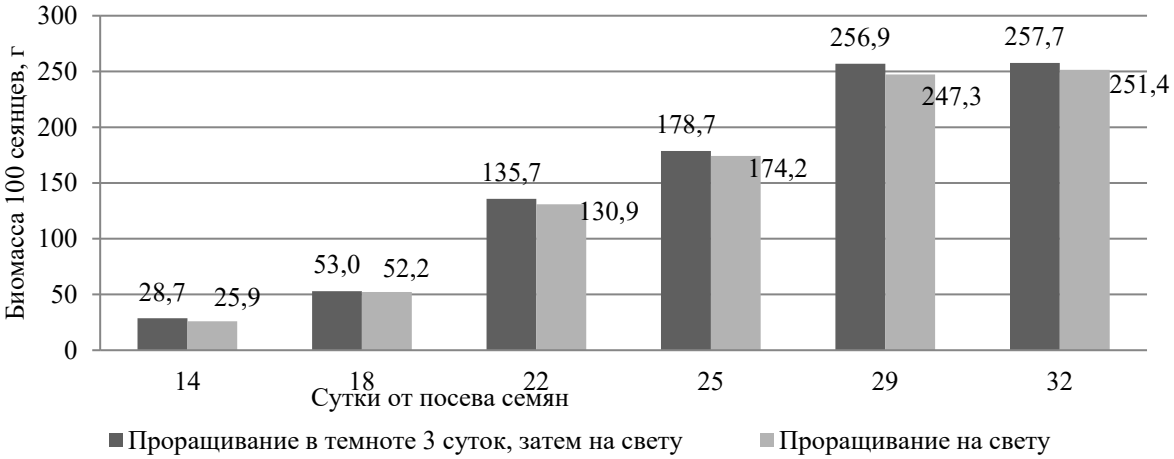


Рис. 2. Биомасса сеянцев редиса при темновом и световом проращивании семян

Выявлено существенное повышение антиоксидантной активности зеленых частей сеянцев при проращивании в темноте в сравнении с проращиванием на свету. Так, суммарная антиоксидантная активность (САОА) у сеянцев (4-е сутки после посева семян) редиса в темновом варианте превысила в

2,1 раза САОА в варианте проращивания на свету (рис. 3). Возможно, воздействие темноты активизирует адаптивные реакции растений и изменяет направленность метаболитических процессов.

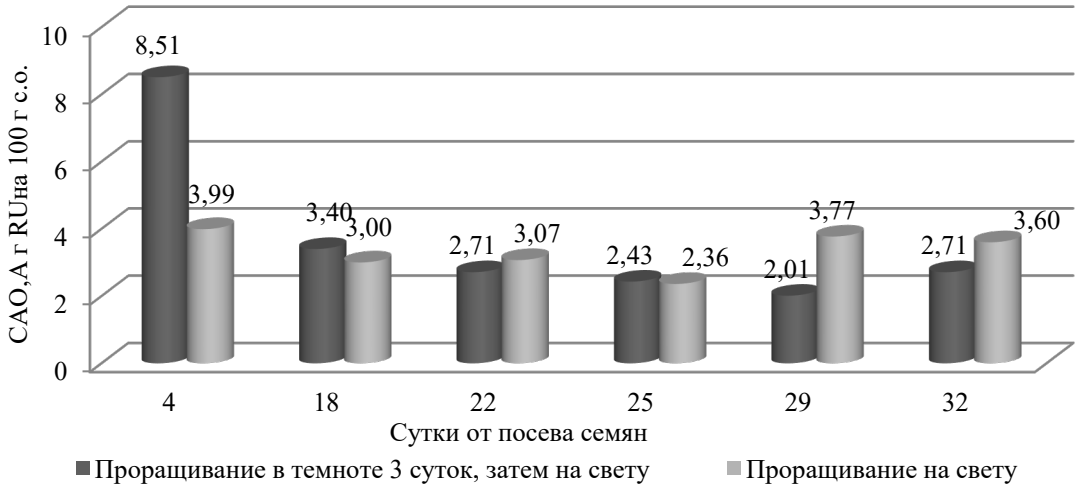


Рис. 3. Суммарная антиоксидантная активность (САОА) сеянцев редиса при проращивании на свету и в темноте

Отметим, что после перемещения на свет в процессе дальнейшего роста САОА в темновом варианте резко снижалось. Разница между световым и темновым вариантами по величине САОА при этом снижалась до 11,1 % на 18-е сутки. В дальнейшем САОА в варианте проращивания на свету оказалось большим, чем в темноте (на 32-е сутки на 24,7 %).

Антиоксидантная активность семян редиса (исходная САОА) составила 4,075 ± 0,128 г. Ru на 100 г. сухого образца (остаточная влажность 5,6 %). При проращивании на свету антиоксидантная активность сеянцев на 4-е сутки после посева практически не изменялась по сравнению с семенами. В то время, как при темновом проращивании САОА сеянцев увеличивалась более чем в два раза.

Вероятно, при проращивании семян на свету и в темноте активируются разные физиологические механизмы, о чем говорит резкое изменение суммарной антиоксидантной активности. Для выявления механизмов необходимо проведение углубленных исследований.

ВЫВОДЫ

Энергия прорастания и всхожесть семян редиса «Юбилейный» практически совпадали, что говорит о высоких посевных свойствах семян. Четко выраженного влияния света или темноты на всхожесть и энергию прорастания семян не установлено.

Средняя высота сеянцев редиса на 4-е сутки от посева оказалась больше при проращивании в темноте, чем на свету (на 77 %), однако различия постепенно уменьшались по мере роста сеянцев и в конце вегетационного периода практически исчезали.

Отмечено последействие влияния темнового проращивания на формирование биомассы сеянцев после их перемещения на свет. В середине вегетационного периода (на 14-е сутки после посева) биомасса сеянцев выше на 10,8 % в варианте темнового проращивания, однако в конце вегетации (32-е сутки после посева семян), различия уменьшились до 2,5 %.

Выявлено существенное повышение антиоксидантной активности (САОА) проростков редиса при проращивании в темноте в сравнении с проращиванием на свету (в 2,1 раза на 4-е сутки после посева семян). В дальнейшем, после перемещения сеянцев на свет, антиоксидантная активность в темновом варианте резко снижалось. Различие между световым и темновым вариантами при этом снижалось до 11,1 % (на 18-е сутки). В дальнейшем САОА в варианте проращивания на свету оказалось большей, чем в темноте (на 24,7 % на 32-е сутки).

При проращивании на свету антиоксидантная активность сеянцев на 4-е сутки после посева практически не изменялась по сравнению с исходными семенами. При темновом проращивании САОА сеянцев увеличивалась более чем в два раза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Драгавцев В.А. Новая регуляция у растений и необходимость создания селекционного фитотрона в РФ // Журнал технической физики. – 2018. – Т.88, Вып.9. – С. 1331–1335.
2. Зеленков В.Н. Создание замкнутых агробиотехносистем на базе цифровых технологий – новые возможности научного познания культур клеток и высших растений / В.Н. Зеленков, П.А. Верник // Актуальная биотехнология. – 2018. – № 3 (26). – С. 50–55.
3. Попцов А.В., Некрасов В.И., Иванова И.А. Очерки по семеноведению. – М.: Наука, 1981. -112 с.
4. Крамер П.Д., Козловский Т.Т. Физиология древесных растений. – М.: Лесная промышленность, 1983. – 464 с.
5. Зеленков В.Н., Лапин А.А., Литвинов С.С. Антиоксидантный статус овощей // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования. – М.: РУДН, 2017. – 334 с. – с. 101–104.
6. Гинс М.С., Гамбурова Н.Т. Активность антиоксидантной системы краснокрашенного амаранта при кратковременном действии УФ – А радиации / / Овощи России. – 2009. – № 1. С. 33 – 35.
7. Зеленков В.Н., Лапин А.А. Суммарная антиоксидантная активность. Методика выполнения измерений на кулонометрическом анализаторе. МВИ -01–00669068. – Верея Московской обл.: ВНИИ овощеводства, 2013. – 19 с.

УДК 66.047

СОВМЕСТНАЯ ОВЕРЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ХРИЗАНТЕМЫ *CDM86, CDM115* И *CDM37* ИЗМЕНЯЕТ ИДЕНТИЧНОСТЬ ВСЕХ ОРГАНОВ ЦВЕТКА И СНИЖАЕТ ФЕРТИЛЬНОСТЬ ТАБАКА

А.В. Нежданова[1,2], А.М. Камионская[1], А.В. Щенникова[1]

[1] Институт Биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия
[2] Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

Переход растения к репродуктивной стадии развития происходит под влиянием как автономного генетического пути, так и сигналов окружающей среды (Fornara et al., 2010). Апикальная меристема побега становится меристемой соцветия, отдельная группа клеток которой дифференцируется в цветковую меристему, каждая клетка которой становится впоследствии частью одного из органов цветка (Krizek, Fletcher, 2005). Молекулярно-генетические механизмы, с помощью которых клетки устанавливают свои позиции и дифференцируются, являются объектом исследования уже несколько десятилетий (Coen, Meyerowitz, 1991; Smaczniak et al., 2012; Theißen et al., 2016). Одними из ключевых регуляторов данных процессов являются MADS-доменные факторы транскрипции (Parenikova et al., 2003; Smaczniak et al., 2012). Помимо определения идентичности органов цветка, MADS-box гены участвуют в инициации цветения, развитии плодов и семян, ответе на стрессы, а также во многих других жизненно важных процессах (Fornara et al., 2010; Barah et al., 2013; Dong et al., 2014). Изменение активности MADS-box генов приводит к гомеозисным мутациям в цветке, что говорит об участии данных генов в эволюции и диверсификации царства растений (Coen, Meyerowitz, 1991; Theißen et al., 2016). Многочисленные данные послужили созданию модели развития цветка ABCDE. Согласно модели, идентичность чашелистиков определяется MADS-box генами активностей A + E, лепестков – A + B + E, тычинок – B + C + E, плодолистиков – C + E, и семязачатков – C + D + E (Theißen et al., 2016).

Ключевое участие MADS-box генов в различных аспектах онтогенеза растения делает их все более популярным объектом внутри- и межвидовых исследований, как для фундаментальной науки, так и для научно обоснованной биотехнологии агрокультур. Настоящая работа сфокусирована на функциональном анализе MADS-box генов одного из самых распространенных видов декоративных растений – хризантемы *Chrysanthemum morifolium* сорт Parliament.

Обширные межвидовые исследования MADS-box генов продемонстрировали, что структурная гомология генов сопровождается функциональным сходством кодируемых ими белков (Smaczniak et al., 2012; Dong et al., 2014). Консервативность основ онтогенеза высших растений позволяет предсказывать функции еще не охарактеризованных MADS-box генов, в том числе на основе эффектов гетерологичной экспрессии данных генов в модельных растениях.

С целью изучения функций MADS-box генов хризантемы нами были получены трансгенные модельные растения табака (*Nicotiana tabacum* сорт Samsun), которые одновременно эктопически экспрессировали три гена: B- (*CDM86* и *CDM115*) и C-активности (*CDM37*). Для этого была проведена агробактериальная трансформация *N. tabacum* тремя генетическими конструкциями, результатом которой стали три вида трансгенных растений с индивидуальной конститутивной экспрессией каждого из трех генов (Щенникова и др., 2011, 2018). Регенеранты T_0 отбирали на селективной среде с канамицином и тестировали с помощью ПЦР на присутствие трансгена в геноме. У растений поколений T_1 и T_2 определяли количество и гомо / гетерозиготность геномных вставок, а также наличие экспрессии трансгенов. Растения, имеющие одну вставку и значительный уровень транскрипции трансгена, использовали для двухэтапного скрещивания. Полученные растения были проверены (ПЦР) на присутствие в геноме кассет экспрессии *CDM37, CDM86* и *CDM115*. Среди потомков от скрещивания (C_0 линии 13–2–3 и 13–2–7) были выявлены растения C_1, в геноме которых присутствовали все три гена *CDM37, CDM86* и *CDM115*. Данные растения сравнивали с контролем (нетрансгенный табак) с учетом: (1) периода вегетации (от высадки в теплицу до визуально определяемого соцветия); (2) высоты побега и числа листьев (на завершающей стадии формирования семенных коробочек); (3) архитектуры полностью сформированного соцветия; (4) строения цветка (антезис); (5) фертильности (количество образовавшихся при самоопылении семенных коробочек; вес семян). Полученные результаты обрабатывали с помощью методов математической статистики.

Было обнаружено, что в сравнении с контролем потомки обеих линий 13–2–3 и 13–2–7 зацветали значительно раньше, были короче и формировали меньше цветков, при этом вес семян сокращался значительно (рис. 1). Между собой растения двух линий достоверно отличались только количеством цветков и коробочек (рис. 1). Строение соцветий растений «86 x 115 x 37» не имело отклонений от нормы. Как и у контроля, соцветия состояли из терминального цветка и 2–3х терминальных соцветий. Фенотипический анализ цветка «86 x 115 x 37» обнаружил, что первый круг (чашечка) внешне напоминает венчик, лепестки второго круга приобрели признаки тычинок, тычинки укорочены, пыльники плохо открываются и производят визуально меньше пыльцы, исчезли нектарники, преобразовалась завязь пестика, но семязачатки внешне не отличаются от контроля (рис. 2). Цветки характеризовались пониженной фертильностью, и самоопыления часто не происходило.

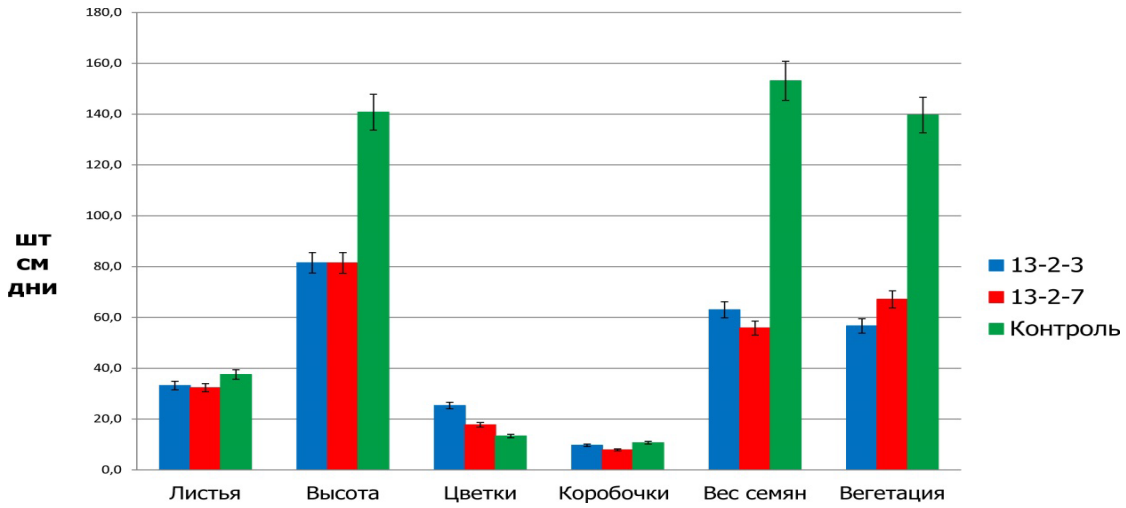


Рисунок 1. Характеристики линий трансгенных растений табака “35S:*CDM37* x 35S:*CDM86* x 35S:*CDM115*” в сравнении с контролем

На основании полученных результатов в сравнении с литературными данными мы предполагаем, что исследуемые гены не участвуют в определении архитектуры соцветия, однако при этом способны сократить период вегетации и привести к его миниатюризации растения. Гены *CDM86* и *CDM115* выполняют в хризантеме B-функцию, определяя идентичность лепестков и тычинок, а при эктопической экспрессии способны изменить количество, размер, фертильность или идентичность семязачатков. Ген *CDM37* является геном C-класса и участвует в спецификации репродуктивных органов цветка хризантемы.



Рисунок 2. Фенотип цветка трансгенных растений табака "35S:*CDM37* x 35S:*CDM86* x 35S:*CDM115*" (TP) в сравнении с контролем (WT)

В дальнейшем мы планируем провести анализ следующего поколения трансгенных растений табака с одновременной экспрессией трёх генов, определить паттерн экспрессии трансгенов и родных генов табака и, возможно, использовать их для дальнейшего скрещивания с растениями табака, экспрессирующими MADS-box гены хризантемы других активностей.

Полученные нами данные могут быть использованы для научно обоснованной селекции сортов декоративных культур с измененным периодом вегетации и строением цветка. К примеру, выключение C-активности может привести к формированию стерильных цветков, полностью состоящих из чашелистиков и лепестков.

ЛИТЕРАТУРА

Щенникова А.В., Шульга О.А., Сизенёва Е.С. и др. Диверсификация функциональной активности гомеозисного MADS-гена *CDM37* хризантемы // ДАН. – 2011. – Т. 436. – № 4. – С. 563–565.

Щенникова А.В., Шульга О.А., Скрябин К.Г. Диверсификация гомеозисных MADS–box генов *AP3*-клады у астровых *Chrysanthemum morifolium* L. и *Helianthus annuus* L. // ДАН. – 2018. – Т. 483. – № 4. – С. 1–7.

Barah P., Jayavelu N., Rasmussen S. et al. Genome-scale cold stress response regulatory networks in ten Arabidopsis thaliana ecotypes // BMC Genomics. – 2013. – Vol. 14. – P. 722.

Coen E.S., Meyerowitz E.M. The war of the whorls: Genetic interactions controlling flower development // Nature. – 1991. – V. 353. – P. 31–37.

Dong T., Chen G., Tian S. et al. A Non-Climacteric Fruit Gene CaMADS-RIN Regulates Fruit Ripening and Ethylene Biosynthesis in Climacteric Fruit // PLoS One. – 2014. – Vol.9, Iss. 4.

Fornara F., de Montaigu A., Coupland G. SnapShot: Control of Flowering in Arabidopsis // Cell. – 2010. – V. 141, № 3. – P. 550.

Krizek B.A., Fletcher J.C. Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide // Nat Rev Genet. – 2005. – Vol. 6. – P. 688–698.

Parenicova L., Folter S. de, Kieffer M. et al. Molecular and Phylogenetic Analyses of the Complete MADS-Box Transcription Factor Family in Arabidopsis: New Openings to the MADS World // Plant Cell. – 2003. – V. 15, № 7. – P. 1538–1551.

Smaczniak C., Immink R.G., Muiño J.M. et al. Characterization of MADS-domain transcription factor complexes in Arabidopsis flower development // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2012. – V. 109. – P. 1560–1565.

Theißen G., Melzer R., Rümpler F. MADS-domain transcription factors and the floral quartet model of flower development: linking plant development and evolution // Development. – 2016. – V. 143. – P. 3259–3271.

УДК 664.951.7:5945

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КОМПЛЕКСНОЙ ПЕРЕРАБОТКИ КАЛЬМАРА *BERRYTERTHIS MAGISTER*

Т.А. Игнатова, А.В. Подкорытова, Т.В. Родина

Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии, Москва, Россия

В настоящее время величина ежегодного вылова кальмаров в Российской Федерации составляет порядка 83,4 тыс. т [Статистические сведения…, 2017]. Из кальмаров изготавливают различные виды продукции (кальмар сушеный, вяленый, копчёный, пресервы, консервы, кулинарная продукция), но большую их часть составляют кальмары мороженые [Кизеветтер и др., 1976; Технология рыбы и рыбных продуктов, 2010; ГОСТ 20414]. При производстве тушки кальмара образуется около 52,3 % отходов, из них 23,2 % приходится на печень и 76,8 % на внутренности, щупальца и голову.

Анализ литературы показал наличие ряда технологий по переработке отходов от разделки кальмара (ОРК). Существует технология получения из зрительных ганглиев кальмаров БАД, обладающая иммуностимулирующим действием, а также холинэстеразы и фосфатазы [Шевцова, 1977; Касьяненко и др., 1982; Аюшин, Боровская, 1992]. Печень кальмара тихоокеанского (*Todarodes pacificus*) содержит до 36,5 % жира [Справочник по химическому составу…, 1999] и поэтому является его ценным источником [Крутченский и др., 1989]. Ещё в 1968 г. головы и щупальца кальмара были рекомендованы для изготовления фарша [Селюк, 1968]. Имеется разработка по получению противоожогового и ранозаживляющего средства из ОРК [Степанцова, Пастушенков, 1998]. Также проводились исследования по получению кормовой муки из ОРК [Степанцова, Городниченко, Пациенко, 1989; Степанцова, 2001]. В настоящее время, несмотря на существование разработок по переработке ОРК и наличия в них такого высокоценного компонента как белок (76,1 % сух. в-ва) в промышленности данный вид сырья не нашел применения.

Высокое содержание белка в ОРК указывает на перспективность использования их в качестве сырья для получения белковых гидролизатов с использованием методов биотехнологии.

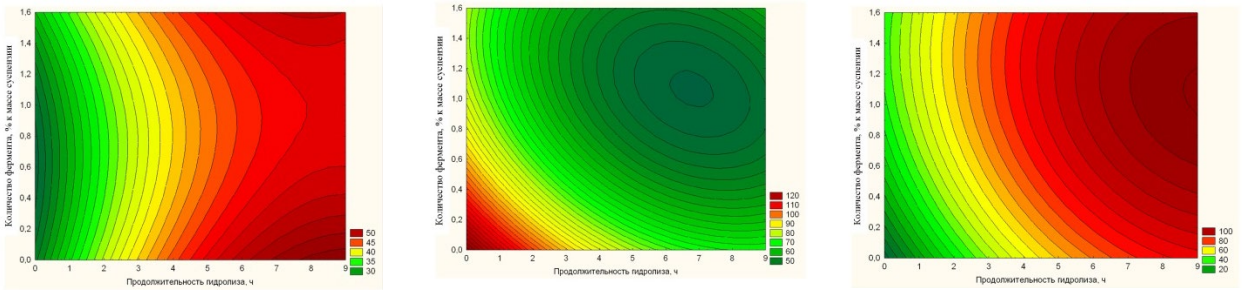
Белковые гидролизаты широко применяются в различных отраслях промышленности (медицинская, пищевая, комбикормовая и микробиологическая) [Мухин, Новиков, 2001; Пащенко, Сторублевцев, 2009]. В пищевой промышленности гидролизаты используются в качестве компонента при разработке пищевых продуктов общего и специального назначения. Функциональные (эмульгирующее) и биологические (антиоксидантное, противогипертоническое, антитромбозное, холестерин-понижающее и др.) свойства гидролизатов в значительной степени зависят от степени гидролиза белка. Гидролизаты с низкой степенью расщепления белка используются для получения продуктов с высокими эмульгирующими и влагоудерживающими способностями, а с высокой степенью – в рецептурах специального (спортивного и лечебного) питания, так как данные виды гидролизатов не требуют переваривания и быстро усваиваются организмом [Clemente, 2000; Свириденко, Мягконосов, Абрамов, Овчинникова, 2017]. Оптимальная степень расщепления белков в кормовых гидролизатах специфична для каждого вида животного и может быть определена только экспериментально. Так, например, для обеспечения максимального прироста молоди рыб, как показано в научных публикациях, степень гидролиза белка должна составлять от 15 до 25 %. При меньшей степени гидролиза, как и при большей, наблюдается снижение их прироста и увеличение кормового коэффициента [Холодная, 2001]. Таким образом, область использования гидролизатов зависит в первую очередь от степени гидролиза белкового сырья [Телишевская, 2000; Максимюк, 2009].

В связи с этим, при разработке технологии получения белкового гидролизата из ОРК основной задачей является изучение процесса ферментолиза с целью определения рациональных режимов получения гидролизатов с заданной степенью расщепления белка.

При проведении исследований использовали ОРК *Berryteuthis magister* (щупальца, внутренности, голова). Заготовку образцов для анализа проводили в Северо-Курильской зоне. Поскольку папаин является более дешевым и доступным ферментным препаратом целесообразным является использование его для проведения исследований (активность 800–900 ед./мг). Содержание общего, аминного и небелкового азотов определяли по Лазаревскому А.А. [Лазаревский, 1955].

Ферментолиз ОРК проводили при гидромодуле 1:1 и температуре 50 ± 2 °С. В качестве переменных количественных факторов были выбраны количество фермента, используемого для обработки отходов и продолжительность процесса ферментолиза. Уровни факторов: «количество фермента» (с) – 0,5; 1; 1,5 % к массе суспензии; «продолжительность предобработки» (τ) – 2; 5; 8 ч. Степень гидролиза белков в ферментолизатах сравнивали с таковым показателем для автолизата, полученного по той же схеме.

На основе анализа графического изображения изменения степени гидролиза белков ОРК от продолжительности ферментолиза и количества фермента (рис. 1) установлено, что процесс ферментолиза проходит ступенчато.



(а) (б) (в)

Рисунок 1. Изменение степени гидролиза белков ОРК в зависимости от продолжительности ферментолиза и количества фермента (а) изменение соотношения Nам/Nобщ от параметров ферментолиза; (б) изменение соотношения Nнеб/Nобщ от параметров ферментолиза; (в) изменение соотношения Nам/Nнеб от параметров ферментолиза

На первой стадии ферментолиза (первые 2–3 ч) происходит интенсивное образование водорастворимых пептидов, что определяется высоким значением показателя Nнеб/Nобщ (более 80 %) и одновременно с этим низким значением соотношения Nам/Nобщ (менее 35 %) (рис. 1, а, б). Также о превалировании в гидролизате водорастворимых пептидов говорит и низкое значение соотношения Nам/Nнеб (не более 40 %) (рис. 1, с). При этом в раствор переходят порядка 36–40 % азотсодержащих веществ из ОРК (рис. 2).

В интервале от 4 до 6,5 ч превалирует процесс расщепления водорастворимых пептидов до свободных аминокислот, что подтверждается снижением значения соотношения Nнеб/Nобщ с 80 до 50 % и увеличением показателя Nам/Nобщ до 45 % (рис. 1, а, б). Высокие значения соотношения Nам/Nнеб (60–80 %) указывают на преобладанием свободных аминокислот в данных ферментолизатах (рис. 1, в). В то же время выход азотсодержащего вещества в раствор достигает своего максимума (около 48 %) (рис. 2). При дальнейшем проведении ферментолиза до 8 ч наблюдается практически полное расщепление водорастворимых пептидов до свободных аминокислот (Nам/Nнеб 80–100 %) (рис. 1, в). Выход азотсодержащих веществ в гидролизат снижается с 48 до 43 %, что вероятно, связано с ингибированием ферментолиза вследствие накопления свободных аминокислот (рис. 1, 2).

При сравнении ферментолиза проводимого папаином в течение 2 ч с автолизом за тот же промежуток времени установлено, что механизм каталитического процесса расщепления белков ОРК имеет различия. Так в гидролизатах полученных после проведения ферментолиза в течении 2 ч при использовании папаина (0,5 % к массе суспензии) в большей мере содержатся свободные аминокислоты (Nам/Nнеб 65 %) по сравнению с автолизатом (Nам/Nнеб 48 %). Наряду с этим выход азотсодержащих веществ в раствор больше на 10 %, что говорит о более эффективном использовании сырья при применении папаина, чем при автолизе.

Анализ зависимости содержания аминного азота в гидролизате при проведении ферментолиза ОРК под действием папаина и комплекса собственных ферментов показал возможность интенсификации процесса гидролиза в 3,2 раза при применении папаина, по сравнению с автолизом (рис. 3).

Таким образом, использование папаина при проведении ферментолиза ОРК позволяет эффективнее использовать отходы и сократить продолжительность процесса получения гидролизатов с высокой степенью гидролиза с 8 до 2,5 ч (рис. 3).

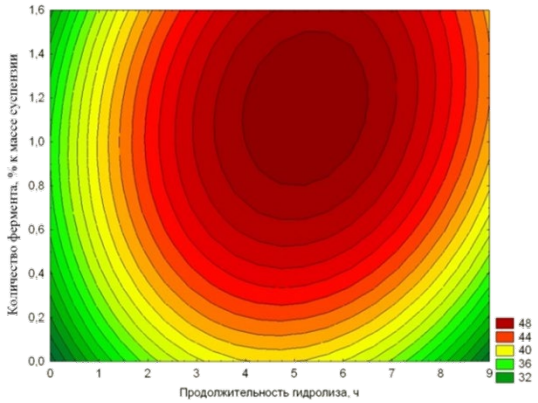


Рисунок 2. Динамика выхода азотсодержащих веществ в зависимости от продолжительности ферментолиза и количества фермента

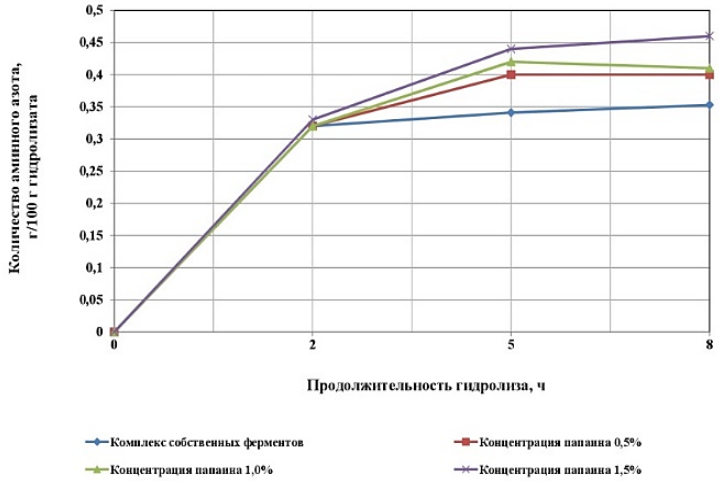


Рисунок 3. Динамика накопления аминного азота в гидролизате при проведении ферментолиза ОРК под действием папаина и комплекса собственных ферментов

На основании проведенных исследований установлено, что ферментолиз под воздействием папаина проходит ступенчато с образованием на первой стадии водорастворимых пептидов, с последующим их расщеплением до свободных аминокислот. Установлены рациональные режимы получения гидролизата с низкой степенью расщепления белка: продолжительность процесса до 3 ч, количество папаина до 1,5 %, температура 50 ± 2 °С, гидромодуль 1:1. Для получения гидролизата со средней степенью расщепления белка продолжительность – 3 – 6,5 ч, а с высокой степенью – 6,5 – 8 ч при соблюдении тех же прочих условий.

ЛИТЕРАТУРА

Аюшин Н.Б., Боровская Г.А. Хроматографическое изучение иммуностимулирующего препарата из зрительных ганглиев кальмара / Комплексная переработка дальневосточных объектов промысла, Известия ТИНРО Т. 114. 1992. С. 5–8.

Касьяненко Ю.И., Эпштейн Л.М., Федорец Ю.А., Майзель Е.Б., Розенгарт Е.В. Фосфатазная активность органов и тканей командорского кальмара / Исследования по технологии рыбы, беспозвоночных и водорослей дальневосточных морей, Владивоток. 1982. С. 8–15.

Кизеветтер И.В., Макарова Т.И., Зайцев В.П., Миндер Л.П., Подсевалов В.Н., Лагунов Л.Л. Технология обработки водного сырья. М.: Пищевая промышленность. 1976. 696 с.

Крутченский Г.В., Янчева Р.Г., Овчинников В.В., Ларина С.В., Надина Ю.К., Захарова М.Ю. Получение жира из печени кальмара / Рыбное хозяйство, № 10. 1989. С. 89–91.

Лазаревский А.А. Технохимический контроль в рыбообрабатывающей промышленности. – М.: Пищепромиздат. 1955. 518 с.

Максимюк Н.Н. О преимуществах ферментативного способа получения белковых гидролизатов. Фундаментальные исследования № 1. 2009. с. 34–35.

Мухин В.А., Новиков В.Ю. Ферментативные белковые гидролизаты тканей морских гидробионтов: получение, свойства и практическое использование. – Мурманск: ПИНРО. 2001. 97 с.

Пащенко В.Л., Сторублевцев С.А. Разработка технологии функционального продукта с применением коллагенового гидролизата. Фундаментальные исследования № 4. 2009. с. 127–134.

Свириденко Ю.Я., Мягконосов Д.С., Абрамов Д.В., Овчинникова Е.Г. Научно-методические подходы к развитию технологии белковых гидролизатов для специального питания. Часть. 2. Функциональные свойства белковых гидролизатов, зависящие от специфичности протеолитических процессов/ Пищевая промышленность № 6. 2017. С. 50–53.

Селюк О.Д. Фарш из голов и щупалец кальмара / Рыбное хозяйство № 4. 1968. С. 67–68.

Справочник по химическому составу и технологическим свойствам водорослей, беспозвоночных и морских млекопитающих/ под редакцией В.П. Быкова. М.: Изд-во ВНИРО, 1999. – 262 с.

Статистические сведения по рыбной промышленности России 2015–2016 гг. М.: ФГУП «ВНИРО». 2017. 73 с.

Степанцова Г.Е., Городниченко Л.В., Пациенко Е.В. Получение кормовой муки из отходов от разделки кальмаров по прессово-сушильной схеме / Разработка технологии белковых продуктов из океанического сырья. Сборник научных трудов. – Калининград. Изд. АтлантНИРО, 1989. С. 182–193.

Степанцова Г.Е. Мука из отходов от разделки кальмаров – эффективное кормовое средство / Г.Е. Степанцова [и др.] // Прогрессивные технологии производства продуктов из гидробионтов: сб. науч. тр. / КГТУ. – Калининград. 2001. С. 173–183.

Степанцова Г.Е., Пастушенков Л.В. О возможности получения лечебного (противоожогового и ранозаживляющего) средства из отходов от разделки кальмаров / Современные технологии обработки рыбы и морепродуктов. Сборник научных трудов. – Калининград: Изд-во АтлантНИРО. 1998. С. 70–78.

Телишевская Л.Я. Белковые гидролизаты: получение, состав, применение. Под ред. А.Н. Панина. М., Аграр. Наука. 2000. 295 с.

Технология рыбы и рыбных продуктов/ Под ред. А.М. Ершова: учебник. М.: Колос. 2010. 1064 с.

Холодная С.В. Сухой белковый рыбный концентрат – перспективный компонент стартовых кормов для осетровых рыб // Рыбохозяйственная наука на пути в XXI век: Тез. Докл. всерос. конф. Молодых ученых. – Владивосток: Изд-во ТИНРО-центра. 2001. С. 150–152.

Шевцова С.П. Особенности субстратной специфичности холинэстеразы кальмара Ommastrephes bartrami из вод юго-западной пацифики. Сообщение 2 / Исследования по технологии рыбных продуктов, Выпуск 7, Владивосток. 1977. С. 29–31

Clemente A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition / A. Clemente // Trends in Food Science & Technology. 2000. № 11. P. 254–262.

УДК 664.168

ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ НУТРИЦИОЛОГИЯ: ПРОДУКТЫ С САХАРОЗАМЕНИТЕЛЯМИ, СВОЕВРЕМЕННОСТЬ ИЛИ НЕАКТУАЛЬНОСТЬ

И.С. Полянская, А.Р. Козицина

Вологодская государственная молочнохозяйственная академия имени Н.В. Верещагина, Вологда, Россия

Сахарный диабет (СД) входит в число самых распространенных в мире хронических заболеваний. С 1980 года количество людей, страдающих СД, увеличилось почти в четыре раза. Причины роста числа больных диабетом носят комплексный характер, однако этот рост отчасти связан с увеличением числа людей, страдающих лишним весом, которое напрямую связано с проблемой низкого уровня физической активности и отсутствием правильного здорового питания [1].

В Российской Федерации распространённость СД за десять лет охватила (2005–2015 гг.) дополнительно 2,2 мил. человек, включая детей и подростков (рис. 1), а к 2018 г. превысила уже 10 млн. человек [2].

Снижение доходов населения ведёт к частичному замещению в рационах рыбы, молочных продуктов на хлебобулочные изделия из высокосортной муки, кондитерские изделия, и сладкие напитки, включающие в чистом виде быстрые углеводы и имеющие высокий гликемический индекс. При этом возникает углеводная зависимость, когда за счёт быстрых углеводов (сахарозы, глюкозы, фруктозы и галактозы в чистом виде) стимулируется подъём не только сахара в крови, но и выработка эндорфинов – гормонов удовольствия, серотонина [3]. Быстрые углеводы в небольшом количестве в сочетании с пектинами, например, во фруктах, овощах, ягодах – имеют по сравнению с чистыми углеводами, более низкий гликемический индекс.

Граждане России, по данным Минсельхоза в 2018 году употребили сахара на душу населения в два раза больше, рекомендованной Министерством здравоохранения нормы потребления, составляющей 24 кг.

С одной стороны, диетологи считают, что замена быстрых углеводов на сахарозаменители (как этап) недопустима на пути избавления от углеводной зависимостипри переходе в рационе к медленным углеводам, сбалансированным с полноценными белками, липидами, витаминами, биоэлементами, пищевыми волокнами и др. [4]. С точки зрения избавления от углеводной зависимости использование сахарозаменителей не актуально и является дополнительным препятствием.

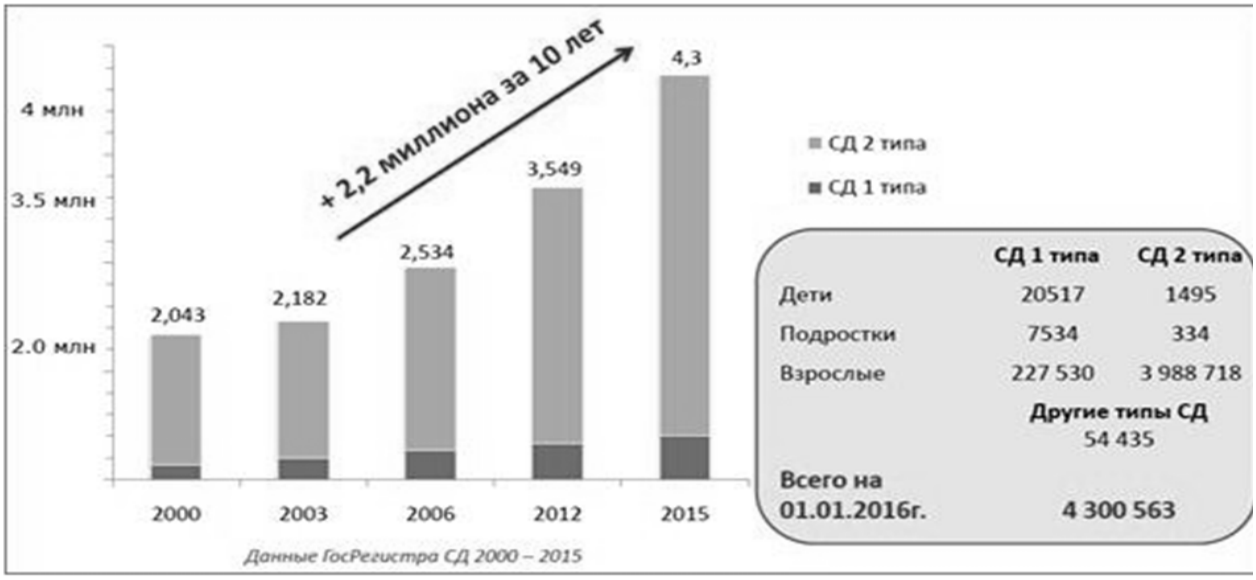


Рис. 1. Рост распространенности сахарного диабета в РФ [1]

С другой стороны, «полезные» медленные углеводы, в составе продуктов питания, а точнее, сами продукты питания, включая напитки, должны быть вкусными [5, 6], в том числе иметь сладкий вкус тогда, когда это предполагают укоренившиеся традиции (мороженое, сладкие йогурты, шоколад, халва, мармелад, зефир, творожная масса, молочный коктейль и др.). В настоящее время нет доказательств того, что увеличение продолжительности жизни, достигнутое ограничениями в питании, потреблением «безвкусной пищи» не приводит к снижению некоторых важных функциональных характеристик организма [5]. Неполноценное питание часто является причиной нарушений обмена веществ и развития сопутствующей патологии. Обычно это стойкие нарушения витаминного, минерального и других видов обмена. Стойкие нарушения обмена веществ сопровождаются длительно текущими, хроническими заболеваниями. Нарушенное питание создает благоприятную почву для развития иммунодефицитных состояний и снижения устойчивости организма к инфекциям, учащения сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний и др. [6].

Замена сахарозы функциональными подсластителями, не вызывающими инсулиновый всплеск в крови – актуальна, прежде всего для включения в рацион больных диабетом, но также и для профилактики СД, для уменьшения калорийности продуктов.

Стремительное развитие во всем мире нового направления в науке о питании – функционального питания – требует создания подсластителей нового поколения, не только безопасных, имеющих чистый сладкий вкус, высокие технологические характеристики, но и способных проявлять функциональные свойства, т. е. оказывать положительное воздействие на здоровье. Постоянно растущий интерес к низкокалорийным и диабетическим продуктам вызывает необходимость поиска эквивалентных заменителей сахара. Учитывая требования здорового питания, предпочтение отдаются подсластителям природного происхождения [1].

К сахарозаменителям и подсластителям природного происхождения относятся: неогесперидин ДС из кожуры цитрусовых, «морской» сахар, подсластитель из китайского фрукта «Ло Хан», филодульцин, эритритол, сорбитол, ксилит, тагатоза, тауматина, монеллин, стевиозид, эрнандульцин, «кленовый сахар», глицирризин солодки, полидекстрозу и др. При этом растет спрос на новые виды подсластителей.

Все подсластители имеет свои особые характеристики, и могут комбинироваться с другими подсластителями при разных соотношениях. При этом они могут вызывать синергический эффект. Важным являетсябезопасное количество подсластителя в рекомендуемой порции продукта, одновременно обеспечивающее функциональные свойства.

Например, дополнительные функциональные свойства продукту может придавать поли декстроза (водорастворимые пищевые волокна). Полидекстроза изготавливается из натуральных продуктов, обладает низким содержанием калорий, эффективно предупреждает запор, гипертонию, диабет, регулирует обмен липидов в организме человека, снижает уровень холестерина в крови, выводит из организма человека токсины. Ее энергетическая ценность составляет всего 1 ккал/г, т. е. в 4 раза меньше, чем у сахара [7]. Установленная дневная норма – 25–35 г., однако даже при единовременном приеме даже 50 г. полидекстрозы в организме человека не наблюдается нежелательных явлений.

Что касается эритритола, сорбитола, мальтитола и некоторых др. природных многоатомных спиртов, то обладая меньшей сладостью, чем сахароза, положительным функциональным мягким послабляющим действием, функцией улучшения микрофлоры желудочно-кишечного тракта в небольших количествах, для достижения необходимой потребительской сладости, они требуют комбинация с другими сахарозаменителями, во избежание излишнего слабительного эффекта, который может быть при одновременном употреблении уже 10 г. [7].

Клинические наблюдения показывали [8], что целенаправленная модификация углеводного состава специализированных пищевых продуктов за счет исключения быстровсасываемых рафинированных сахаров, использования смеси медленно перевариваемых и медленно всасываемых углеводов (модифицированный мальтодекстрин, фруктоза, мальтитол и др.), обогащения фруктоолигосахаридами (ФОС) и растворимыми ПВ позволяет корригировать нарушения углеводного и липидного обмена у больных СД второго типа.

Ещё один природный сахарозаменитель – стевиозид, который в 250–400 раз слаще сахара – белый кристаллический гигроскопический порошок легко растворимый в воде, устойчив к высокой температуре, используется для приготовления диетических и консервированных продуктов, практически не расщепляется в человеческом организме, стабилен при обработке и хранении и нетоксичен [1]. Высококачественный натуральный стевиозидиспользуют в рецептурах 40 % выпускаемых в Японии стране пищевых продуктов.

Однако, некоторые натуральные сахарозаменители, полученные из растений, содержат токсичные вещества: перилартин, хемслея, липпия, синсепалум, моморика – поэтому их применение недопустимо [1].

Среди синтетических сахарозаменителей, в целом большее число имеет существенные противопоказания. Цикламат – синтетическийсахарозаменитель на основе нефти, слаще сахара в 200 раз, канцероген, провоцирует рак. В 1969 году запрещен к применению на территории США и Канады. В 1975 году в Японии, Южной Корее, Сингапуре и Индонезии. Во время Второй мировой войны цикламат среди прочих дешевых продуктов поставлялся в концентрационные лагеря.

Сахарин и ацесульфам калия – канцерогенны. Аспартам (свитли, сластилин, сукразит, нутрисвит) провоцирует головные боли, усталость, сердцебиение, депрессию [8].

Таким образом, проблему применения подсластителей широко исследуют специалисты пищевой промышленности и медицины. Спрос на продукты питания с натуральными сахарозаменителями, включая напитки, с учетом роста заболеваний СД, вызванного в том числе избыточным потреблением сахарозы и перспективы сворачивания широкого распространения синтетических сахарозаменителей – имеет тенденцию к росту. Сахароза, синтетические сахарозаменители должны уступить место натуральным сахарозаменителям (подсластителям), для которых клинически показанабезопасность и функциональные свойства положительного влияния на здоровье потребителя методами доказательной медицины. Отправная стратегия, безусловно, заключается в повсеместном уменьшении количества сахара в продуктах и напитках, однако компилятивный вывод заключается в дальнейшем сокращении использования искусственных альтернатив сахара.

В то же время степень реальных знаний населения и даже медицинской общественности о здоровой пище и культуре питания продолжает оставаться недостаточной [6].

ЛИТЕРАТУРА

Тарасенко Н.А., Третьякова Н.Р. Натуральные сахарозаменители и подсластители для профилактики сахарного диабета // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 2 (часть 2).

Статистика сахарного диабета по странам в цифрах Источник: https://alldiabet.ru/statistika-saharnogo-diabeta-po-stranam-v-cifrah.html

Углеводная зависимость Ковальков. Как избавиться от углеводной зависимости? https://www.youtube.com/watch? v=OUwBm9RND_c

Диетолог Ковальков об углеводах хороших и плохих https://www.youtube.com/watch? v=bFXgIK0JrHU

ТутельянВ.А., А.И. Вялков А.И., А.Н. Разумов А.Н. и др. Научные основы здорового питания: – М.: Издательский дом «Панорама». – 2010. – 816 с.

Скальный, А.В. Основы здорового питания [Текст]: пособие по общей нутрициологии / А.В. Скальный, И.А. Рудаков, С.В. Нотова, Т.И. Бурцева, В.В. Скальный, О.В. Баранова. – Оренбург: ГОУ ОГУ, 2005. – 117 с.

Заявка на Патент РФ № 2019101712/10(002949) «Мороженое с функциональными свойствами». Авторы: Габриелян Д.С., Полянская И.С., Тиханова О.С. и др.

Шарафетдинов Х.Х., Плотникова О.А., Назарова А.М. и др. Специализированные пищевые продукты с модифицированным углеводным профилем в коррекции метаболических нарушений при сахарном диабете 2 типа // Вопр. питания. – 2017. – № 6. – С. 56–66.

Пищевые добавки, применяемые в общественном питании учебное пособие / Сост. И.В. Савочкина. – Брянск: Мичуринский филиал ФГБОУ ВО Брянский ГАУ. – 2015. – 128 с.

УДК 630.165.6:631

ПРИМЕНЕНИЕ БИОТЕХНИЧЕСКИХ ПРИЕМОВ ДЛЯ РАЗМНОЖЕНИЯ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО

[1] Т.А. Благодарова, [2] А.Ю. Кошелев,[3] А.И. Сиволапов

[1] Всероссийский НИИ лесной генетики, селекции и биотехнологии, Воронеж, Россия
[2,3] Воронежский государственный лесотехнический университет им. Г.Ф. Морозова, Воронеж, Россия

Дуб черешчатый в защитном лесоразведении центральной лесостепи России является главной незаменимой древесной породой, и основной задачей лесокультурного производства здесь является создание семенных дубрав.

Ускоренное получение высококачественного посадочного материала в настоящее время производится в лесных питомниках. Однако в ряде регионов России в действующих питомниках не всегда удается обеспечить выход с единицы площади стандартных сеянцев и саженцев. Поэтому в последние годы особое внимание ученых обращено на совершенствование агротехники их выращивания с помощью синтетических и биологических регуляторов [1, 3, 4, 6, 7].

Ценность предложенного агроприема (биостимуляция) состоит в том, что с помощью специально подобранных экологически безопасных отечественных биопрепаратов (наиболее перспективных и нового поколения – композиционных) позволяет обосновать их применение, в определенных дозах в предпосевной обработке семян для повышения выхода и качества посадочного материала хозяйственно – ценной породы (дуба черешчатого).

В 2018 г. наблюдался хороший урожай дуба черешчатого ранней фенологической формы. На территории опытной станции Воронежского государственного аграрного университета произрастают 80–90-летние деревья дуба, от лучших из них собраны желуди, часть из которых использованы для опытных посевов с применением биостимуляторов роста.

Изучено совместное влияние двух агротехнических приемов на рост (высота, диаметр, длина корня) и биомассу сеянцев. Результаты измерения линейных показателей и биомассы в воздушно-сухом состоянии опытных и контрольных сеянцев приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Биометрические показатели и биомасса 2-летних сеянцев дуба после предпосевной и корневой обработки сеянцев биостимуляторами

Стимуляторы и их концентрация (мл/л)	Высота стволика, см		Длина корня, см	
	M ± m	% от контроля	M ± m	% от контроля
Контроль (вода)	23,9 ± 0,46	100	38,1 ± 0,56	100
Лариксин (2,0)	25,1 ± 0,71	105	39,1 ± 0,67	103
Лариксин (0,2)	31,3 ± 1,17*	131	43,0 ± 0,55*	111
Альбит (1,0)	26,5 ± 0,62*	111	46,7 ± 0,55*	113
Альбит (0,1)	32,1 ± 1,38*	134	47,2 ± 0,64*	124
Супер-Гумисол (10,0)	33,5 ± 1,11*	140	48,9 ± 0,72*	128
Карвитол (0,02)	32,7 ± 0,84*	137	49,3 ± 0,51*	126
Рибав-Экстра (2,0)	29,2 ± 0,82*	122	49,7 ± 0,60*	130
Рибав-Экстра (1,0)	29,9 ± 0,74*	125	49,1 ± 0,57*	126
Фитоспектр (0,5)	33,7 ± 1,11*	141	48,5 ± 0,71*	127
Фитоспектр (1,0)	32,4 ± 1,35*	136	47,3 ± 0,62*	124
Циркон + Цитовит (0,1 + 1,0)	29,3 ± 0,84*	123	47,5 ± 0,69*	125

Примечание: Здесь и далее: –×-. (различие по сравнению с контролем достоверно при $НСР_{05}$), $t_{табл.}$ = 1,98; точность опыта от 3 до 4 %.

Данные, полученные в результате замеров, обработаны методами математической статистики с определением средних показателей, ошибки средних и критерия достоверности выявленных различий по критерию Стьюдента. Исследования показали положительный эффект стимуляции роста сеянцев в результате только предпосевной обработки семян.

Предпосевная обработка семян дуба биостимуляторами по результатам учета, положительно отразилась на росте сеянцев в высоту, практически во всех вариантах

Таким образом, использование биостимуляторов роста способствует ускорению получения стандартных сеянцев дуба.

Улучшения всхожести семян и роста сеянцев можно добиваться различными путями. Наиболее перспективное направление – это создание лесосеменной базы на селекционно-генетической основе, что позволит обеспечить хозяйства семенным сырьем высоких селекционных категорий. А поскольку хозяйства большую часть семян вынуждены заготавливать в обычных насаждениях, особого внимания заслуживает предпосевная подготовка семян.

В нашей стране удобрения на лесных питомниках практически не вносят. Но опыт внесения азотных удобрений в лесничествах Курской области показал положительный результат.

Удобрения использовать необходимо строго на научной основе с учетом рекомендаций агрохимических служб [5].

Растения нуждаются в оптимальном питании на протяжении всей своей жизни, поэтому в практике питательные вещества пополняют в разные сроки и вносят удобрения в виде основного (допосевного), припосевного (рядкового, очагового) и подкормок.

Основное удобрение включает всю дозу органического удобрения и большую часть (80–85 %) минеральных удобрений. Их вносят под основную вспашку почвы. Однако основное удобрение перемешивается с большим объемом почвы и большая часть внесенных химических элементов растениями не используется. В этом случае потребность в химических элементах обеспечивается внесением небольших доз (10–15 % от расчетного количества удобрений). Нами заложен опыт припосевного внесения удобрений (аммиачной селитры) на питомнике Правобережного лесничества ВГЛТУ. Посев желудей проведен под зиму одновременно с внесением удобрений 15 октября.

Опытные посевы заложены в лесорастительных условиях $В_2$ (свежие супесчаные легкие почвы), характеризующихся низким содержанием основных элементов питания (гумус – 1,03 мг / 100 г. почвы; $Р_2 0_5$ – 7,2 мг / 100 г. почвы; $К_2 О$ – 4,7 мг / 100 г. почвы).

Эти показатели свидетельствуют о том, что почвы бедны всеми макроэлементами. Почвы лесного питомника легкие по механическому составу, представлены крупнодисперсной фракцией, что не способствует удержанию и накоплению химических элементов, а значит, в почве идет непрерывное вымывание и расход питательных веществ. Для посева использовали желуди трех фракций:

– крупные (масса 1000 шт. составляла 6890 г.);
– средние (масса 1000 шт. составляла 4620 г.);
– мелкие (масса 1000 шт. составляла 3620 г.).

Таким образом, масса одного желудя составляла от 7,0 до 3,5 г.

Осенью следующего года воздушно сухая масса надземной части 1-летних сеянцев дуба колебалась от 10,0 г (контрольный вариант) до 20,6 г (у обработанных аммиачной селитрой), а подземной части от 12,6 г до 23,7 г соответственно. Средняя высота сеянцев колебалась от 13,2 ± 0,82 см (контроль) до 20,9 ± 0,64 см (обработанные аммиачной селитрой). Различия показаны на рисунке. Результаты дисперсионного анализа факторов приведены в таблице 2.

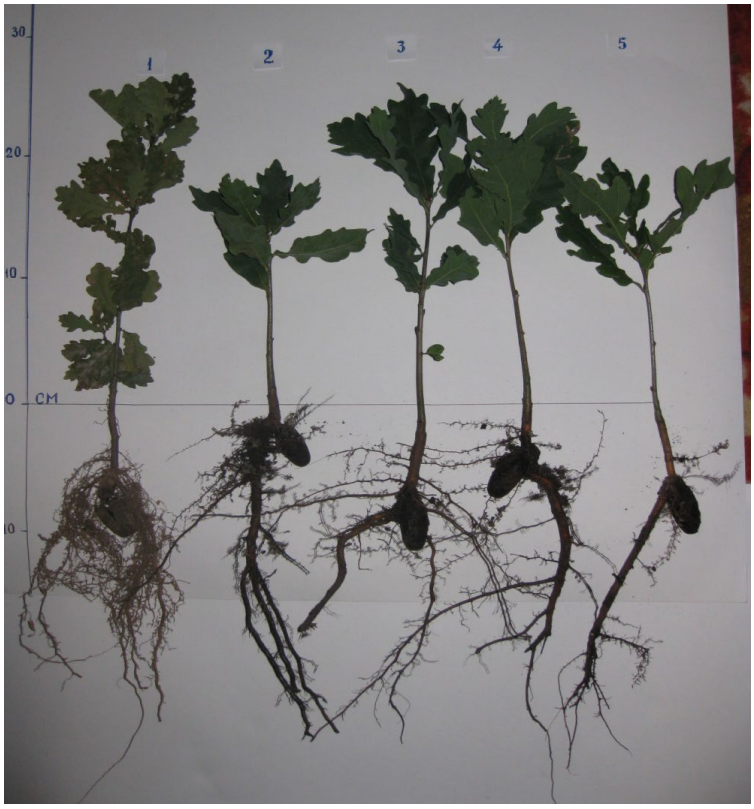


Рисунок – Вид 1-летних сеянцев дуба черешчатого, выращенных на питомнике УОЛ ВГЛТУ: 1, 2 – из крупных желудей и 3, 4 – из средних желудей, обработанных мочевиной; 5 – из средних желудей (сеянец – контроль)

Таблица 2 – Результаты однофакторного дисперсионного анализа роста сеянцев дуба, с предпосевной обработкой крупных желудей мочевиной

Источники вариации	Степени свободы	Сумма квадратов отклонений	Средний квадрат (σ^2)	$F_ф$	F_{st}	
					P = 0,05	P = 0,01
Межгрупповая	3	136,9	45,6	18,24	4,8	9,8
Внутригрупповая	6	15,2	2,5			
Общая	9	152,1	16,9			

Дисперсионный анализ влияния обработки желудей мочевиной на интенсивность роста по высоте сеянцев показал достоверность результатов. Нулевая гипотеза отвергается с вероятностью (***P = 0,99***) в отношении влияния мочевины на рост по высоте сеянцев. Средняя высота 1-летних сеянцев из семян, обработанных мочевиной, – 20,4 см, у контроля 13,0 см. Поскольку $F_ф > F_{st}$ в достоверности найденных показателей сомневаться не приходится. Сила влияния изучаемого фактора невысокая $\eta^2 = 9\ \%$, что подтверждает перспективность использования в условиях лесных супесчаных почв питомника ВГЛТУ аммиачной селитры для ускорения роста сеянцев дуба в высоту.

Нами также проведено влияние газовой декомпрессии на всхожесть желудей дуба и рост сеянцев.

Газовая декомпрессия является одним из методов дезинтеграции клеток [2]. Дезинтеграция представляет комплекс биологических и биотехнологических процессов используемых для анатомического нарушения целостности клеток: измельчения и раздробления. Дезинтегратор – это аппарат для разрушения клеток и тканей.

Нами дезинтеграция использовалась как способ стерилизации и инактивации живых систем, в частности при обработке семян дуба черешчатого для изучения влияния газовой декомпрессии на всхожесть и рост сеянцев.

Одним из способов дезинтеграции клеток является газодекомпрессионный шок.

Обработку семян дуба производили в специальной декомпрессионной камере, которая соединялась с источником сжатого газа. В качестве газа использовался жидкий кислород. Опыты начинали проводить при давлении газа в декомпрессионной камере 5 атмосфер и времени обработки 1 час. Данная насыщающая среда оказывает на семена не только механическое воздействие, но и вступает в химические реакции внутриклеточных структур, оказывая тем самым разрушающее влияние на клетку.

В опытных посевах дуба на питомнике ВГЛТУ сеянцы дуба из намоченных семян в течение суток с ПЛСУ Правобережного лесничества обработанные кислородом в декомпрессионной камере 5 атмосфер показали незначительное превышение по высоте, листья сеянцев не поражаются мучнистой росой в отличие от контроля. Наблюдения продолжаются.

Больший интерес этот способ дезинфекции представляет для биотехнологии in vitro при получении регенерантов трудноукореняемых сортообразцов гибридного тополя (тополь белый×осина) и ольхи. Первый опыт показал положительные результаты. Но окончательные выводы делать рано, эксперимент продолжается.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алиев, Э.В. Влияние предпосевной обработки семян на всхожесть и рост сеянцев сосны обыкновенной ростовыми веществами / Э.В. Алиев, А.И. Сиволапов // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 4; URL: www.science-education.ru/110–9909.

2. Ванн Р.Д. Теория и практика декомпрессии // Медицинские проблемы подводных погружений. М. Медицина. – 1988. – С. 418–469.

3. Пентелькина, Н.В. Опыт использования стимуляторов роста древесных растений в Архангельской области [Текст] / Н.В. Пентелькина, А.Н. Буторин // Проблемы лесоведения и лесоводства: материалы Третьих Мелеховских чтений, посвященных 100-летию со дня рождения И.С. Мелехова – Архангельск, 15 – 16 сентября 2005 г. – Архангельск: АГТУ, 2005. – С. 157 – 161.

4. Пентелькина, Н.В. Выращивание сеянцев лиственницы в питомниках с помощью стимуляторов роста [Текст] / Н.В. Пентелькина, С.К. Пентелькин // Лесное хозяйство Северного Кавказа // Сб.науч. тр. НИИГорлесэкол, 2004, вып. 24. – С. 98–102.

5. Сиволапов, А.И. Выращивание крупномерных сеянцев дуба черешчатого с применением минеральных удобрений // Успехи современного естествознания [Текст] / А.И. Сиволапов, Т.А. Благодарова, А.Ю. Кошелев № 11, 2016. С. – 70 – 74

6. Чукарина, А.В. Испытание стимуляторов роста для выращивания сеянцев хвойных пород в условиях степного Придонья [Текст] / А.В. Чукарина // Лесохоз. информ., № 10–11, 2008. – С. 31–32.

7. Эргашева, М.В. Использование биологических и химических стимуляторов для повышения посевных качеств семян, устойчивости и энергии роста сеянцев сосны обыкновенной в Брянском лесном массиве: Автореф. дис. канд. с-х. наук. – Брянск, 2006. – 20 с.

УДК 328

БИОПРЕПАРАТИВНОЕ СОПРОВОЖДЕНИЕ ПОСТУРОЖАЙНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Е.И. Кипрушкина, В.С. Колодязная, И.А. Шестопалова, С.С. Мишин, Т.В. Нагиев

Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, г. Санкт-Петербург, Россия
Ленинградский НИИСХ БЕЛОГОРКА, Ленинградская область, Россия

Успешное решение задачи сохранения плодоовощной продукции неразрывно связано с научной разработкой и внедрением в практику новых эффективных методов защиты урожая.

В решении проблем экологической безопасности и охраны окружающей среды актуальны способы защиты растительной продукции от инфекционных заболеваний, основанные на применении не химически синтезированных препаратов, а биологических средств защиты [1, 5, 6]. Картофель – одна из важнейших полевых культур, обладающая высоким потенциалом урожайности, крайне восприимчива к возбудителям грибных, бактериальных и вирусных болезней.

Хорошо известно, что микроорганизмы по-разному реагируют на изменяющиеся условия окружающей среды. Они различаются по скорости роста, наличию или отсутствию устойчивых к неблагоприятным условиям среды морфологических форм, синтезу запасных питательных веществ в начале развития или в конце, наличию или отсутствию вторичного метаболизма, эффективности использования субстрата, конкурентоспособности, особенностям популяционной динамики в природных микробиоценозах и т. д.

В разработке микробиологических средств защиты растений наибольшую важность представляет поиск активной культуры антагониста – биологической основы создаваемого препарата. Штаммы, выделенные в одном регионе, при определенных биотических и абиотических факторах в силу их сопряженной коэволюции с растением-хозяином в направлении защиты могут не выявить своих потенциальных возможностей в других условиях [2, 3].

Из потенциально полезного биоразнообразия уже на первом этапе необходимо проводить скрининг биоконтрольных микроорганизмов-колонизаторов эпифитной, ризосферной микрофлоры, которые уже адаптированы к специфическим условиям этой экологической ниши, имеют высокую комплементарность к конкретным условиям существования данного вида растительного объекта, типа почвы, реакции среды [4].

В эпифитном микробиоме картофеля, находящегося на длительном холодильном хранении, выявлено большое разнообразие бактерий различных филогенетических групп. Значительный массив прокариот представлен доминантными семействами *Micrococcaceae, Rhizobiaceae* и *Xanthomonadaceae* (рисунок 1). При анализе нуклеотидных последовательностей гена 16S-рРНК установлено наличие в постурожайном микробиоме клубней картофеля бактерий, принадлежащих семейству *Pseudomonadaceae*. Их доля невысока, однако, данные бактерии хорошо приспособлены к низким температурам холодильного хранения, могут расти и метаболизировать при +4ºС, подавляющее большинство представителей этого семейства обладает биоконтрольными свойствами.

В ходе проведённых исследований из образцов эпифиты и ризосферы картофеля было выделено большое количество морфотипов культивируемых бактерий, которые после физиолого-биохимического тестирования распределились по 6 группам. Доминирующие виды бактерий в выделенном прокариотном сообществе были представлены грамотрицательными аэробными подвижными палочками, принадлежащими к роду *Pseudomonas*, многие из которых образовывали флюоресцирующий пигмент и сидерофоры.

Кроме направленной селекции для поиска перспективных биоконтрольных штаммов представляет интерес отбор бактерий с их дальнейшим скринингом по антагонистической активности. Проявление антагонизма бактерий в отношении к патогенам в условиях *in vitro* является критерием в отборе штаммов. Каждый определенный штамм будет эффективен в качестве средства защиты, если он правильно подобран к конкретным условиям. Температура является основным лимитирующим фактором в проявлении активности штаммов.

Тестированием микроорганизмов *in vitro* на широком спектре возбудителей патогенеза плодоовощной продукции в условиях постурожайных технологий холодильного хранения оценена комплексная антагонистическая активность выделенных штаммов и коллекционных культур.

Изучаемые штаммы бактерий-антагонистов специфичны в отношении исследуемых тест-грибов: от варьирования диаметра зоны ингибирования роста патогенов до строгой селективности, наряду с проявлением различий в характере антагонистических свойств внутри вида отчетливо проявляются и штаммовые различия. Высокая чувствительность по отношению к бактериям-антагонистам среди тестерных культур отмечена у агрессивного гриба *Fusarium solani*.

При оценке *in vitro* стабильности бактериальных суспензий при различных концентрациях наибольший антагонистический эффект оказала концентрация бактерий $10^{1\circ}$ кл/мл, со снижением титра активность была ниже, но антагонистический эффект все же был значимым для всех исследуемых культур (таблица 1).

Таблица 1. – Зона ингибирования тест-гриба *Botrytis cinerea* при различных концентрациях бактериальных суспензий (метод лунок)

Титр бактериальной суспензии, кл/мл	Зона отсутствия роста тест-культур *Fusarium solani*, мм				
	Ps. fluorescens Pt	*Ps. fluorescens* 228	*B. species KR* 076	*B. species KR* 083	*B. subtilis Ч13*
10^7	15,8 ± 0,5	16,2 ± 0,8	20 ± 1,5	14,2 ± 0,8	16 ± 1,5
10^8	17,2 ± 1,4	22,6 ± 0,1	27 ± 2,6	17,6 ± 0,1	19 ± 2,6
10^9	22,6 ± 2,3	22,1 ± 1,1	30 ± 1,4	21,1 ± 1,1	29 ± 1,4
$10^{1\circ}$	31,5 ± 2,7	24,3 ± 1,2	32,8 ± 2,4	24,3 ± 0,7	38 ± 2,2

Приспособление психрофильных микроорганизмов к пониженным температурам проявляется в изменении состава мембран (в ней повышается содержание ненасыщенных жирных кислот), ферменты имеют низкие температурные оптимумы активности. В целом белки психрофилов по сравнению с мезофильными содержат больше полярных групп, чем гидрофобных, их транспортные системы также работают лучше при низких температурах [7].

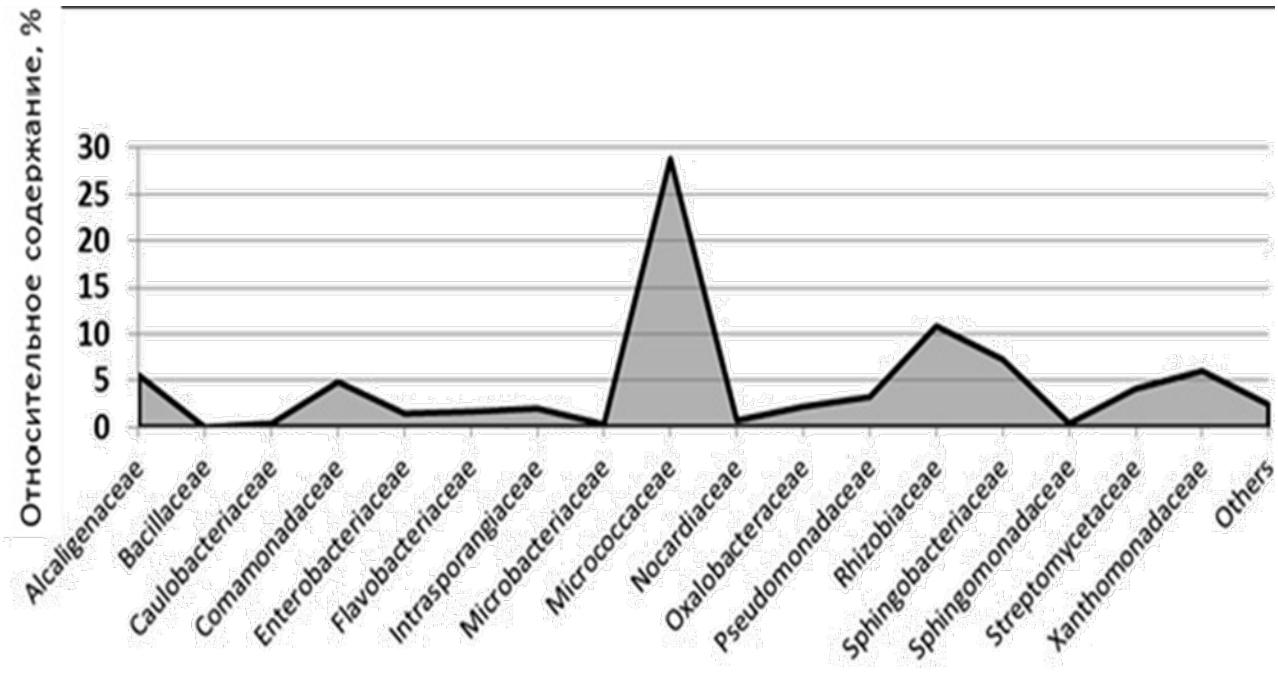


Рисунок 1 – Бактериальный консорциум эпифитного микробиома картофеля сорта Невский при холодильном хранения (3 ± 1) ºС.

Выявленная адаптивность тестируемых штаммов в условиях пониженных температур на поверхности клубней позволяет характеризовать их как перспективных продуцентов защитных биопрепаратов, рекомендованных для биоконтроля картофеля при холодильном хранении.

Таким образом, по результатам изучения и оптимизации основных параметров культивирования, позволяющих получить культуры штаммов с высоким титром клеток, необходимыми колониальными, физиологическими, морфологическими, биохимическими особенностями, наибольшей антагонистической активностью отобраны эффективные штаммы с высоким уровнем проявления биоконтрольных свойств, способные координировать различные метаболические процессы в зависимости от изменений окружающей среды.

ЛИТЕРАТУРА

Боронин А.М., Кочетков В.В // Агро XXI. – 2000. – № 3

Кипрушкина Е.И., Чеботарь В.К. Применение микробных препаратов в технологиях хранения картофеля // Достижения науки и техники АПК, № 1. Т. 29, 2015. – С. 33–35.

Кожемяков А.П., Лактионов Ю.В., Попова Т.А. и др. Агротехнологические основы создания усовершенствованных форм микробных биопрепаратов для земледелия // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – Т.50. - № 3. – С. 369–377.

Проворов Н.А. Сельскохозяйственная биотехнология и биоинженерия. - М.: ЛЕНАНД, 2015. - 704 с.

Соколов М.С., Литвишко Е.Б. // Защита растений. – 1993. – № 11.

Чеботарь В.К., Завалин А.А., Кипрушкина Е.И. Эффективность применения биопрепарата экстрасол. М.: Издательство ВНИИА, 2007. – 216 с.

Islam TMD, Toyota K. Effect of moisture conditions and pre-incubation at low temperature on bacterial wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum* // Microbes Environ. - 2004. - № 19. - P.244–247.

УДК 579.64

ВЛИЯНИЕ КОНСОРЦИУМА МИКРООРГАНИЗМОВ НА РАЗВИТИЕ ФИТОПАТОГЕНОВ

С.А. Ибрагимова

Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва, Саранск, Россия

В настоящее время отмечается все большее распространение известных заболеваний растений, а также появление новых форм возбудителей. Массовое применение химических препаратов приводит к уничтожению не только патогенной, но и полезной микрофлоры, что негативно отражается на окружающей среде. В связи с этим остро встает вопрос о создании полифункциональных биопрепаратов, позволяющих стимулировать рост растений, обеспечить их защиту от фитопатогенов и снизить химическую нагрузку на почву.

Наиболее часто с заболеваниями растений широко используются микроорганизмы родов *Bacillus* и *Pseudomonas*. Расширение спектра действия биопрепаратов возможно за счет создания консорциума на основе микроорганизмов, обладающих разными функциональными свойствами.

Ранее на кафедре биотехнологии, биоинженерии и биохимии был выделен новый высокоэффективный штамм *Pseudomonas aureofaciens* В-11634, для которого было показано наличие ростостимулирующих и фунгицидных свойств [1, 2, 3]. Целью данной работы явилось получение уникального консорциума микроорганизмов на основе бактерий родов *Pseudomonas, Azotobacter, Rhodococcus* и *Bacillus* и исследование его влияния на развитие фитопатогенов.

Объектом исследования служили бактерии: *Pseudomonas aureofaciens* В-11634, *Pseudomonas putida* В-4492, *Bacillus subtilis* В-2918, *Azotobacter vinelandii* В-5787 и *Rhodococcus erythropolis* Ас 858 Т. В качестве тест объектов использовали фитопатогены *Alternaria alternata, Fusarium culmorum, Botrytis cinerea*.

Консорциум микроорганизмов получали путём добавления маточных растворов в различных соотношениях, оценивая количество вносимого посевного материала путём фильтрации, промывки и высушивания образца. Консорциум выращивали на мелассной среде, г/л: меласса – 40, KH_2PO_4 – 0.2, K_2HPO_4 – 0.8, $NaNO_3$ – 1.

Совместное глубинное культивирование консорциума бактерий и фитопатогенов проводили на минеральной среде без источника углерода следующего состава, г/л: KH_2PO_4 – 1; $MgSO_4 \times 7 H_2O$ – 0.2, NaCl – 0.1, K_2HPO_4 – 0.1, $(NH_4)_2SO_4$ – 0.1.

Грибной мицелий и консорциум микроорганизмов вносили в соотношении 1:5. При использовании спорового материала проводили, смыв стерильной водой с 1 пробирки скошенного агара. Количество вносимых спор составляло 10^5 в 1 мл. Колбы выдерживали 24 ч в динамических условиях на качалке при 100 об/мин, 28 °С, затем в статистических условиях при 25 °С в течение 20 суток. Периодически проводили микроскопирование исследуемой суспензии для определения степени разрушения грибного мицелия под воздействием бактерий.

Для определения степени ингибирования роста грибов в присутствии микробного сообщества использовании метод блоков. Диаметр колонии гриба измеряли на 3 и 10 сутки. Расчет ингибирующей активности микроорганизмов проводили по формуле Эббота (1) как процент ингибирования роста колонии гриба:

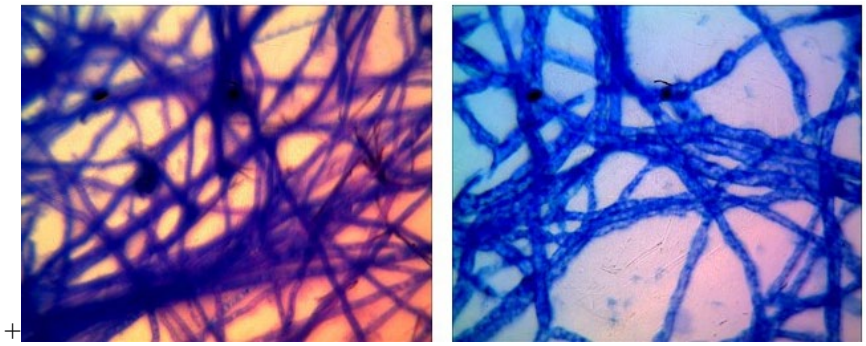
$$100 (Дк – До) / Дк, \quad (1)$$

где Дк – диаметр колонии гриба в контроле, мм; До – диаметр колонии гриба в опыте, мм.

Антагонистические свойства бактерий определяются широким спектром синтезируемых ими первичных и вторичных метаболитов, к которым можно отнести антибиотики, аминогликозиды, монолактамы, сидерофоры, ферменты (в частности, глюконазы и хитиназы), псевдомоновые кислоты и др. [4,5].

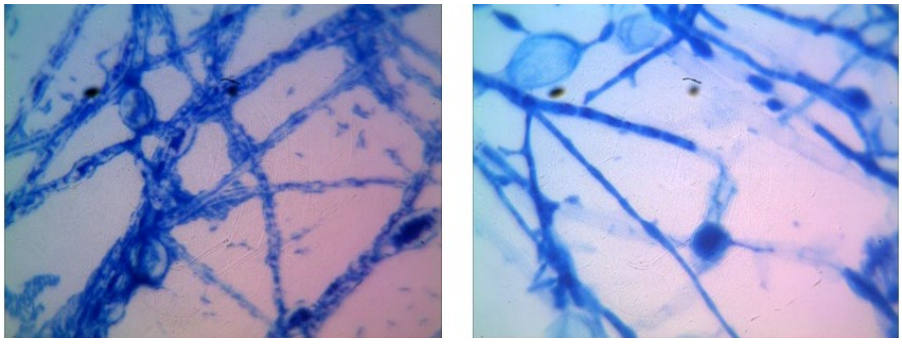
На первом этапе было исследовано влияние исследуемых бактерий в составе консорциума на развитие грибного мицелия в условиях глубинного культивирования. В качестве тест-объекта использовали гриб *Fusarium culmorum*, мицелий которого имел разветвленную, сегментированную структуру с выраженной базофилией (рисунок 1а). Исследуя микропрепарат контрольного образца фитопатогена на протяжении 20 суток, были отмечены изменения в структуре, характерные для старения грибного мицелия (рисунок 1б).

При культивировании на минеральной среде без источника углерода в присутствии бактерий были выявлены структурные изменения мицелия: вздутые лизированные участки гиф, наличие непроросших спор, мицелий слабоокрашенный и частично разрушенный (рисунок 2).



а б

Рисунок 1 – Мицелий фитопатогена *F. culmorum* на 1-е (а) и 15-е (б) сутки роста х 1000



а б

Рисунок 2 – Мицелий фитопатогена *F. culmorum* при воздействии бактерий на 6-е (а) и 15-е (б) сутки роста х 1000

Таким образом, уже на ранних сроках совместного культивирования наблюдалось антагонистическое воздействие консорциума микроорганизмов на фитопатоген. При увеличении сроков культивирования споры гриба практически не развивались, разрушение мицелия происходило наиболее интенсивно, вдоль гиф в большом количестве наблюдалось скопление бактериальных клеток. К концу периода наблюдения было отмечено полное разрушение грибного мицелия, что свидетельствует о высокой фунгицидной активности исследуемого консорциума бактерий.

На втором этапе работы был определен процент ингибирования роста фитопатогенов в присутствии микробного консорциума при поверхностном культивировании. В качестве тест-объектов использовали грибы *Fusarium culmorum, Alternaria alternata* и *Botrytis cinerea*. Было отмечено, что степень антагонистического воздействия бактерий различна в зависимости от вида фитопатогена. На 3 сутки культивирования процент ингибирования роста грибов составил в отношении *Fusarium culmorum* – 84 %, *Alternaria alternate* – 90 %, *Botrytis cinerea* – 85 %.

Несмотря на антагонистическое влияние бактерий, на 10-е сутки процент ингибирования роста снизился и составил в отношении *Fusarium culmorum* – 78 %, *Alternaria alternate* – 86 %, *Botrytis cinerea* – 70 %, что вызвано ростом фитопатогенов. По сравнению с контролем в опыте наблюдалось наличие слаборазветвленного рыхлого мицелия, стелющегося по поверхности агара (рисунок 3).



а б

Рисунок 3 – Колонии фитопатогенов в присутствии бактериального консорциума на 3-и (а) и 10-е (б) сутки роста

Результаты проведенного опыта еще раз свидетельствуют о высокой антагонистической активности исследуемого консорциума, включающего бактерии разных таксономических групп. На основании этого можно заключить, что данные микроорганизмы могут являться основой для создания биопрепарата, обладающего ростостимулирующими, фунгизащитными и биодеградирующими свойствами.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18–416–130003.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Лукаткин А.А. Исследование антифунгальных свойств *Pseudomonas aureofaciens* 2006 / А.А. Лукаткин, С.А. Ибрагимова, В.В. Ревин // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2009. – № 6 (100). – С. 211–213.

2. Бурова Ю.А. Развитие фитопатогенных грибов при совместном культивировании с *Pseudomonas aureofaciens* 2006 / Ю.А. Бурова, А.С. Захаркина, Д.С. Королёв [и др.] // В сборнике: Проблемы лесной фитопатологии и микологии. Сборник материалов VIII Международ. конф. – 2012. – С. 120–124.

3. Захаркина А.С. Изучение развития семян кукурузы при обработке бактериальными суспензиями на основе ризосферных бактерий *Pseudomonas aureofaciens* и *Azotobacter vinelandii*. / А.С. Захаркина, С.А. Ибрагимова, В.В. Ревин // В сборнике: Ресурсосберегающие экологически безопасные технологии производства и переработки сельскохозяйственной продукции. Лапшинские чтения: Материалы IX Международ. науч.-практ. конф. – 2013. – С. 68–71.

4. Логинов О.Н. Роль бактерий-антагонистов фитопатогенов в защите сельскохозяйственных растений от болезней / О.Н. Логинов, Н.Н. Силищев, А.И. Мелентьев. – Уфа: Гилем, 2001. – 66 с.

5. Штерншис М.В. Биологическая защита растений / М.В. Штерншис, Ф.С. – У. Джалилов, И.В. Андреева [и др.] – М. : Колос, 2004. – 264 с.

УДК 632.4

ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ К СТЕБЛЕВОЙ РЖАВЧИНЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ SR ГЕНОВ В ОБРАЗЦАХ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ВИР

И.Д. Созина[1], В.В. Соляникова[1], О.А. Баранова[2], О.П. Митрофанова[3]

[1] Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия
[2] Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия
[3] Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия

Заболевание стеблевая ржавчина пшеницы вызывается фитопатогенным грибом Puccinia graminis f. sp. tritici и представляет большую угрозу для пищевой и сельскохозяйственной промышленности, так как может вызывать до 100 % потери урожая. В связи с усилением вредоносности стеблевой ржавчины на территории Российской Федерации и возможным заносом высоковредоносной расы этого патогена – Ug99 и ее биотипов, особое значение приобретает идентификация эффективных генов устойчивости в российских сортах пшеницы (Баранова и др, 2018).

Особый интерес для селекции представляют гены: *Sr28, Sr25, Sr2, Sr38, Sr57/Lr34 и Sr31* (Анпилогова Л.К., Волкова Г.В., 2000; Баранова и др, 2015; Лапочкина и др., 2016).

Целью исследования стала оценка устойчивости 14 сортов и 16 перспективных селекционных линий озимой мягкой пшеницы из коллекции ВИР к стеблевой ржавчине и идентификация в них Sr генов с использованием молекулярных маркеров.

Основным методом, используемым для идентификации генов является метод ПЦР. Зерна исследуемых образцов пшеницы проращивали в течение 5 суток. Из проростков выделяли ДНК CTAB методом (Murray, Thompson, 1980). Для идентификации генов устойчивости (*Sr28, Sr25, Sr2, Sr38, Sr57/Lr34* и *Sr31*) использовали специфичные праймеры (http://maswheat.ucdavis.edu). Детекцию продуктов амплификации проводили методом электрофореза в 2 % агарозном геле.

Оценка устойчивости проведена по принятой лабораторной методике на стадии проростков (Jin et al., 2007). Реакцию проростков на инокуляцию суспензией *P. graminis* проводили на 10–12 сутки по стандартной шкале Стекмена (Stakman et al., 1962).

В работе были использованы омская популяция возбудителя стеблевой ржавчины 2018 года и субпопуляция с сорта Нивосибирская 41, а также монопустульные изоляты гриба – «З.1» из зерноградской популяции патогена и «$Ф_{18}$.6» из саратовской популяции гриба.

На первом этапе работы 14 сортов и 16 перспективных селекционных линий озимой мягкой пшеницы из коллекции ВИР были оценены на устойчивость к омской популяции *P. graminis*, и к двум монопустульным изолятам гриба (З.1, $Ф_{18}$ .6). К омской популяции патогена были устойчивы 6 образцов, к популяции с сорта Новосибирская 41 – 11 образцов, к изоляту З.1 – 12 образцов и к изоляту $Ф_{18}$.6 – 5 образцов. Из изученных сортов и линий только сорт Настя и линии KS-18474, KS-18683 и KS-18709 были устойчивы ко всем взятым на анализ популяциям и изолятам возбудителя стеблевой ржавчины. В результате идентификации генов устойчивости с использованием молекулярных маркеров, ген *Sr31/Lr26* был идентифицирован с помощью маркера scm9 у 5 образцов из 30 исследуемых. Ген *Sr57/Lr34* идентифицирован в 11 сортах с использованием маркера csLV34 (рис. 1). Из генов, эффективных против Ug99, в образцах был идентифицирован ген *Sr28* (маркер wPt-7004) в 7 образцах (рис. 2).

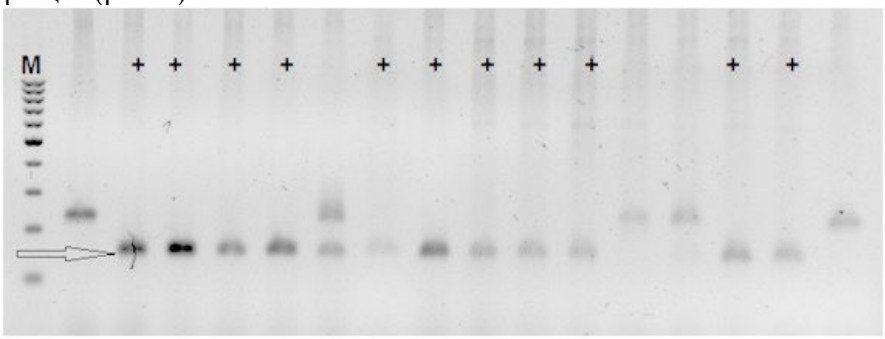


Рисунок 1 – Идентификация гена Sr57/Lr34 с использованием молекулярного маркера csLV34: M – маркер молекулярного веса 100 bp «Fermentas». (+) – образцы с геном Sr57. Стрелкой указан диагностический фрагмент с молекулярным весом 150 п.о.

Приём материалов статей по адресу: actbio@mail.ru

Результаты исследования 14 сортов и 16 линий мягкой озимой пшеницы из коллекции ВИР по устойчивости к стеблевой ржавчине и идентификации Sr генов представлены в таблице (табл. 1).

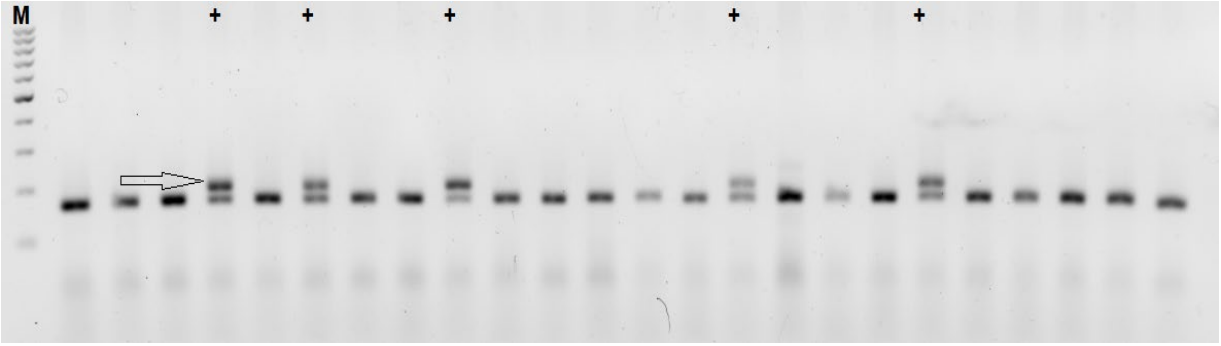


Рисунок 2 – Идентификация гена Sr28 с использованием молекулярного маркера wPt7004: M – маркер молекулярного веса 100 bp «Fermentas». (+) – образцы с геном Sr28. Стрелкой указан диагностический фрагмент с молекулярным весом 194 п.о.

Таблица 1 – Результаты оценки устойчивости к стеблевой ржавчине и идентификации Sr генов

Номер в каталоге ВИР	Название	Реакция на инокуляцию				Гены устойчивости					
		3.1 мп	Новос 41 (2018) поп	$Ф_{18}$.6 мп	Ом 18 (2018)	Sr31	Sr57/Lr34	Sr28	Sr2	Sr38	Sr25
64676	Zemlyachka odes'ka	3	2+	4	4	-	+	-	-	-	-
65052	Otaman	3	2+	3	3	-	-	-	-	-	-
65061	Titona	2+	3-	3	3	-	-	-	-	-	-
66334	Капитан	3	3-	3	4	-	-	+	-	-	-
66335	Лилит	2++	3-	3	4	-	-	-	-	-	-
66503	Быль	2+	3	3-	4	-	+	+	-	-	-
66504	Базис	3+	3	3	4	-	-	-	-	-	-
66505	Вьюга	3+	3-	3-	4	-	-	-	-	-	-
65656	Славица	3	3	3-	4	-	-	+	-	-	-
65671	Прелюдия	3	2+	3	4	-	-	-	-	-	-
65672	Фируза 40	2+	2+	3+	3-	-	-	-	-	-	-
65673	Феония	3	3	3	3	-	+	-	-	-	-
65674	Арабеска	3	2+	3	3-, 3	-	+	-	-	-	-
65675	Настя	0; 1-	1-	2-	0	-	-	-	-	-	-
65761	KS-18474	1–	1	1	0; 1–	+	-	+	-	-	-
65762	KS-19535	0; 1	X1/3	3,3-	3-	+	+	-	-	-	-
65763	KS-18551	3	3	3	4	-	+	-	-	-	-
65764	KS-18558	4	3+	4	3	-	-	-	-	-	-
65765	KS-18562	2+	4	3	3	-	-	+	-	-	-
65766	KS-18572	3	3-	4	2+, 3	-	-	-	-	-	-
65767	KS-18635	3	3-	4	3-	-	+	-	-	-	-
65768	KS-18641	4	3-	3	2++	+	+	-	-	-	-
65769	KS-18683	1	1	1	1	+	+	-	-	-	-
65770	KS-18691	4	3	3+	2+	-	-	-	-	-	-
65771	KS-18701	3-	1,2	2+	3–	-	-	-	-	-	-
65772	KS-18708	3-	3-	3	3-	-	-	+	-	-	-
65773	KS-18709	1	1	2	1	+	-	-	-	-	-
65774	KS-18731	3–	3	3	3-	-	-	+	-	-	-
65775	KS-18794	1	2+	3	3	-	+	-	-	-	-
65776	KS-18736	1	3	3	3-	-	+	-	-	-	-

Таким образом, в результате анализа выявлены перспективные для селекции линии, с идентифицированными генами устойчивости – KS-18474 (*Sr31 + Sr57 / Lr34 + Sr28*), KS-18683 (*Sr31*) и KS-18709 (*Sr31 + Sr57 / Lr34*). Гены *Sr2, Sr25*, и *Sr38/Lr37* в проанализированном материале обнаружены не были.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jin Y., Singh R.P., Ward R.W. Wanyera R., Kinyua M., Njau P., Fetch T., Pretorius Z.A., Yahyaoui A. Characterization of seedling infection types and adult plant infection responses of monogenic Sr gene lines to race TTKS of Puccinia graminis f. sp. tritici // Plant Disease. 2007. – С. 1096–1099.

2. MASWheat site: maintained by Marcelo A. Soria. [Электронный ресурс]. Дата обновления: 12.04.2019. URL: http://maswheat.ucdavis.edu/Index.htm (Дата обращения: 12.07.2019).

3. Murray, M.G. and Thompson, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8. 1980. – С. 4321–4325.

4. Stakman E.C., Stewart D.M., Loegering W.Q. Identification of physiologic races of Puccinia graminis var. tritici. United States Department of Agriculture – Agricultural Research Service. 1962. E-617 (rev)

5. Анпилогова Л.К., Волкова Г.В. Методы создания искусственных инфекционных фонов и оценки сортообразцов пшеницы на устойчивость к вредоносным болезням (фузариозу колоса, ржавчинам, мучнистой росе). – Краснодар, 2000. – 28 с.

6. Баранова О.А., Лапочкина И.Ф., Анисимова А.В., Гайнуллин Н.Р., Иордан-ская И.В., Макарова И.Ю. Идентификация генов Sr у новых источников устойчивости мягкой пшеницы к расе стеблевой ржавчины Ug99 с ис-пользованием молекулярных маркеров. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015; 19(3). – С. 316–322.

7. Баранова О.А., Михайлова Л.А., Коваленко Н.М., Хакимова А.Г., Пюккенен В.П., Митрофанова О.П. Устойчивость образцов озимой мягкой пшеницы из коллекции генетических ресурсов растений вир к стеблевой ржавчине (*Puccinia graminis f. sp.tritici*): Каталог. – Санкт-Петербург, 2018. – 111 с.

8. Лапочкина И.Ф., Баранова О.А., Шаманин В.П., Волкова Г.В., Гайнуллин Н.Р., Анисимова А.В., Галингер Д.Н., Лазарева Е.Н., Гладкова Е.В., Ваганова О.Ф. Создание исходного материала яровой мягкой пшеницы для селекции на устойчивость к стеблевой ржавчине (*Puccinia graminis Pers. f. sp. tritici*), в том числе и к расе Ug99, в России. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016; 20(3). – С. 320–328.

УДК 663.1

ПОЛУЧЕНИЕ ПИЩЕВОГО УКСУСА ИЗ ВТОРИЧНЫХ РЕСУРСОВ ПИВОВАРЕННОЙ ОТРАСЛИ

О.С. Егорова, Д.Р. Летфуллина

Всероссийский научно-исследовательский институт пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности – филиал Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова, РАН, Москва, Россия

Пивоварение – одна из активно развивающихся отраслей пищевой промышленности России. В последние годы наиболее быстрорастущим был сегмент безалкогольного пива, рост объемов производства этого напитка в 2018 г. составил 36,6 % [1]. На сегодняшний день безалкогольное пиво производят тремя методами: остановленное брожение, деалкоголизация и диализ. Наиболее эффективным методом является мембранная фильтрация (диализ), в результате которого образуется диализат, содержащий этиловый спирт. Таким образом, производители безалкогольного пива сталкиваются с проблемой рационального использования и учета спирта образующегося при производстве диализата.

Одним из наиболее эффективных способов его применения является производство пищевого уксуса. По способу производства различают: столовый уксус, вырабатываемый путем разбавления синтетической уксусной кислоты водой; биохимический уксус, получаемый в результате окисления спирта уксуснокислыми бактериями в уксусную кислоту, а также винный и фруктовый [2–6].

При производстве пищевого уксуса биохимическим методом используют два способа культивирования уксуснокислых бактерий: циркуляционный (поверхностный) и глубинный. В зависимости от производственных мощностей предприятия может применяться как циркуляционный, так и глубинный способ производства. Каждый из этих способов имеет свои достоинства и недостатки.

Целью настоящей работы был выбор оптимальных параметров процесса окисления спирта в диализате. В качестве объектов исследований использовали образцы пивных диализатов, сконцентрированных до объемных долей спирта 5,0 и 8,0 %.

Уксуснокислое брожение проводили глубинным способом, для проведения которого использовали штамм микроорганизмов Acetobacter aceti ВНИИПБТ-66. Культивирование проводили методом постепенного накопления биомассы и повышения физиологической активности бактерий путем последовательного пересева на питательные среды. Для культивирования штамма использовали жидкую среду следующего состава: спирт этиловый ректификованный – 7,0 % об.; уксусная кислота (ледяная) – 0,7 %; $(NH4)_2$ HPO_4 0,5 %; KH_2 PO_4, – 0,2 %; $MgSO_4$ 0,2 %.

Известно, что оптимальная температура для работы уксуснокислых бактерий составляет 30 ± 2 °С. Требуемую температуру в окислителе поддерживали путем подачи воды в рубашку.

Для изучения влияния режимов аэрации на функциональную активность уксуснокислых бактерий при получении уксуса из пивных диализатов проводили опыт, в котором в качестве исходной среды использовали концентрат диализата с объемной долей этилового спирта 8,0 %.

Определяли влияние режимов аэрации на функциональную активность уксуснокислых бактерий. Опыт проводили в вертикальных стеклянных резервуарах с рубашкой вместимостью 1,5 дм^3 (колонки). Воздух в резервуар непрерывно подавали микрокомпрессором снизу-вверх через мелкопористую керамическую насадку. Ежедневно отбирали пробы культуральной жидкости с целью определения в ней массовой концентрации органических кислот и объемную долю остаточного спирта. Процесс окисления проводили до объемной доли остаточного спирта 0,15–0,3 %.

С целью уточнения оптимального количества воздуха, необходимого в процессе уксуснокислого брожения, его расход меняли от 2 до 5 дм^3/ч на 1 дм^3 культуральной жидкости. Наибольшее количество уксусной кислоты образовывалось при расходе воздуха от 3 до 5 дм^3/ч. Продолжительность цикла окисления при этом составила 5–6 сут, в то время как при расходе 2 дм^3/ч технологический цикл увеличивался до 8 сут.

Так как при увеличении расхода воздуха с 3 до 5 дм^3/ч накопление уксусной кислоты практически не увеличивается, за оптимальный вариант выбран расход 3 дм^3/ч на 1дм^3 среды.

Следующим этапом работы было определение оптимальной стартовой концентрации уксусной кислоты.

Из практики приготовления спиртового уксуса биохимическим способом известно, что стартовая концентрация уксусной кислоты в культуральной жидкости, при которой происходит процесс окисления спирта уксуснокислыми бактериями, влияет на выход готового продукта и его качество. При определении влияния стартовой концентрации уксусной кислоты на функциональную активность уксуснокислых бактерий окисление диализата проводили при различных стартовых концентрациях уксусной кислоты от 4,5 до 7,0 г / 100 см^3. При этом сумма стартовых концентраций и объемной доли этилового спирта составляла 8,0 %. Результаты накопления уксусной кислоты в процессе окисления этилового спирта при различной стартовой концентрации уксусной кислоты приведены на рис. 1.

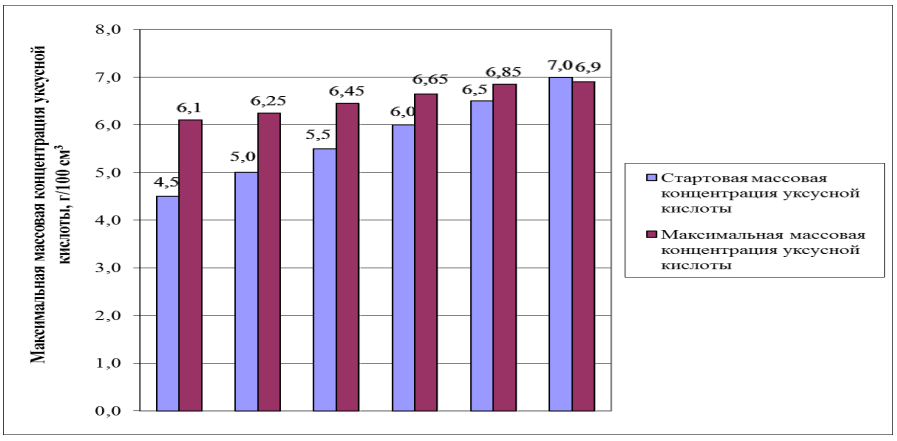


Рисунок 1 – Накопление уксусной кислоты в процессе окисления этилового спирта при различной стартовой концентрации уксусной кислоты

Как видно, максимальная продуцирующая способность уксуснокислых бактерий (выход уксусной кислоты 86 %) наблюдается при стартовой концентрации уксусной кислоты 6,5–7,0 г / 100 см^3, обуславливающей фазу развития продуцента, которая характеризуется ограниченным ростом новых клеток и высокой окисляющей способностью культуры. При стартовой концентрации ниже 5,5 г / 100 см^3 выход уксусной кислоты значительно уменьшается (79 %), так как создаются условия для роста биомассы уксуснокислых бактерий.

Дальнейшие исследования проводили при стартовой концентрации уксусной кислоты 6,5 г / 100 см^3. Процесс окисления проводили при расходе воздуха 3 дм^3/ч на 1 дм^3 среды.

В настоящее время при промышленном производстве спиртового уксуса в качестве материала-носителя для иммобилизации Acetobacter aceti, как правило, используют буковую стружку. Длительное использование стружки приводит к загрязнению самого уксуса взвесями, образующимися от разбухшей стружки, что ведет к увеличению стоимости очистки готового продукта. На древесной насадке за счет особенностей ее строения более интенсивно протекают процессы слизеобразования и формирование застойных зон, что приводит к снижению производительности установки из-за перезарядки аппарата. Для конкурентоспособности уксуса на рынке необходимо снизить его себестоимость за счет использования более технологичного носителя. В настоящей работе для получения пищевого уксуса из пивных диализатов с использованием иммобилизации уксуснокислых бактерий, в качестве бионосителей были выбраны цеолит NaX и полиэтилен высокого давления марки 15803–020 ГОСТ 16337–77, разрешенный для использования в пищевой промышленности. В качестве контроля использовали древесную буковую стружку.

При получении уксуса из пивного диализата определяли массовую концентрацию уксусной кислоты, объемную долю остаточного спирта (рис. 2).

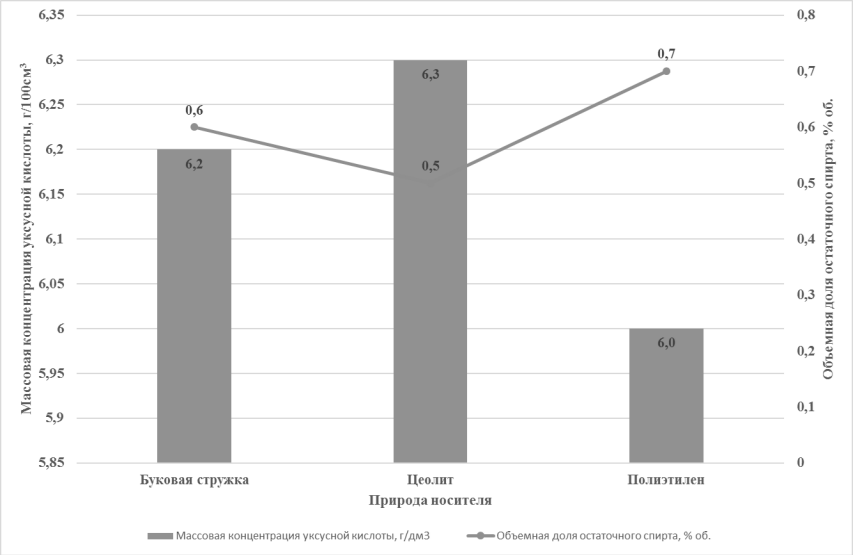


Рисунок 2 – Сравнительная диаграмма массовой концентрации уксусной кислоты и объемной доли остаточного спирта в зависимости от носителя при получении уксуса из пивного диализата поверхностным способом.

При оптимальных условиях культивирования наибольшее количество уксусной кислоты образовалось в среде с цеолитом и составило 6,3 г/100 см^3, при этом объемная доля остаточного этилового спирта была минимальной и составила 0,5 %.

Цеолит за счет множества каналов способен регулировать состав газовой среды в жидкости (количество растворенного кислорода и углекислого газа). Это является важным фактором для жизнедеятельности уксуснокислых бактерий и оказало положительное влияние на процесс получения уксуса в данных условиях культивирования.

В полученном уксусе определяли качественный и количественный состав летучих компонентов, органических кислот и аминокислот. Результаты определения летучих соединений в пивных диализатах и уксусе, полученном из них, представлены в табл. 1.

Таблица 1 – Массовая концентрация летучих компонентов в пивных диализатах с различной объемной долей этилового спирта и в уксусах, полученных из них.

Летучие компоненты	Массовая концентрация, мг/дм^3			
	Диализаты с объемной долей спирта, %		Уксус из пивного диализата с объемной долей спирта, %	
	5,0	8,0	5,0	8,0
Этилацетат	4,1	10,5	1,2	1,2
Метанол	0,4	0,8	Не обн.	0,5
1-пропанол	9,8	17,4	3,4	12,8
Изобутанол	13,2	23,7	10,5	19,2
Изоамилацетат	0,2	0,6	Не обн.	Не обн.
1-бутанол	0,4	0,7	0,2	0,5
Изоамилол	50,1	88,4	21,0	69,4
Гексанол	0,05	0,07	Не обн.	Не обн.
Этиллактат	0,2	0,3	0,5	1,0
Этилкаприлат	Не обн.	Не обн.	0,2	0,8
Фенилэтиловый спирт	20,3	21,3	28,2	32,4
Сумма	**98,7**	**163,8**	**65,2**	**137,9**

Таблица 2 – Массовая концентрация аминокислот в пивных диализатах с различной объемной долей этилового спирта и в уксусах, полученных из них, мг/дм^3

Кислота	Диализаты с объемной долей спирта, %		Уксус из пивного диализата с объемной долей спирта, %	
	5,0	8,0	5,0	8,0
Аспарагиновая кислота	0,4	0,5	0,9	1,2
Глютаминовая кислота	0,5	0,5	0,6	0,8
Аспарагин	7,4	7,1	7,4	7,5
Гистидин	0,6	0,5	0,3	0,4
Серин	2,0	0,7	2,8	1,3
Глютамин	6,9	1,9	7,5	2,5
Аргинин	0,4	0,1	1,1	0,3
Глицин	1,1	1,0	6,4	6,6
Треонин	4,4	4,2	6,1	5,8
Аланин	15,3	12,7	42,8	38
Тирозин	0,6	0,5	1,3	1,2
Валин	1,9	1,5	5,7	4,5
Метионин	5,4	1,8	7,1	3,6
Триптофан	0,6	0,4	1,1	0,8
Изолейцин	2,2	1,4	4,1	3,4
Фенилаланин	0,6	0,5	2,4	2,5
Лейцин	2,3	1,2	3,2	2,4
Лизин	0,5	0,4	0,8	0,7
Сумма	**53,4**	**36,9**	**101,6**	**83,5**

Как видно, в наибольшем количестве в пивных диализатах содержатся высшие спирты: изоамилол, изобутанол, 1-пропанол. Содержание летучих компонентов в уксусе из пивного диализата с объемной долей спирта 8,0 % в 2 раза выше, чем из диализата с объемной долей спирта 5,0 %. В опытных образцах уксуса этот показатель несколько снизился по сравнению с диализатами. При этом возросло содержание фенилэтилового спирта, эфиров этиллактата, этилкаприлата и этилкапрата, обуславливающих специфичность продукта.

Исследования количественного и качественного состава органических кислот показали, что органические кислоты содержатся в незначительных количествах и представлены яблочной, молочной и янтарной кислотами. Суммарная массовая концентрация органических кислот в диализатах,

сконцентрированных до объемной доли спирта 5,0 % и 8,0 %, невысока и составляет 1,0 и 0,4 г/дм^3 соответственно. В образцах полученного уксуса, кроме уксусной кислоты, другие органические кислоты содержатся в незначительных количествах.

При исследовании количественного и качественного состава аминокислот в пивных диали-затах было идентифицировано 18 аминокислот (табл. 2).

Суммарная массовая концентрация аминокислот в диализатах невысока и в сумме составляет 36,9–53,4 г/дм^3. Уксуснокислые бактерии интенсивно синтезируют аспарагиновую кислоту, серин, глицин, треонин, аланин, валин, триптофан, изолейцин, а также циклические ароматические аминокислоты тирозин и фенилаланин, участвующие в сложении специфического аромата. Как видно, сумма аминокислот в обоих образцах уксуса выше, чем в исходных диализатах почти в 2 раза в уксусе из диализата с объемной долей спирта 8,0 % и более чем в 2 раза из диализата с объемной долей спирта 5,0 %.

В результате проведенного органолептического анализа установлено, что уксус, полученный из сконцентрированных пивных диализатов, обладает характерными специфическими органолептическими свойствами, с легким пивным ароматом в сочетании с хлебными тонами.

В результате проведенных исследований установлено:

– оптимальный расход воздуха в процессе уксуснокислого брожения пивного диализата, сконцентрированного до объемной доли этилового спирта 8,0 %, составляет 3 дм^3/час на 1дм^3 среды.

– стартовая концентрация уксусной кислоты влияет на функциональную активность уксуснокислых бактерий при получении уксуса из пивных диализатов. Максимальная продуцирующая способность уксуснокислых бактерий наблюдается при стартовой концентрации уксусной кислоты 6,5 г / 100 см^3, обуславливающей фазу развития продуцента, которая характеризуется ограниченным ростом новых клеток и высокой окисляющей способностью культуры. При стартовой концентрации ниже 5,5 г / 100 см^3, выход уксусной кислоты значительно уменьшается, так как создаются условия для роста биомассы уксуснокислых бактерий;

– в процессе уксусной ферментации пивных диализатов происходит активное накопление аминокислот, сумма аминокислот в образцах уксуса выше, чем в исходных диализатах;

– в процессе уксусной ферментации пивных диализатов происходит накопление β-фенилэтилового спирта, синтез эфиров этиллактата и этилкаприлата, обуславливающих органолептические свойства продукта;

– использование цеолита NaX в качестве материала-носителя для иммобилизации Acetobacter aceti в оптимальных условиях культивирования способствует максимальному выходу уксусной кислоты, при этом объемная доля остаточного этилового спирта остается минимальной.

ЛИТЕРАТУРА

1 Пивоваренная отрасль России: итоги 2018, перспективы 2019 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.beerunion.ru/doc/Presentation-SRP.pdf

2 Галкина, Г.В. Получение пищевого уксуса с использованием спиртосодержащих отходов и вторичных ресурсов / Г.В. Галкина, В.И. Илларионова, Е.В. Куксова, Г.С. Волкова, Е.В. Горбатова // Производство спирта и ликероводочных изделий. – 2006. – № 4. – С. 34–35.

3 Волкова, Г.С. Ресурсосберегающая технология производства уксуса с использованием вторичных ресурсов спиртового производства / Г.С. Волкова, Е.В. Куксова // Производство спирта и ликероводочных изделий. – 2011. – № 1. – С. 16–19.

4 Поляков, В.А. Технология производства пищевого уксуса и товаров бытовой химии из вторичных ресурсов и отходов спиртового производства / В.А. Поляков, Г.В. Галкина, Г.С. Волкова, В.И. Илларионова, Е.В. Куксова // Международная научно-практическая конференция «Биотехнология. Вода и пищевые продукты» в рамках Московского международного конгресса «Биотехнология: Состояние и перспективы развития». – Москва, 2008. – С. 269.

5 Волкова, Г.С. Технология производства спиртового уксуса и молочной кислоты на основе переработки вторичных сырьевых ресурсов / Г.С. Волкова, Е.Н. Данилкина, Е.А. Федосеева, Е.Е. Широбокова // Сборник Материалов V Международной научно-практической конференции «Инновационные пищевые технологии в области хранения и переработки сельскохозяйственного сырья: фундаментальные и прикладные аспекты». – Краснодар, 2015. – С. 111–115.

6 Коршик, Т.С. Разработка и товароведная характеристика новых видов уксусов и бальзамов с использованием адаптационных добавок: автореф. дис… канд. техн. наук / Т.С. Коршик; Орл. гос. техн. ун-т. – Орел, 2007. – 24 с.

УДК 631.53.011 + 57.043 + 633.81

ВЛИЯНИЕ РЕЖИМОВ ИМПУЛЬСНОГО ОСВЕЩЕНИЯ НА ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТМИНА И ПАЖИТНИКА В ЗАКРЫТОЙ СИСТЕМЕ СИНЕРГОТРОНА 1.01

В.Н. Зеленков[1,2,3], В.В. Латушкин[1], М.И. Иванова[3], Н.Ю. Свистунова[2], С.В. Гаврилов[1], П.А. Верник[1]

[1] Институт стратегий развития, Москва, Россия
[2] Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, Москва, Россия
[3] Всероссийский научно-исследовательский институт овощеводства – филиал Федеральный научный центр овощеводства, Московская область, Россия

Вопрос о влиянии светового фактора на прорастание семян не имеет до сих пор однозначного решения [1]. У некоторых растений для прорастания семян воздействие света необходимо – виды Nicotiana, Lythrum, Chloris и др. [2], для других необходима, наоборот, темнота (особенно у фацелии, амаранта и др.) [3]. Согласно ГОСТ 12038–84 и ГОСТ Р 55294–2012 на методы проращивания семян, семена пажитника рекомендуется проращивать в темноте, семена тмина – на свету или в темноте. У светочувствительных видов реакция прорастающих семян на свет регулируется фитохромной пигментной системой и зависит от гормонального статуса [1, 4]. Для многих культур воздействие облучения имеет неспецифический характер, свет можно заменить другими факторами – температурным, химическим и т. д. [5].

Влияние импульсных режимов освещения, в свою очередь, практически не изучено. Поэтому целью настоящей работы явилось изучение влияния импульсного режима освещения на динамику прорастания семян тмина обыкновенного и пажитника посевного.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент проводили в синерготроне модели 1.01 конструкции АНО «ИСР» (закрытой камере с цифровым программным управлением основными параметрами внешней среды) и термостате ВИЛАР.

Объектом исследований служили семена и проростки тмина обыкновенного и пажитника сенного из коллекционного фонда ВИЛАР.

Проращивание семян проводили в чашках Петри согласно ГОСТ 12038–84 с изменениями – использовалась подложка из минеральной ваты фирмы «Агрос». Увлажнение проводили по мере подсыхания подложки водопроводной водой. Количество семян по 25 семян в чашке Петри, повторность трехкратная. Длительность эксперимента 14 суток. После достижения сеянцами крышки чашек Петри крышки снимались, чтобы дать возможность сеянцам свободно расти. Температура проращивания в синерготроне 23–25° С. Уровень интенсивности света, создаваемый светодиодными светильниками красного и синего света на уровне субстрата в период действия импульса составил 240–290 мкМоль/ м^2 * с, 24 ч в сутки. Использовались следующие режимы импульсного облучения: 1с / 3 с (длительность импульса 1 с, перерыв – период следования импульса 3 с); 1 с / 2 с; 1 с / 1 с; 1 мс / 3 мс. Контроль – проращивание в темноте, проводили в термостате ВИЛАР при переменной температуре – 20° С (16 часов в сутки) и 30 С (8 часов).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Прорастание семян тмина в эксперименте снижалось при всех режимах импульсного облучения, особенно резко при 1/1 с, а также 1/2 с (рис. 1) При режиме 1/1 с энергия прорастания снижалась на 50 % по сравнению с контролем, всхожесть – на 62,6 % (рис 1–2) В то же время при импульсах 1/3 с и 1/3 мс энергия прорастания семян тмина близки к контрольному варианту.

Ингибирующий эффект сохранился при дальнейшем прорастании семян тмина (т. е. к дате определения всхожести). Даже в вариантах 1/3 с и 1/3 мс наблюдалось уменьшение показателей всхожести семян по сравнению с контролем.

Энергия прорастания и всхожесть семян пажитника приближались к 100 % в контроле (проращивание в темноте) и незначительно снижались при импульсном облучении – на 1,3–2,7 %. Очевидны генетические отличия в реакции семян растений на импульсное облучение – ингибирующий эффект наблюдали только для семян тмина.

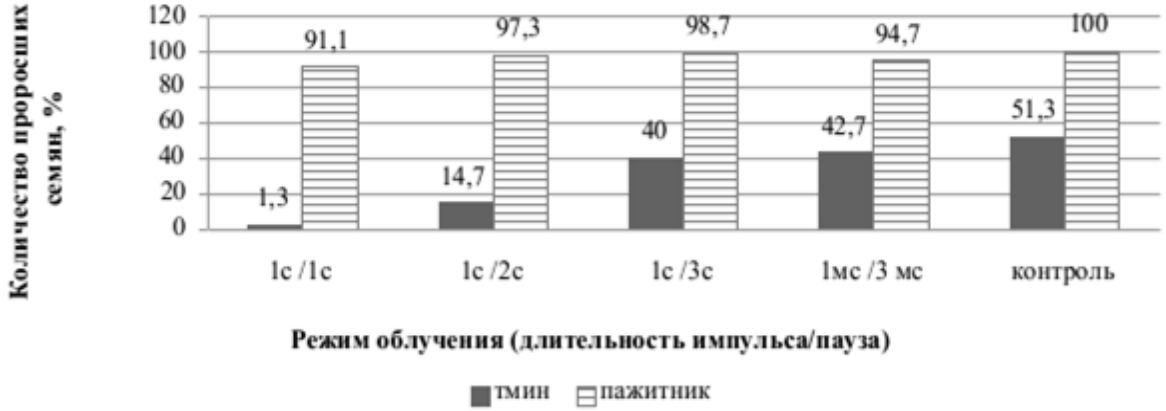


Рисунок 1 – Энергия прорастания семян при разных режимах импульсного облучения, %

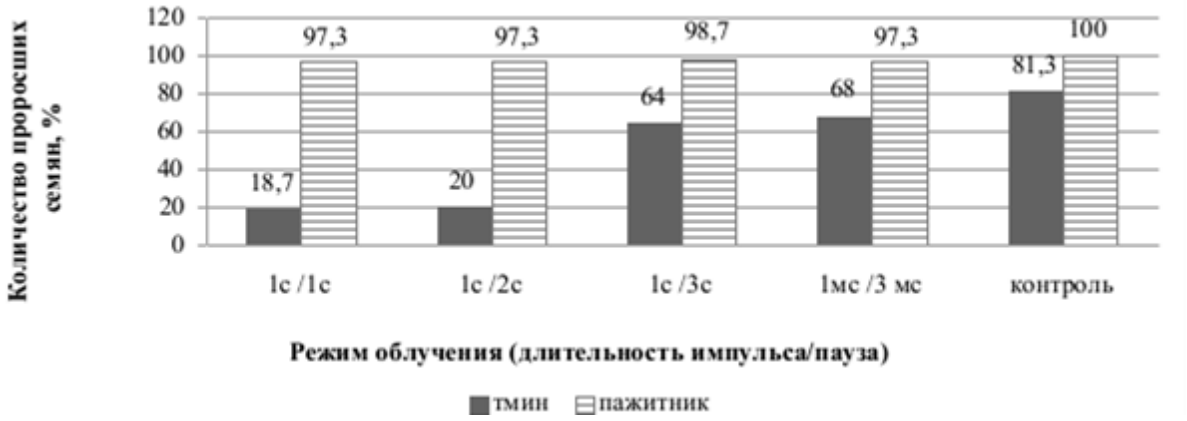


Рисунок 2 – Всхожесть семян в зависимости от режимов импульсного облучения, %

Таблица 1 – Динамика прорастания семян тмина и пажитника в зависимости от режимов импульсного облучения

Сутки от посева семян	тмин			пажитник		
	7	11	14	3	4	7
Контр.	53,3	81,3	81,3	100	100	100
1с / 3 с	40	64	64	98,7	98,7	98,7
1 с / 2 с	14,7	20	20	97,3	97,3	97,3
1 с / 1 с	1,3	18,7	18,7	94,7	97,3	97,3
1мс / 3мс	42,7	68	68	100	100	100

Изучение динамики прорастания семян (табл. 1) показало, что всхожесть и энергия прорастания семян пажитника практически одинаковы. На 4-е сутки проращивания количество проросших семян увеличилось только в одном варианте опыта, и в дальнейшем не изменялось с течением времени. Семена тмина – значительно более тугорослые, количество проросших семян увеличивалось в период до 11 суток с момента посева семян.

Измерения высоты сеянцев пажитника в динамике показали (рис. 3), что первые несколько дней наблюдался активный рост сеянцев во всех вариантах, однако впоследствии (примерно через 11 суток после посева семян) рост прекращался практически полностью. Предположительно, не происходило полномасштабного переключения растений на автотрофный тип питания (фотосинтез), а запасы питательных веществ семени к этому моменту практически исчерпываются. Для выявления причин данного явления необходимо проведение углубленных исследований.

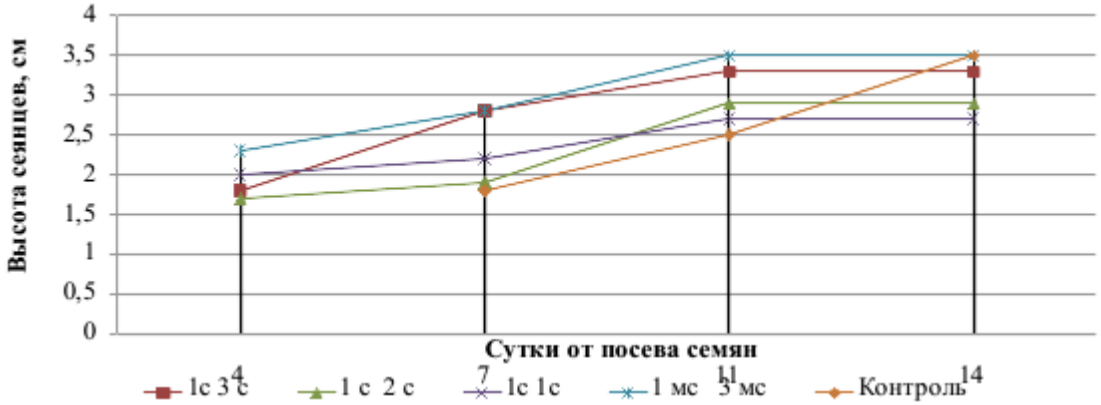


Рисунок 3 – Динамика роста сеянцев пажитника при разных режимах импульсного облучения

Сеянцы тмина продолжали рост вплоть до 14-ч суток после посева, но после этой даты рост прекращался во всех вариантах эксперимента, аналогично пажитнику (табл. 2)

Таблица 2 – Влияние импульсного облучения на динамику роста сеянцев тмина

Сутки от посева семян	тмин	
	11	14
контроль	-	1,0
1с / 3 с	0,9	1,7
1 с / 2 с	0,5	1,1
1 с / 1 с	0,5	0,8
1 мс / 3 мс	1,0	1,9

Определение надземной биомассы сеянцев в конце периода выращивания (рис. 4) показало значительное увеличение данного показателя при импульсном облучении по сравнению с контролем (темнота). Так, при режиме 1/3 мс прирост составил для тмина 57 %, для пажитника 107 %.

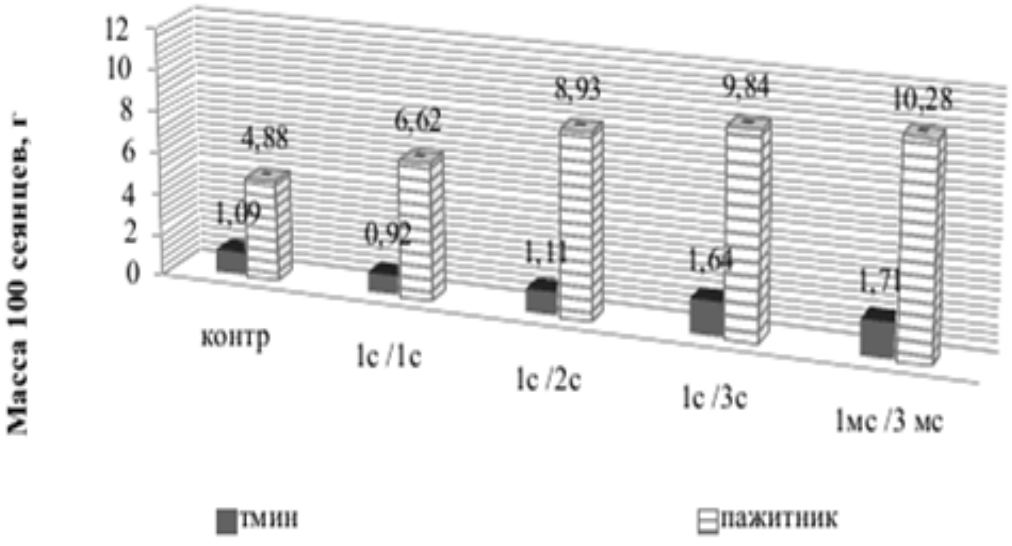


Рисунок 4 – Биомасса 100 сеянцев на 14-е сутки после посева семян в зависимости от режимов импульсного облучения

По эффективности к режиму 1/3 мс близок режим 1/3 с, наименее эффективен -1/1 с. Необходимо отметить, что различия вариантов по высоте сеянцев не были столь значительны, как различия по биомассе (рис. 5).

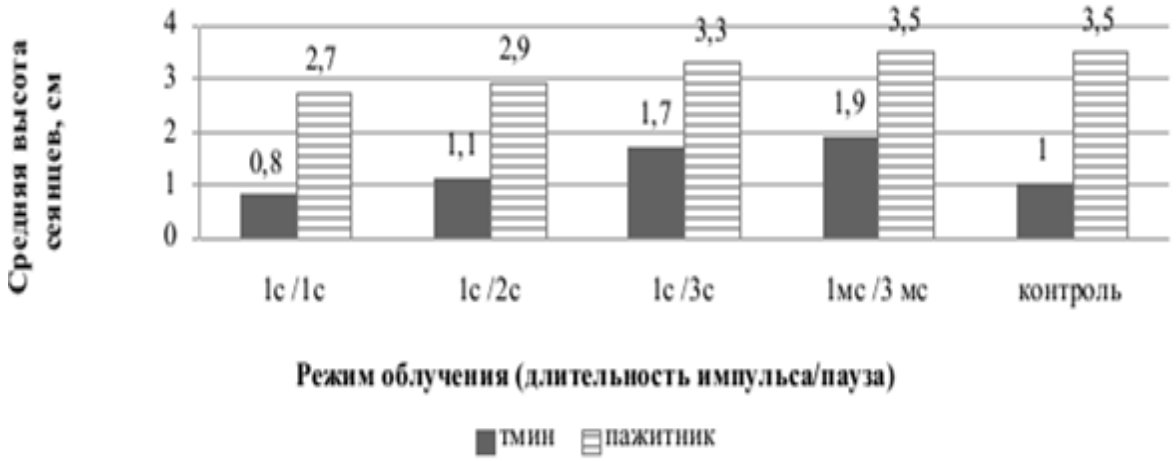


Рисунок 5 – Влияние режимов импульсного облучения на высоту сеянцев в конце периода проращивания

В темноте формировались тонкие этиолированные, вытянутые растения. Для всех культур наименьшая средняя высота сеянцев зафиксирована при облучении в режиме 1/1 с.

ВЫВОДЫ

1. Импульсное облучение семян тмина во всех изученных вариантах понижало энергию прорастания и всхожесть по сравнению с контролем. Особенно неблагоприятное воздействие оказывает режим облучения режим 1/1 с, а также 1/2 с, режимы 1/3мс и 1/3с более благоприятны для растений.

2. Импульсное облучение семян пажитника практически не влияет на прорастание семян данной культуры.

3. Семена пажитника прорастали через 3–4 суток, и в дальнейшем количество проросших семян практически не увеличивалось. Количество проросших семян тмина увеличивалось в течение 11 суток с момента посева семян.

4. Активный рост сеянцев при всех исследованных режимах импульсного облучения практически прекращается на этапе образования 1-го настоящего листа, вероятно, вследствие исчерпания запасов питательных веществ семени и недостаточно активному переходу к автотрофному питанию (фотосинтез).

5. Надземная биомасса сеянцев в конце периода выращивания увеличивается при импульсном облучении по сравнению с контролем (темнота, отсутствие фотосинтеза).

6. Различия вариантов по высоте сеянцев не были столь значительны, как различия по биомассе. В темноте формировались тонкие этиолированные, вытянутые растения. Для всех культур наименьшая средняя высота сеянцев зафиксирована при облучении в режиме 1/1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Попцов А.В., Некрасов В.И., Иванова И.А. Очерки по семеноведению. – М.: Наука, 1981. -112 с.

2. Значение света для прорастания семян [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://agro-portal24.ru/semenovedenie / 4947-znachenie-sveta-dlya-prorastaniya-semyan-chast-1.html (дата обращения 02.08.2018).

3. Физиология и биохимия покоя и прорастания семян. – М.: Наука, 1982. – 495 с.

4. Гэлстон А., Дэвис П., Сэттер Р. Жизнь зеленого растения. – М.: Мир, 1983. – 550 с.

5. Леманн Е., Айхеле Ф. Физиология прорастания семян злаков. – М., Л., 1936. – 483 с.

УДК 634.8

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕАЛИЗАЦИИ МЕТОДА IN VITRO ПРИ РАЗМНОЖЕНИИ ВИНОГРАДА

С.А. Корнацкий

Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

Виноград, наряду с картофелем и земляникой, считается одной из модельных культур, на которых еще в семидесятые годы 20 века началась отработка метода in vitro в практике отечественного растениеводства. Как известно, основой метода клонального микроразмножения является возможность гормональной стимуляции непрерывного в течение календарного года формирования и развития латеральных меристем у начального экспланта в асептических условиях на искусственных питательных средах [2, 4, 8,]. Практическая реализация метода позволяет максимальнополно раскрыть потенциал растительного организма к размножению, тиражировать растения требуемых генотипов, получая при этом большое количество однородного посадочного материала и сокращая тем самым сроки распространения новых сортов и клонов по сравнению с традиционными методами в несколько раз [5–7].

Чаще всего в настоящее время, как и ранее, для культивирования винограда in vitro используют питательную среду Мурасиге и Скуга (МС) или ее различные модификации [9, 10]. Однако, как показало изучение состояния вопроса, нередко появляются взаимно противоположные мнения относительно типа и концентраций фитогормонов, а также ряда элементов минерального питания и их количеств. Это, безусловно, определенно связано с очень разнообразной генетикой винограда и большим количеством сортов, реализация морфо-биологического потенциала которых в стерильных условиях сильно разнится как среди сортов, так и в сравнении развития этих же сортов in vitro и в обычных условиях [1, 3].

Цель работы – поиск наиболее рациональных подходов к микроразмножению винограда на основе модернизации питательной среды и техники культивирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в биотехнологической лаборатории агробиотехнологического департамента Аграрно-технологического института Российского университета дружбы народов в 2018–2019 гг. В качестве объекта исследований был взят сорт винограда Кодрянка. Для введения в культуру использовали начальные экспланты размером 2–3 мм, вычлененные из проросших почек на черенках после периода покоя в феврале месяце. Перед посадкой исходный материал поверхностно стерилизовали 1-%-ным раствором азотнокислого серебра в течение 8 минут. На этапе введения изучали следующие варианты питательных сред: 1) Мурасиге и Скуга (базовая – контроль), 2) Мурасиге и Скуга (модифицированная 2-х кратным увеличением количества KH_2 PO_4) с низкими концентрациями цитокининов: 6-бензиламинопурина (6-БАП) – 0,05 мг/л и 2- изопентиладенина (2-ИПА) – 0,1 мг/л. На этапе размножения к изучению была добавлена питательная среда WPM (базовая) и 2-х кратно увеличены концентрации цитокининов: 6-БАП) – 0,1 мг/л и 2-ИПА – 0,2 мг/л. Повторность в каждом варианте обоих опытов была 20-ти кратная. pH питательной среды перед автоклавированием устанавливали в значении 5,0. Культивирование мериклонов проводили в светокомнате при температуре воздуха +22… + 24º С, освещенности 5000–6000 люкс и продолжительности фотопериода 16 часов. На 30-й день после посадки учитывали приживаемость эксплантов и визуальную оценку наличия патогенной микрофлоры, через 60 суток культивирования мериклонов регистрировали агробиологические параметры (длину стебля, количество листьев, число корней и их длину).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСЕЖДЕНИЕ

Опыт по введению эксплантов сорта Кодрянка в культуру был поставлен после ряда неудачных попыток выполнения этой операции при недостаточном количестве исходного материала. В целом, использование стандартной в таком случае методики позволяло получать достаточно высокий выход развивающихся стерильных эксплантов на начальном этапе. Однако, вскоре после пробуждения почек и отрастания коротких побегов они приобретали антоциановый оттенок, их рост затормаживался, далее

окраска растений менялась на коричневую и они в своем большинстве погибали к исходу второго месяца после введения в культуру. Пересадки выживших на питательную среду того же состава также были безуспешны. В этой ситуации возникло предположение о дисбалансе основных элементов питания в составе питательной среды, в частности нехватке фосфора. Питательная среда Мурасиге-Скуга была модифицирована удвоением количества KH_2 PO_4 (340,0 мг/л), что имело положительный эффект на фоне оптимальных для этого этапа концентраций цитокининов (табл. 1). В ходе опыта удалось получить достаточно убедительный результат по выходу жизнеспособных культур. Еще более важным отличием эксплантов от контроля в этом случае была их естественная зеленая окраска, что свидетельствовало о нормализации ростовых процессов. К окончанию учетного периода экспланты в экспериментальных вариантах представляли собой побеги длиной 1–3 см с листьями, которые были использованы следующем опыте с одноглазковыми черенками.

Таблица 1. Влияние минерального и гормонального состава питательной среды на жизнеспособность начальных эксплантов винограда сорта Кодрянка на этапе введения в культуру.

Вариант		Показатели		
Питательная среда	Регулятор (концентрация)	Инфицировано эксплантов, %	Погибло эксплантов, %	Выжило эксплантов, %
MS (контр.)	6-БАП (0,05 мг/л)	10	70	20
	2-ИПА (0,1 мг/л)	15	55	30
MS (модиф.)	6-БАП (0,05 мг/л)	15	20	65
	2-ИПА (0,1 мг/л)	5	25	70

Исходя из литературных данных, для винограда возможны два варианта размножения in vitro: пролиферация и черенкование. Предварительное изучение вариантов с пролиферацией при относительно высоких концентрациях цитокининов – 6-БАП (1,0 мг/л) и 2-ИПА (2,0 мг/л) выявило недостаточную технологичность данного приема для данного сорта. Пазушное побегообразование было малопродуктивным, отрастающие побеги тонкими с короткими междоузлиями и мелкими листьями. Этим затруднялись работы по их разделению без микроскопа и, более того, часть таких побегов погибала после пересадки на новую среду, что обусловило предпочтение приему черенкования.

Таблица 2. Результаты роста и развития одноглазковых микрочеренков винограда сорта Кодрянка в течение 2-х месяцев на различных питательных средах.

Вариант		Показатели				
Питательная среда	Регулятор (концентрация)	Длина стебля, см.	Количество листьев, шт.	Количество корней, шт.	Длина корней, см.	Выход микрорастений, %
MS (контр.)	6-БАП (0,1 мг/л)	1,9	1,6	0,9	2,1	15
	2-ИПА (0, 2 мг/л)	2,6	2,3	1,1	2,3	20
MS (модиф.)	6-БАП (0,1 мг/л)	6,4	6,1	2,4	5,8	85
	2-ИПА (0, 2 мг/л)	7,5	6,6	1,6	6,4	95
WPM	6-БАП (0,1 мг/л)	7,9	5,7	2,7	6,5	90
	2-ИПА (0, 2 мг/л)	8,6	4,6	2,0	6,5	95
$НСР_{05}$		1,8	1,4	0,6	1,7	

У большей части черенков после высадки в течение 10–14 дней пробуждались почки и начинался рост побегов. Некоторые черенки за период наблюдений не проявили признаков роста, что и обусловило определенный выход микрорастений (табл. 2). По эффективности модифицированная нами среда МС и среда WPM оказались близкими. На среде МС (модиф.) растения формировали несколько большее количество листьев, однако на среде WPM отмечена большая средняя длина стебля за счет размера междоузлий. В обоих вариантах, независимо от конкретного цитокинина и его концентрации растения выглядели полноценно, при этом они сформировали хорошую корневую систему (рис. 1). Это позволило успешно провести адаптацию микрорастений к нестерильным условиям.

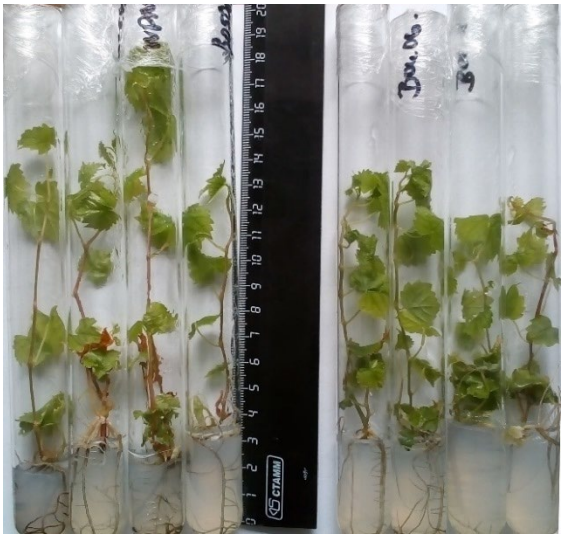


Рис. 1. Внешний вид микрорастений винограда сорта Кодрянка перед высадкой на адаптацию (слева – среда WPM / 2-ИПА (0,2 мг/л); справа – среда MS (модиф.) / 2-ИПА (0,2 мг/л).

Основными результатами проведенных исследований явилось то, что были успешно подобраны питательные среды для введения в культуру и размножения сорта винограда Кодрянка. По-видимому, модифицированная среда МС и среда WPM оказались более сбалансированными по элементам питания для культуры винограда в сравнении с контролем – базовой средой МС. Уже на стадии размножения были получены нормальные пробирочные растения с хорошо развитой корневой системой, что исключило необходимость в традиционном этапе укоренения микропобегов. Эти растения могут быть подвергнуты дальнейшему черенкованию для размножения или после адаптации к нестерильным условиям перенесены в почву для доращивания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арестова Н.О., Рябчун И.О. Особенности продуктивной регенерации подвойных сортов винограда при клональном микроразмножении // Магарач. Виноградарство и виноделие, 2018. – № 3(105). – С. 7 – 9

2. Батукаев А.А., Зармаев А.А., Батукаев М.С. Использование регуляторов роста в системе производства оздоровленного посадочного материала винограда // Труды БГУ, 2013. – 8(2). – С. 43–47

3. Бугаєнко Л.О., Іванова-Ханіна Л.В. Морфогенез винограду в культурі in vitro // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”, 2011. – Т. 24 (63). – № 2. – С. 73–82

4. Бургунин А.Б., Бутенко Р.Г., Катаева Н.В., Голодрига П.Я. Быстрое клональное размножение виноградного растения // Сельскохозяйственная биология, 1983. – № 7. – С. 48–50

5. Дорошенко Н.П., Арестова Н.О., Соболев А.А. Особенности культивирования in vitro некоторых технических сортов винограда // Виноделие и виноградарство, 2004. – № 4. – С. 34–36

6. Карагезов Т.Г., Махмудова И.М., Луканина Н.Н. Генотипические особенности морфогенеза винограда при микроклональном размножении в условиях in vitro // Известия Академии наук Азербайджанской ССР (Серия биологические науки), 1988. – № 5. – С. 14–19.

7. Медведева Н.И., Поливара Н.В. Особенности микроклонального размножения интродуцентов и клонов винограда // Научный журнал КубГАУ, 2008. – № 40(6). – С. 1 – 18

8. Скороход В.О. Промислова біотехнологія мікроклонального розмноження винограду в культурі «in vitro» // Скороход В.О. – Херсон: Айлант, 2000. – 327 с.

9. Murashige T. Plant propagation through tissue cultures // Ann. Rev. Plant Physiol., 1974. – V. 25. – P. 135–166.

10. Prakash S., Hoque M.I., Brinks T. Culture media and containers // Proc. Tech. Meet.

11. IAEA «Low cost options for tissue culture technology in developing countries», Vienna, 2002. – P. 29–40

УДК 636.085: 577.18

ПОЛУЧЕНИЯ ВЫСОКОКАЧЕСТВЕННЫХ КОРМОВЫХ ДОБАВОК СО СВОЙСТВАМИ ФИТОБИОТИКА

А.А. Дерканосова, А.А. Коротаева, А.А. Ориничева

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Применение в технологии кормления биологически активных веществ, способствующих улучшению конверсии корма, естественных стимуляторов роста сельскохозяйственных животных и птицы, отказ от кормовых антибиотиков с целью получения экологически безопасной продукции – является основой повышения продуктивности. Нерациональное использование в птицеводстве антибиотиков в качестве стимуляторов роста является не безопасным как для сельскохозяйственных животных, так и для человека, вызывая антибиотикорезистентность патогенных бактерий [1].

Эфеективная альтернатива кормовым антибиотикам – фитобиотики, оказывающее значительное и усточивое положительное воздействие на производительность и здоровье. В связи с переходом к ведению органического (экологического, биодинамического) сельского хозяйства в рамках федерального закона «Об органической продукции и о внесении изменений в отдельные законодательные акты РФ», вступающего в силу с 1 января 2020 года, возникает необходимость в использовании отечественных кормовых препаратов, которые сбалансированы по аминокислотному составу, макро- и микроэлементам, обладающие свойствами фитобиотиков. Ассортимент подобных отечественных препаратов узкий и не развитый. Поэтому создание и совершенствование технологии комплексной переработки вегетативной массы растений является актуальной задачей [2].

Разработана энергоэффективная технология комплексной переработки листостебельной массы красного клевера с получением высококачественного готового продукта протеинового зеленого концентрата (ПЗК) [3].

Произведен сравнительный анализ суммарной антиоксидантной активности (АОА) ПЗК и фитобиотиков на основе растительного сырья, показавший, что протеиновый зеленый концентрат из красного клевера не уступает по показателям АОА продуктам, применяемым в качестве фитобиотиков [4].

ЛИТЕРАТУРА

1. Gorbach S.L. Antimicrobial Use in Animal Feed – Time to Stop // New England Journal of Medicine. 2001. V. 345. № 16. P. 1202–1203. doi : 10.1056/nejm200110183451610

2. «Зеленые» инновации в производстве комбикормов / А.А. Шевцов, А.А. Дерканосова, А.А. Коротаева / Материалы международной заочной научно-практической конференции «Актуальные направления научных исследований XXI века: теория и практика» / ФГБОУ ВО «ВГЛТУ», 2015 – № 4 – Ч. 3 – с. 241–243. DOI: 10.12737/16108

3. Пат. 2528027 Российская Федерация, МПК A23K 1/14. Способ комплексной переработки протеинсодержащих зеленых растений / Шевцов А.А., Дранников А.В., Дерканосова А.А., Ключников А.И., Коротаева А.А.; заявитель и патентообладатель Воронеж. гос. ун-т инж. технол. – № 2013117658/13; заявл. 16.04.13; опубл. 10.09.14, Бюл. № 25.

4. Научное обоснование технологии комплексной переработки красного клевера в кормопроизводстве: монография / А.А. Шевцов, А.В. Дранников, А.А. Дерканосова, А.А. Коротаева. – Воронеж: ВГУИТ, 2018. – 144 с.

УДК 577.1, 639.3

ФУКОЗОСОДЕРЖАЩИЕ САХАРА КАК ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ КОМПОНЕНТ КОМБИКОРМА ДЛЯ ОСЕТРОВЫХ РЫБ

Е.П. Анохина, М.М. Исува, О.С. Корнеева

Воронежский государственный университет инженерных технологий, г. Воронеж, Россия

Во всем мире аквакультура остается одной из наиболее быстрорастущих отраслейагропромышленного комплекса. Особенно актуальным направлением в аквакультуре является разведение ценных видов рыб, таких как осетровые, численность которых в естественных водоемах постоянно снижается. Важными задачами при искусственном разведении осетровых являются как восстановление популяций осетровых рыб, так и развитие товарного осетроводства. Комбикорма, применяемые в аквакультуре, должны быть сбалансированы по составу, содержать

биологически активные компоненты и обеспечивать поддержание нормального физиологического состояния рыб. Повышенный интерес к фукозосодержащим сахарам обусловлен важной ролью фукозыв основных физиологических процессах живых организмов. Фукоза обладает иммуностимулирующими свойствами, участвует во многих межмолекулярных и межклеточных взаимодействиях, а также в процессах оплодотворения у позвоночных [1,2]. Фукоиданы бурых водорослей и фукоолигосахариды, структурным элементом которых является фукоза, проявляют разнообразные виды биологической активности, в том числе антиоксидантную, противовоспалительную, противомикробную. Фукоза и ее полимеры обладают пребиотическим действием.

Исследована эффективность применения фукозосодержащихгидролизатов и фукоиданав количестве 0,1 % в составе стартового комбикорма для личинок русского осетра. Фукоидан из бурых водорослей и фукозосодержащие гидролизаты получали ранее разработанным способом [3]. По окончании 30 суток в опытных группах с применением фукозосодержащихгидролизатов и фукоидана всоставе комбикормаотмечено превышение абсолютного прироста личинок по сравнению с контрольной группой на 23 и 21 %, а также повышение выживаемости личинок русского осетра на 25 и 28 % соответственно. Данные о химическомсоставе тканей личинок, получавших комбикорма с фукозосодержащими компонентами, показали увеличение уровняпротеина и активности нейтральной протеазы в тканях личинок, что свидетельствует о хорошем физиологическомсостоянии личинок и лучшем использовании питательных веществ комбикорма на прирост [4].

В дальнейшем исследовано влияниефукоидана и фукозосодержащихгидролизатовразной молекулярной массы в составе продукционногокомбикорма на рыбоводно-биологические показатели и физиолого-биохимические показатели крови двухлеток русского осетра. Норма ввода фукозосодержащих препаратов составила 0,1 % от массы корма, продолжительность эксперимента 30 суток. Увеличение среднесуточного прироста молоди в опытных группах с использованием фукоидана и фукозосодержащихгидролизатовсоставило от 38,5 до 44 %, а снижение кормового коэффициента – от 7 до 21 % по сравнению с контролем. Анализфизиолого-биохимических показателей крови рыб опытных групп показал, что концентрация гемоглобина в среднемвыросла на 22 %, а увеличение количества общего белка составило от 25 до 42,5 %, что свидетельствует о высокомуровне жизнестойкости и адаптационных возможностей двухлеток русского осетра.

Полученные результаты свидетельствуют, что фукозосодержащие препараты являются эффективными компонентами в стартовые и продукционные комбикорма, способствуют повышению эффективности выращивания и физиологического состояния осетровыхрыб и могут расширить спектр биологически активных веществ, применяемых на предприятиях и фермерскихххозяйствах нашей страны.

Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 17–76–10059).

ЛИТЕРАТУРА

1. Анохина Е.П., Исува М.М., Старцева С.В., Мотина Е.А., Михайлова Н.А., Корнеева О.С. Исследование пребиотических, иммуностимулирующих свойств фукозы и ее влияния на репродуктивную функцию. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2018. № 6. С 110–114.

2. Intra J, Concetta V, Daniela de C, Perotti ME, Pasini ME. Drosophila sperm surface alpha-L-fucosidaseinteracts with the egg coats through its core fucose residues. Insect BiochemMol Biol. 2015 Aug; 63:133–43. doi: 10.1016/j.ibmb.2015.06.011.

3. Пат. № 2571274, RU МПК A61K 36/02, A61K 31/715, C12R 1/89. Способ получения фукозы и фукозосодержащихгидролизатов из биомассы бурых водорослей / Корнеева О.С., Кирьянова С.В., Толкачева А.А., Анохина Е.П., Новикова Ю.С. № 2013143212/15, Заявл. 24.09.2013; Опубл. 20.12.2015, Бюл. № 35.

4. Anokhina E., Isuva M., Startseva S., Korneeva O. The influence of fucose-containing components in the compound feed on the fish-biological and physiological parameters of sturgeon larvae. International Multidisciplinary Scientific GeoConference, SGEM. 2018. Vol. 18. Issue 6.4. pp. 291–297. DOI: 10.5593/sgem2018V/6.4/S08.037.

УДК 631.53.011 + 57.043 + 577.19

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ СЕЯНЦЕВ НУГА АБИССИНСКОГО ПРИ РАЗНЫХ РЕЖИМАХ ИМПУЛЬСНОГО ОСВЕЩЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИИ МИНЕРАЛЬНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ РАСТВОРОВ

В.Н. Зеленков[1,2,3], А.А. Лапин[4], В.В. Карпачев[5], В.В. Латушкин[1], М.И. Иванова[3], С.В. Гаврилов[1], П.А. Верник[1], В.П. Барышок[6]

[1] Институт стратегий развития, Москва, Россия
[2] Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, Москва, Россия
[3] Всероссийский научно-исследовательский институт овощеводства – филиал Федеральный научный центр овощеводства, Московская область, Россия
[4] Казанский энергетический университет, Казань, Россия
[5] Всероссийский научно-исследовательский институт рапса, Липецк, Россия
[6] Иркутский национальный исследовательский технический университет, Иркутск, Россия

ВВЕДЕНИЕ

При искусственном выращивании растений в замкнутых агроэкосистемах с использованием светокультуры регулирование параметров освещения приобретает особую значимость [1]. В связи с развитием научных подходов в области фотонного управления продукционным процессом растений придается большое значение изучению импульсных режимов облучения [2]. Однако влияние импульсного света мало изучено, он может оказывать как стимулирующее, так и угнетающее действие в зависимости от режимов облучения [3, 4]. Одним из важных моментов является также оценка антиоксидантной активности как возможного маркера изменения метаболических процессов в растениях при изменении условий среды обитания, в том числе режима освещения и условий минерального питания растений [5, 6]. Известно, что при инициации стрессорами защитных реакций происходит изменение состава и содержания метаболитов антиоксидантного метаболома. Устойчивость растений к биотическим и абиотическим стрессам может быть связана с накоплением биологически активных веществ с антиоксидантной активностью [6, 7].

В предыдущих работах [8–10] нами впервые исследовано влияние режимов импульсного облучения на прорастание семян нуга (всхожесть, биометрические показатели сеянцев и суммарная антиоксидантная активность), а также комбинированного воздействия импульсного облучения и изменения режимов минерального питания. Настоящая работа продолжает исследования в данном направлении и связана с необходимостью изучить особенности изменения антиоксидантной активности сеянцев в зависимости от режимов импульсного освещения в сочетании с разными схемами минерального питания и некорневой обработкой кремнийорганическим соединением.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в 2019 г. на базе опытного образца синерготрона 1.01. конструкции Автономной некоммерческой организации «Институт стратегий развития» – закрытой климатической камере с цифровым программным управлением основными параметрами внешней среды. В качестве объекта исследований взяты семена и проростки – нуга абиссинского (*Guizotia abyssinica (L.f.) Cass*) сорта «Липчанин (селекции ВНИИ рапса»). Проращивание семян проводили в чашках Петри согласно ГОСТ 12038–84 с изменениями – использовалась подложка из минеральной ваты фирмы «Агрос». Количество семян – по 25 шт. в чашке Петри, повторность трехкратная. Температура 25–26° С. Уровень интенсивности света, создаваемый светодиодными светильниками на уровне субстрата в период действия импульса составил 130–140 мкМоль/ $м^2$ * с, 24 ч в сутки. Использовались следующие режимы импульсного светодиодного облучения (фактор А): 1с / 3 с (длительность импульса 1 с, пауза – период следования импульса 3 с); 1 с / 4 с; 1с / 6 с, 1мс / 3 мс. Контроль – проращивание в темноте. На 7-й день проращивания этиолированные сеянцы помещали на свет 1с / 3 с. Увлажнение подложки (фактор Б) проводили по трем вариантам – дистиллированной водой, минеральным питательным раствором (по рекомендации компании «Рийк Цваан» для салатных культур в концентрации ЕС 0.25 мСм/см) однократно по 20 мл на чашку Петри на 7-е сутки после посева семян, затем полив дистиллированной водой. В третьем варианте дополнительно проводили некорневую обработку сеянцев кремнийорганическим соединением 1 – этоксисилатран в концентрации 5×10^{-3} на 7-е сутки от посева семян (по 3 мл на чашку Петри). В четвертом варианте в состав питательного раствора

дополнительно вводили натрий (в соотношении к калию 1:20, однократно по 20 мл на чашку Петри на 7-е сутки после посева). Суммарную антиоксидантную активность (САОА) измеряли кулонометрическим методом (в пересчете г рутина на 100 г. образца на сухой (с.о.) образец) [11]. Высушивание образцов проводили при комнатной температуре

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Показатели суммарной антиоксидантной активности (САОА) в эксперименте изменялись под влиянием как фактора А – режим импульсного освещения, так и фактора В – режим питания сеянцев (рисунок).

При импульсном освещении (фактор А) САОА в большинстве вариантов увеличивалось по сравнению с контролем. Максимальное увеличение САОА сеянцев нуга (более чем в два раза по сравнению с контролем) наблюдали при освещении в режиме 1 / 4 с. При режимах 1 / 6 с 1 / 3 мс антиоксидантная активность ниже, чем в контроле.

Изучение влияния фактора В (режима питания сеянцев) показало, что при замене дистиллированной воды для полива сеянцев минеральным питательным раствором САОА сеянцев возрастала. При некорневой обработке 1 – этоксисилатраном, а также при введении в состав питательного раствора натрия, антиоксидантная активность в большинстве вариантов уменьшалась и оказывалась сопоставимой с контролем. Однако в некоторых случаях, вероятно, вследствие взаимодействия факторов А и В, данная закономерность не всегда четко выражена.

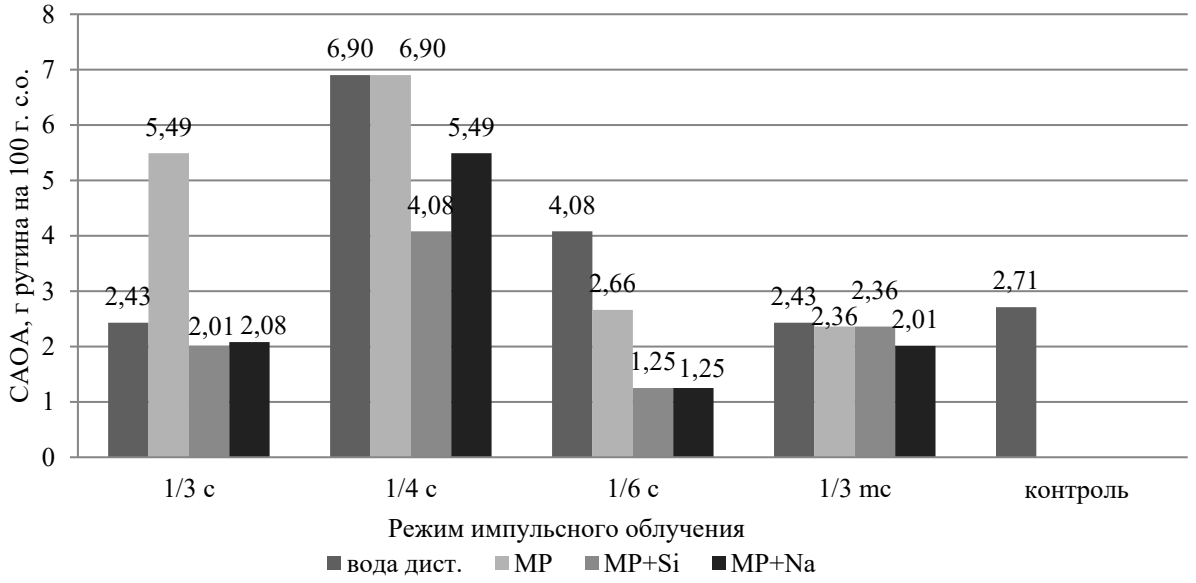


Рисунок – Влияние импульсного облучения и схемы питания на суммарную антиоксидантную активность сеянцев нуга (г. рутина на 100 г. с.о.)

Примечание: MP – минеральный питательный раствор, MP + Si – минеральный раствор и некорневая обработка кремнийорганическим соединением 1 – этоксилатран, MP + Na – минеральный раствор с добавлением натрия

Представляет интерес сопоставить данные по антиоксидантной активности и биомассе растений. В опубликованной нами ранее работе показано [9,10], что из режимов импульсного облучения наиболее благоприятен для роста растений нуга 1с / 3 с (увеличение биомассы на 22,6 %), наименьшая биомасса (ниже контроля) формировалась при режиме 1с / 4 с. Именно при последнем режиме отмечен максимальный уровень САОА сеянцев нуга в текущем эксперименте. Однако режим 1с / 6с также оказался неблагоприятным для формирования биомассы, однако роста САОА по сравнению с контролем в данном варианте не зафиксировано. По видимому, это свидетельствует о сложности процессов метаболизма и формирования стрессоустойчивости растений, что отражается на уровне САОА.

По фактору В установлено [9,10], что использование минерального питательного раствора (вместо дистиллированной воды в контроле) при поливе увеличивало биомассу сеянцев нуга абиссинского в среднем на 8,5 %, а дополнительная некорневая обработка 1 – этоксисилатраном – на 12 %. Положительный эффект сохранялся при всех изученных режимах импульсного облучения. В текущем эксперименте, как указано выше, САОА сеянцев в большинстве вариантов возрастало при замене дистиллированной воды минеральным раствором, но при дополнительной обработке 1 – этоксисилатраном САОА снижалось и оказывалось сопоставимым с контролем. Для выяснения причин данного явления необходимо проведение дальнейших исследований.

ВЫВОДЫ

Антиоксидантная активность сеянцев нуга изменялась как при воздействии фактора А (режим импульсного освещения), так и фактора В (схема питания сеянцев), что говорит о чувствительности данного параметра к изменению условий выращивания.

Максимальный рост суммарной антиоксидантной активности по сравнению с контролем – в варианте 1 / 4 с. При режимах 1 / 6 с 1 / 3 мс антиоксидантная активность ниже, чем в контроле.

При выращивании сеянцев нуга на минеральном питательном растворе в большинстве вариантов возрастала антиоксидантная активность по сравнению с поливом дистиллированной водой (контроль).

При некорневой обработке 1 – этоксисилатраном, а также при введении в состав питательного раствора натрия, антиоксидантная активность в большинстве вариантов уменьшалась по сравнению с минеральным питательным раствором и оказывалась сопоставимой с контролем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тихомиров А.А., Шарупич В.П., Лисовский Г.М. Светокультура растений. Биофизические и биотехнологические основы. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2000. – 213 с.

2. Olvera-Gonzalez E., Alaniz-Lumbreras D., Ivanov-Tsonchev R. et al. Chlorophyll fluorescence emission of tomato plants as a response to pulsed light based LEDs. // Plant Growth Regulation. – 2013. – № 69. – P. 117–123.

3. Мороз Д.С. Влияние светодиодного освещения на продукционный процесс и параметры водообмена растений томата Lycopersicon esculentum mill.: автореф. дис… канд. биол. наук. – Минск, 2015. – 23 с.

4. Коновалова И.О. Определение оптимальных параметров светодиодного освещения листовых овощных культур применительно к витаминной космической оранжерее: автореф. дис… канд. биол. наук. – Москва, 2016. – 24 с.

5. Лапин А.А., Зеленков В.Н. К вопросу определения антиоксидантного статуса овощей овощей // Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты: сборник научных трудов. Вып.14. – Москва: РАЕН, 2001. – С. 43–52.

6. Гинс В.К., Гинс М.С. Физиолого-биохимические основы интродукции и селекции овощных культур. – М.: РУДН, 2011. – 190 с.

7. Быков В.А., Масляков В.Ю., Сидельников Н.И., и др. Изучение ресурсов дикорастущих лекарственных растений в ВИЛАРе: основные направления и результаты // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2012. – Т.10. – № 1. – С. 32–39.

8. Зеленков В.Н., Карпачев В.В., Белоножкина Т.Г., и др. Жирнокислотный состав семян нуга абиссинского, их суммарная антиоксидантная активность и перспективы практического использования российского сорта «Липчанин» // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования. – 2017. – № 12. – С. 12–14.

9. Зеленков В.Н., Латушкин В.В., Лапин А.А., и др. Влияние облучения в импульсном режиме на всхожесть и содержание антиоксидантов при проращивании семян нуга абиссинского в закрытой системе синерготрона 1.1. // Роль физиологии и биохимии в интродукции и селекции сельскохозяйственных растений. – М., РУДН, 2019. – Т.1. – С. 314 – 317. Doi 10.22363/09358–2019

10. Зеленков В.Н., Латушкин В.В., Карпачев В.В., и др. Влияние кремнийорганического соединения 1 – этоксисилатран и минерального питательного раствора на рост сеянцев нуга абиссинского при разных режимах импульсного освещения // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования. – М.: РУДН, 2019. – С. 65–67. Doi 10.22363/09509–2019–65–67

УДК 664.642.1

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРОРОЩЕННОЙ СПЕЛЬТЫ НА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДРОЖЖЕЙ SACCHAROMYCES CEREVISIAE

З.Ш. Мингалеева, А.В. Маслов, О.В. Старовойтова, А.И. Биктагирова, О.А. Решетник

Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, Россия

Хлебопекарные дрожжи входят в состав основного сырья при производстве хлебобулочных изделий. От биотехнологических свойств дрожжей: подъемной силы, зимазной и мальтазной активностей зависит качество готовой продукции. С целью повышения биотехнологических свойств дрожжей на хлебопекарных предприятиях перед замесом тестовых полуфабрикатов проводят их предварительную активацию, которая заключается в приготовлении суспензии из дрожжей, воды и питательных компонентов с дальнейшей выдержкой определенное время, после чего полученную смесь дозируют на замес опары или теста [1–3].

В процессе предварительной активации происходит перестройка ферментативного комплекса дрожжей с дыхания на брожение. Положительными результатами предварительной активации являются снижение дозировки дрожжей при замесе, сокращение продолжительности брожения тестовых полуфабрикатов и улучшение качества готовой продукции [4, 5].

В настоящее время существуют различные способы проведения предварительной активации дрожжей: добавление в питательную среду активаторов, ускоряющих обмен веществ (патенты РФ № 2656397, № 2388227), обработка суспензии дрожжей электромагнитным полем, ультразвуковым воздействием (патенты РФ № 2200194, № 2184145). Известны способы проведения предварительной активации хлебопекарных дрожжей, которые заключаются в использовании в качестве активаторов порошков из злаковых и крупяных культур, содержащих необходимые дрожжевым клеткам питательные вещества (патенты РФ № 2358007, № 2257406).

Цель настоящей работы состояла в исследовании влияния пророщенной спельты (*Triticum spelta L.*) на биотехнологические свойства хлебопекарных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Пророщенная спельта содержит в своем составе моно- и дисахариды, витамины, минеральные вещества, активные амилолитические и протеолитические ферменты.

На начальном этапе исследовали влияние пророщенной спельты на подъемную силу предварительно активированных дрожжей. В исследовании использовали прессованные дрожжи. Дрожжи активировали в питательной среде, содержащей воду и пророщенную спельту. Соотношение прессованных дрожжей и пророщенной спельты составляло 1:2,5; 1:3,5 и 1:5. Выдержку дрожжей в питательной среде проводили в течение 10, 20, 30 и 40 мин. Подъемную силу дрожжей оценивали по времени всплыванию шарика теста. За контроль принимали вариант измерения подъемной силы дрожжей без введения пророщенной спельты и без выдерживания дрожжей в питательной среде, за опыт – с выдерживание дрожжей в питательной среде, содержащей пророщенную спельту. Данные по влиянию пророщенной спельты на подъемную силу прессованных дрожжей приведены на рисунке 1.

Как видно из данных рисунка 1 время выдержки прессованных дрожжей в питательной среде, при котором наблюдается максимальное улучшение подъемной силы, составляло 30 мин, а соотношение дрожжей и пророщенной спельты – 1:3,5, при этом подъемная сила прессованных дрожжей увеличивалась на 56,8 % по отношению к контролю.

Интенсивность процессов, происходящих при брожении тестовых полуфабрикатов, зависит от мальтазной и зимазной активностей дрожжей. Поэтому дальнейшие исследования были направлены на определение данных показателей, которые измеряли, используя микрогазометр Елецкого. Определение показателей проводили у исходных дрожжей и сразу после проведения предварительной активации в питательной среде с пророщенной спельтой в течение 30 мин. Результаты исследований представлены на рисунке 2.

Результаты исследования показывают, что пророщенная спельта в составе питательной среды для предварительной активации способствует улучшению мальтазной и зимазной активностей дрожжей. При соотношениях дрожжей и пророщенной спельты 1:2,5; 1:3,5 и 1:5 зимазная активность возрастала по сравнению с контролем на 65,3 %, 68,5 % и 71,1 %, а мальтазная активность – на 73,6 %, 75,7 % и 78,2 %, соответственно, что свидетельствует об интенсификации процессов энергетического обмена дрожжевых клеток.

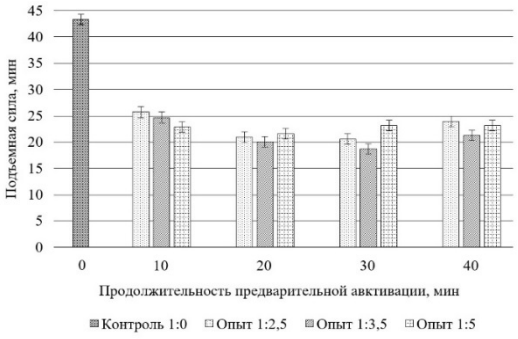


Рисунок 1 – Влияние пророщенной спельты на подъемную силу дрожжей Saccharomyces cerevisiae

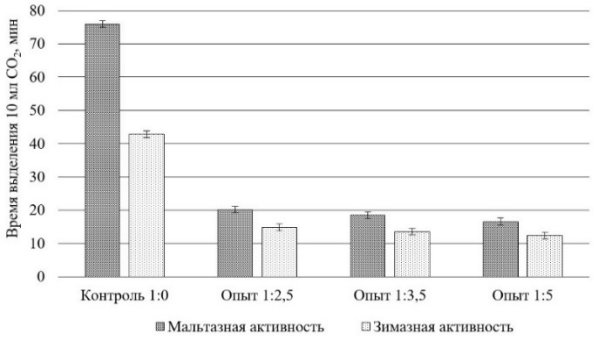


Рисунок 2 – Влияние пророщенной спельты на мальтазную и зимазную активности дрожжей Saccharomyces cerevisiae

Таким образом, результаты исследований показали, что внесение пророщенной спельты в состав питательной среды для предварительной активации дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, значительно повышало их биотехнологические свойства: увеличивалась подъемная сила, мальтазная и зимазная активности, что в итоге способствовало интенсификации процесса тестоведения и получению готовой продукции с улучшенными качественными показателями.

ЛИТЕРАТУРА

1. Левашов, Р.Р. Исследование влияния добавки растительного происхождения на биотехнологические свойства дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / Р.Р. Левашов, З.Ш. Мингалеева // Вестник Казанского технологического университета. – Т. 18, № 18. – 2015. – С. 268–270.

2. Ermakova, A.M. Study of complex additive use possibility to improve yeast and wheat bread quality / A.M. Ermakova, E.E. Zinurova, R.R. Levashov, Z.S. Mingaleeva, O.A. Reshetnik, // Indo American journal of pharmaceutical sciences. – 2018. – Vol. 9, no. 5. – P. 9275–9281.

3. Берри, Д.Р. Биология дрожжей / Д.Р. Берри. – М.: Мир, 1985. – 95 с.

4. Федотова, З.А. Влияние активации прессованных хлебопекарных дрожжей на свойства теста и качество хлеба // З.А. Федотова / Агрономия и защита растений. – 2011. – № 4. – С. 84–88.

5. Пермякова, Л.В. Классификация стимуляторов жизненной активности дрожжей // Л.В. Пермякова / Техника и технология пищевых производств. – 2016. – Т. 42, № 3. – С. 46–55.

УДК 664.959:613.281

ИЗМЕНЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ И ФУНКЦИОНАЛЬНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МЯСА ФОРЕЛИ ОЗЕРНОЙ В ПРОЦЕССЕ ХРАНЕНИЯ

О.П. Дворянинова[1], А.Е. Куцова[1], А.В. Алехина[1], И.А. Саранов[1], А.Е. Матеева[2]

[1]Воронежский государственный университет инженерных технологий, г. Воронеж, Россия
Алматинский технологический университет, г. Нурсултан, Казахстан

ВВЕДЕНИЕ

Изменения свойств продуктов при хранении обусловливаются происходящими в них процессами – физическими, химическими, биохимическими, микробиологическими, гистологическими и др., которые в одних случаях улучшают потребительские свойства продуктов, а в других вызывают их порчу. Поэтому целью холодильной обработки и хранения продуктов является обеспечение благоприятного протекания первых и минимизация вторых.

В основе автолитических превращений мяса рыбы лежат изменения углеводной системы, системы ресинтеза АТФ и состояния миофибриллярных белков, входящих в систему сокращения.

Течение автолитических процессов прямым образом влияет на функционально-технологические свойства (ФТС) мяса рыбы.

Исследования ФТС весьма важный этап в рациональных подходах переработки сырья, так как они определяют качество готовых продуктов и степень его приемлемости при производстве продуктов различных ассортиментных групп [1–3].

Цель работы –исследование особенностей биохимических и функционально-технологических изменений, протекающих в тканях рыбы в процессе хранения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования нами была выбрана форель озерная, выловленная в Павловском рыбхозе Воронежской области в осенний период лова.

Мясо уснувшей рыбы служило контрольной пробой, с которой сравнили все последующие изменения в процессе хранения, определяющие консистенцию, вкус и аромат, свойственные охлажденному, а затем и созревшему мясу [4].

Для определения глюкозы, АТФ применялись оригинальные методы [4], при этом определение гликогена и актомиозинового комплекса проводили методом ВЭЖХ [3], определение ПВК согласно колориметрическому методу по Умбрайту [1, 4–6].

Для определения ФТС брали рыбу с временем хранения от 0 до 24 часов, хранение производили в холодильной камере при температуре 4–6 ºС. Рыбу предварительно разделали: с удалением головы косым срезом, удалили внутренности и разделали на филе. Филе в дальнейшем использовали для определения функционально-технологических свойств.

Интенсивный распад мышечного гликогена, приводит к резкому сдвигу величины pH ткани в кислую сторону, что приводит к некоторым изменениям в химическом составе и физико-коллоидной структуре белков. Распад мышечного гликогена наблюдается уже в первые часы хранения. Минимальное его содержание приходится на 24 часа хранения. Закономерности изменения содержания гликогена имеют общий характер, что подтверждает классические представления [7].

В соответствии с классическим представлением, кислая среда, которая формируется, в том числе, и за счет распада АТФ, дает начало необратимым процессам гликолиза и усиливает мышечное окоченение. Распад гликогена осуществляется двумя путями: гликолиз и гликогенолиз. По первому – из глюкозы образуется пируват → молочная кислота (анаэробный путь), по второму – отщепляется глюкозофосфат, который вовлекается в биохимические превращения с образованием молочной кислоты без участия кислорода. Суммарный эффект приводит к снижению pH. Процесс происходит необязательно до полного расходования гликогена, а в основном до кислой среды, при которой инактивируется ферментативная система, обеспечивающая образование молочной кислоты.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первой стадии автолиза важное значение имеет уровень содержания в мясе энергоёмкой АТФ, вследствие распада которой осуществляется процесс фосфоролиза гликогена (ферментативный процесс расщепления гликозидных связей). Одновременно процесс распада АТФ обеспечивает сокращение миофибриллярных белков. Динамика изменения содержания АТФ показана на рисунке 1.

Распад АТФ до аденозиндифосфорной (АДФ), аденозинмонофосфорной (АМФ) и фосфорной кислот приводит к усилению кислой среды в мясе рыб. Как видно на графике, распад АТФ происходит уже в первые часы хранения. Минимальное её содержание приходится на 24 часа и составляет 3,5 г / 100 г. [7, 9].

Изменения в углеводной и ферментной системах приводит к образованию актомиозинового комплекса. Исследования закономерностей изменения содержания актомиозинового комплекса (рисунок 2) в мышцах в процессе хранения рыбы имеют аналогичный характер. Окоченение мышечной ткани, наблюдающееся уже в первые часы хранения, обусловлено образованием из белков актина и миозина нерастворимого актомиозинового комплекса, предпосылкой образования которого является отсутствие аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ), кислая среда мяса рыбы и накопление молочной кислоты из-за распада гликогена по анаэробному пути. Уменьшение и полное исчезновение АТФ связано с ее распадом до аденозиндифосфорной (АДФ), аденозинмонофосфорной (АМФ) и фосфорной кислот в результате ферментативного действия миозина. Наивысший подъем графика на рисунке развивается в первые 3–5 часов. Кислая среда, которая является закономерным явлением распада АТФ, усиливает мышечное окоченение. В связи с тем, что в мышечную ткань рыбы не поступает кислород, окислительные процессы в них заторможены, в мясе накапливаются избытки молочной и фосфорной кислоты. Активная реакция среды (pH) при этом изменяется от 7,26 до 6,02. При накоплении молочной

кислоты наступает быстрое сокращение (окоченение) мускулатуры, сопровождающееся коагуляцией белка. При этом актомиозин теряет свою растворимость, белки стабилизируются, а кальций выпадает из коллоидов белка и переходит в раствор (мясной сок). Полное окоченение наступает за 8 часов хранения. Затем по мере увеличения концентрации молочной кислоты и коагуляции белков происходит распад актомиозинового комплекса. Свернувшиеся белки теряют свои коллоидные свойства, становятся неспособными связывать (удерживать) воду и в известной степени лишаются своей дисперсной среды (воды).

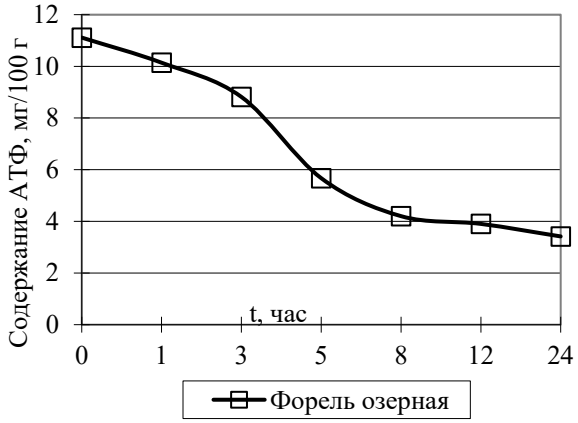


Рисунок 1 – Изменение содержания АТФ в процессе хранения

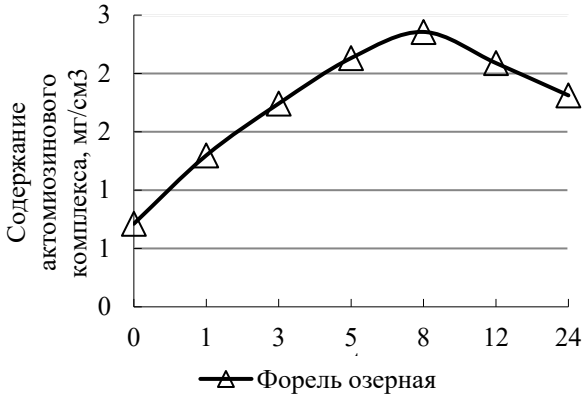


Рисунок 2 – Динамика изменения содержания актомиозинового комплекса в процессе хранения

В результате накопления молочной, фосфорной и других кислот в мясе рыбы увеличивается концентрация водородных ионов, вследствие чего происходит снижение pH. В кислой среде при распаде АТФ происходит частичное накопление неорганического фосфора. Резко кислая среда и наличие неорганического фосфора считается причиной диссоциации актомиозинового комплекса на актин и миозин [6]. Распад этого комплекса начинается после 8 часов хранения, т. е. снимается явление окоченения и жесткости мяса, наступает мышечное разрешение и затем созревание – глубокий автолиз [9].

В процессе хранения мяса рыбы решающую роль при его созревании играет протеолиз, который катализируется катепсинами – группой протеолитических ферментов, гидролизующих пептидные связи белков и полипептидов. Установлено, что катепсины форели озерной имеют кислый характер и проявляют максимальную активность при pH 4,5–5,0.

Графическая зависимость функционально-технологических свойств мышечной ткани от времени хранения при температуре 4–6 ºС представлена на рисунке 3.

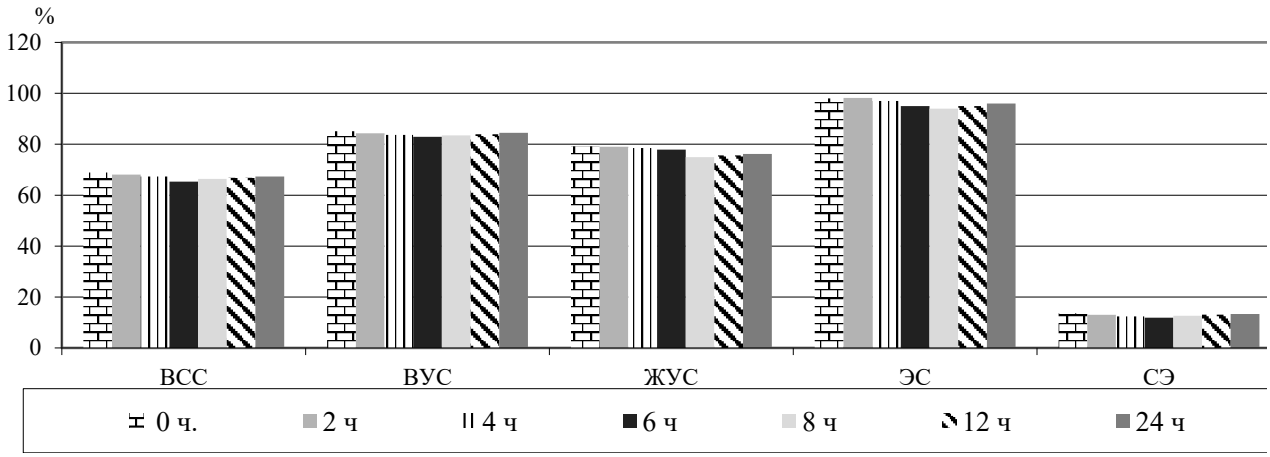


Рисунок 3 – Функционально-технологические свойства мышечной ткани форели озерной в процессе хранения

Приём материалов статей по адресу: actbio@mail.ru

На диаграммах видно, что функционально-технологические свойства в промежутке от 0 до 8 часов хранения уменьшаются, а в промежутке 8–24 часа – увеличиваться, что абсолютно совпадает с теорией автолиза, так как в период от 0 до 8 часов начинается мышечное окоченение, пиком которого является 8 часов хранении. Именно в этот период мышечная ткань обладает минимальными функционально-технологическими свойствами. В целом, полученные результаты свидетельствуют о способности мяса рыб удерживать жир, образовывать эмульсии, а, следовательно, возможность на их основе создания широкого спектра продуктов, в том числе и кулинарных.

Параллельно анализу ФТС определяли усилие среза мышечной ткани рыбы вдоль и поперек волокна в процессе её хранения. Структурно–механические свойства характеризуют поведение мяса рыбы в условиях напряженного состояния, основными показателями которого при приложении силы являются напряжение, величина и скорость деформации.

Изменение усилия среза как вдоль, так и поперек волокна носит аналогичный характер. Практически сразу после вылова начинается рост механической прочности. Мясо рыбы постепенно теряет эластичность и становится жёстким. Максимальная жесткость мяса рыбы приходится на 8 часов хранения. Это связанно с тем, что в этот период времени начинается мышечное окоченение и мясо обладает наименьшими функционально – технологическими свойствами. Затем прочностные свойства мяса рыб уменьшаются.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на основе классических представлений о биохимических изменениях мяса наземных животных и суммируя полученные данные по посмертным изменениям в мышечной ткани рыб, можно сделать вывод, что они имеют аналогичный характер и закономерности по сравнению с мышечной тканью наземных животных, но главным их отличием является более высокая скорость протекания автолитических превращений. Это в свою очередь приводит к более быстрому изменению ФТС мяса рыбы, которые являются определяющими показателями при определении качества рыбного сырья.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антипова Л.В., Глотова И.А., Рогов И.А. Методы исследования мяса и мясных продуктов / – М.: Колос С, 2004. – 571 с.: ил. – (Учебники и учебное пособие для студентов высш. учеб. заведений).

2. Антипова Л.В., Алехина А.В., Дворянинова О.П., Калач Е.В. Сенсорная характеристика – как составляющая качества рыбного сырья / – Тезисы научно-практической конференции «Пищевая и морская биотехнология. Проблемы и перспективы». – Светлогорск, 2008. – С. 15.

3. Антипова Л.В., Алехина А.В. Автолитические превращения в мясе прудовых рыб // 3-я конференция молодых ученых и специалистов институтов отделения «Хранения и переработки сельскохозяйственной продукции Россельхозакадемии «Обеспечение качества и безопасности продукции агропромышленного комплекса в современных социальноэкономических условиях. М., 2009. С. 47–51.

4. Буй С.Д., Мукатова М.Д. Способ выделения ферментного препарата из внутренностей прудовых видов рыб // Современные достижения биотехнологии: сб. материалов междунар. науч.-практ. конф; СевКавГТУ. Ставрополь, 2011. С. 440–443.

5. Mills D.J. Underreported and undervalued: Small-scale fisheries in the developing world scale fisheries management: frameworks and approaches for the developing world. 2011. P. 1–15.

6. Mora C. Management effectiveness of the world's marine fisheries // PLoS Biology. 2009. № 7(6). P. 12–19.

7. Антипова Л.В., Дворянинова О.П., Алехина А.В., Калач Е.В. Определение зависимости концентрации триметиламина от времени хранения рыбы / – Материалы международной научно – практической конференции «Инновационные технологии переработки сельскохозяйственного сырья в обеспечении качества жизни: наука, образование и производство». – Воронеж, 2008. – С. 404–410.

8. Алехина А.В., Дворянинова О.П. Биохимические изменения мяса прудовых рыб в процессе хранения / Вестник Воронеж. гос. техн. акад. – Воронеж, 2009. – № 3. – С. 95–97.

9. Антипова Л.В., Алехина А.В. Автолитические превращения в мясе прудовых рыб / 3 я конференция молодых ученых и специалистов институтов Отделения «Хранения и переработки сельскохозяйственной продукции» Россельхозакадемии «Обеспечение качества и безопасности продукции агропромышленного комплекса в современных социально-экономических условиях» – Москва, 2009. – С. 47–51.

УДК 663.1:664: 66.081.63

ОСНОВЫ СОЗДАНИЯ ОПТИМАЛЬНЫХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ ПИЩЕВЫХ И КОРМОВЫХ БИОДОБАВОК

В.Л. Кудряшов, Н.С. Погоржельская, Ю.А. Борщова, Е.Н. Соколова, Н.А Фурсова, В.А. Алексеев

ВНИИ пищевой биотехнологии – филиал ФИЦ питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва, Россия

В дополнение к традиционным областям применения биотехнологических методов при производстве целого ряда пищевых продуктов (сыра, вина, пива, кисломолочных напитков, творога, этанола и др.) в мире интенсивно развивается современная пищевая биотехнология представляющая собой производства новых пищевых добавок и ингредиентов, содержащих биологически активные (ценные) вещества (БАВ). Они вводятся для обогащения, улучшения органолептики, повышения хранимоспособности, улучшения внешнего вида традиционных продуктов питания, а также при производстве принципиально новых пищевых продуктов, а том числе для спортивного, детского, геродиетического, функционального и лечебно-профилактического питания.

Ингредиенты используются также в качестве вспомогательных добавок для ускорения, удешевления, исключения денатурации БАВ сырья и совершенствования собственно самих технологических процессов производства продуктов питания.

К сожалению, подавляющее большинство пищевых ингредиентов в н. вр. импортируется. Поэтому, создание в РФ производств для их импортозамещения является актуальной научно-технической социально востребованной задачей, что подтверждается «Комплексной программой развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года (утв. Правительством РФ от 24 апреля 2012 г. № 1853п-П8). Стратегической целью **Программы** является выход России на лидирующие позиции в области разработки и широкого освоения биоиндустрии, которая наряду с наноиндустрией и IT-технологиями должна стать основой модернизации и построения постиндустриальной экономики. Долгосрочная цель ее реализации – обеспечение в 2020 году объема биоэкономики России в размере 1 % ВВП, а в 2030 году – не менее 3 % ВВП.

В этой Программе среди 9-ти основных приоритетных направлений **выделена – пищевая биотехнология**, основной современной востребованной продукцией которой являются различные биодобавки и биоингредиенты (ферментные препараты, витамины, растительные экстракты, белки, незаменимые аминокислоты, про-и пребиотики, закваски, натуральные красители и ароматизаторы, вкусовые добавки, пищевые кислоты, бактериоцины и др. БАВ), Они вводятся в продукты питания для обогащения полезными (функциональными, лечебно-профилактическими) веществами и совершенствования (интенсификации) самих технологических процессов их производства.

Линии по производству продуктов пищевой биотехнологии включают следующие стадии:

– приготовление посевного материала (включает подбор высокопродуктивного, селекцию, хранение в музее штамма – продуцента, накопление его последовательным выращиванием, засев в биореактор (ферментер, дрожжегенератор));

– приготовление субстрата – питательной среды (выбор, подготовка и смешивание компонентов среды, стерилизация);

– культивирование (ферментация, биосинтез, накопление биомассы и / или целевых продуктов их жизнедеятельности) в аэробных или анаэробных условиях;

– отделение биомассы штамма-продуцента от культуральной жидкости (к.ж.);

– выделение, очистка, концентрирование, выпаривание и / или сушка целевого продукта (биопрепарата, ингредиента, БАВ);

– контроль ОТК, расфасовка, упаковка, маркировка;

– переработка и утилизация отходов и вторичного сырья.

Упрощенная блок-схема биотехнологической линии представлена на рис. 1.

Так как экономика РФ является открытой, то сами технологии и производимые ингредиенты (добавки, БАВы) должны быть конкурентоспособными на мировом рынке по критерию цена-качество. Для этого должны применяться высокопродуктивные (высокоактивные) штаммы-продуценты, недорогие и доступные субстраты, совершенные биореакторы, оптимальные технологии выделения и концентрирования целевых биопрепаратов и утилизации отходов с соответствующим оборудованием.

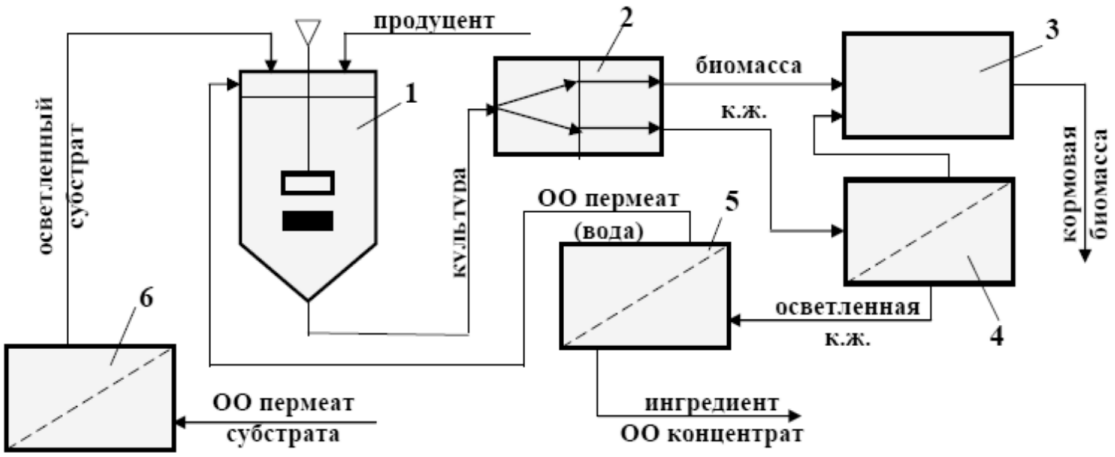


Рисунок 1 – Обобщенно – упрощенная блок-схема биотехнологической линии: 1 – биореактор, 2 – центрифуга (фильтр); 3 – сушилка; 4, 5 и 6 – ультрафильтрационная и две обратноосмотические установки

Основные подходы и методики селекции высокоэффективных (оптимальных) штаммов-продуцентов различных биологически активных соединений с помощью индуцированного мутагенеза, генетического конструирования (генной инженерии) и др. современных методов разработанных на основе фундаментальных исследований изложены в источнике [1]. Использование таких штаммов является определяющим фактором себестоимости производства соответствующей биотехнологической продукции. При этом основным фактором ее снижения как показано ниже (особенно для аэробных процессов) является скорость роста биомассы и / или биосинтеза целевых БАВ.

Значительную часть (до 25 % и более) в себестоимости продуктов биосинтеза (особенно синтезируемых в анаэробных условиях) составляют затраты на питательные среды (субстраты). С целью их сокращения стремятся использовать недорогое растительное и вторичное сырье: гидролизаты зерна и растительной биомассы; отходы пищевой, целлюлозно-бумажной, химической и нефтяной промышленности. Для биосинтеза пищевых добавок и ингредиентов обычно используются: мелассная, ацетоно-бутиловая и зерновая барда, кукурузный экстракт, гидрол, молочная сыворотка, крахмал, меласса, пивная дробина, кукурузная и соевая мука, отруби, картофельные сок и мезга и др. вторичное сырье АПК [2–4]. Оптимальный состав субстратов должен удовлетворять физиологические потребности соответствующего продуцента, что достигается теоретическими и экспериментальными исследованиями с использованием математического метода планирования эксперимента.

Факторами подлежащими оптимизации определяющими скорость роста и биосинтетическую активность продуцентов также являются: концентрация биопродуктов, активаторов и ингибиторов, pH, температура, осмотическое давление, вязкость, содержание кислорода и углекислого газа. Нахождение оптимальных параметров микробиосинтеза представляет собой достаточно сложную задачу решаемую с применением как экспериментальных так и теоретических исследований [5–7].

Значительную долю (до 40 %) в себестоимости производства ингредиентов с помощью микробиосинтеза в аэробных условиях составляют затраты на стадию культивирования, прежде всего на подготовку, сжатие и подачу воздуха в биореакторы. Растворимость кислорода в среде сравнительно низка и зависит от температуры, давления и от концентрации растворенных, эмульгированных и диспергированных компонентов.

Обобщенные расчетным путем экспериментальные данные затрат электроэнергии на сжатие воздуха подаваемого в биореакторы барботажного типа представлены на рис. 2. При этом обычно для аэробных процессов требуется подавать один нм^3 воздуха / м^3 объема субстрата в минуту. Тогда в сутки для биореактора с объемом субстрата 36 м^3 при подаче сжатого воздуха с давлением 0,3 МПа при КПД = 0,8 потребуется затратить электроэнергию в количестве 3888 кВт· час/ сут (0,06· 36· 60· 24: 0,8) на общую сумму 19 440 руб./сут при цене 5 руб. / кВт· час.

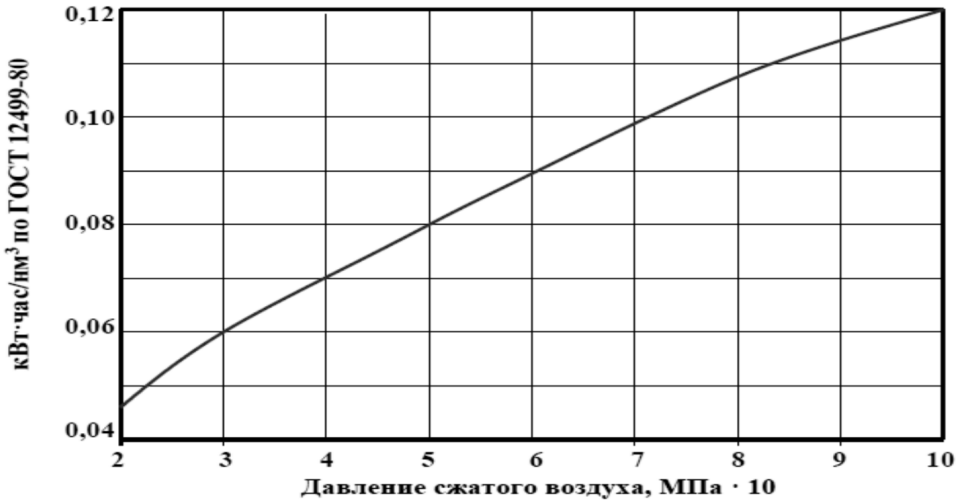


Рисунок 2 – Затраты электроэнергии на сжатие 1 нм3 воздуха

Анализ показывает, что для сокращения этих значительных затрат необходимо сокращать время культивирования. Отсюда следует необходимость использования штаммов с высокой скоростью роста и биосинтеза целевых БАВ.

Кроме того, данные швейцарской компании Bioengineering AG приведенные в табл. 1 показывают целесообразность оснащения биореакторов высокоскоростными мешалками.

Таблица 1 – Скорость абсорбции кислорода в воде (мг / (л×мин)) в зависимости от аэрации и перемешивания среды

Количество подаваемого воздуха, $м^3/(м^3 \cdot мин)$	Частота вращения мешалки, $мин^{-1}$				
	0	500	800	1000	2000
0,35	1,3 мг / (л×мин)	4,0	7,5	14,5	15,1
0,65	3,5	7,3	12,1	19,1	22,1
1,00	6,0	10,0	15,0	23,0	24,0
1,30	7,5	13,9	18,0	26,0	28,0
1,60	11,0	15,5	20,0	27,0	29,0

Данные этой же компании приведенные в табл. 2 показывают – адсорбция кислорода в водных растворах (субстрате) зависит от содержания растворенных веществ (на примере сахарозы), пеногасителей (на примере подсолнечного масла), а также от количества биомассы штамма-продуцента и взвешенных веществ.

Видно, что микробиосинтез следует проводить на субстратах не содержащих взвешенные вещества, для удаления которых в биотехнологической линии рис. 1 предусмотрена мембранная установка поз. 6. Иначе придется увеличивать подачу сжатого воздуха и его давление с соответствующим значительным (в разы) повышением энергозатрат (см. рис. 2). При этом следует учитывать, что на разных стадиях микробиосинтеза необходимо поддерживать в биореакторах различную концентрацию растворенного кислорода. Так, во время роста микроорганизмы обычно потребляют кислорода больше, чем во время бисинтеза целевого метаболита. Оптимальной для роста биомассы считается концентрация кислорода 50…60 % от полного насыщения, а для биосинтеза целевых метаболитов – 10…20 %.

Основной стадией производства БАВ является и стадия их выделения из культуры с последующей очисткой, концентрированием и сушкой. Оптимальными методами для этого являются баромембранные процессы (БМП): микрофильтрация (МФ), ультрафильтрация (УФ), нанофильтрация (НФ) и обратный осмос (ОО). Сферы их применения приведены в табл. 3.

Таблица 2 – Абсорбция (растворимость) кислорода в воде (мг/л) в зависимости от концентрации диспергированных компонентов при 20 °С

Сахароза		Подсолнечное масло		Взвешенные в-ва. Биомасса	
концентрация, %	абсорбция O_2, (мг/л)	концентрация, %	абсорбция O_2, (мг/л)	концентрация, %	абсорбция O_2, (мг/л)
0	8,2	0	8,9	0	8,0
2,5	7,8	0,05	11,6	3,0	4,1
5,0	7,2	0,10	18,9	6,0	2,4
7,5	6,6	0,15	19,0	9,6	1,5
10,0	5,9	0,20	22,3	16,0	1,2
15,0	4,8	0,25	24,0	32,0	0,8

Таблица 3 – Основные характеристики и назначение баромембранных процессов

Баромембранный процесс (БМП)	Диаметр пор, мкм	Рабочее давление, МПа	Основное назначение
Микрофильтрация (МФ)	0,1–1,0	0,1–0,3	Холодная стерилизация; удаление взвесей, коллоидов
Ультрафильтрация (УФ)	0,01–0,1	0,3–1,0	Концентрирование высокомолекулярных БАВ (ингредиентов)
Нанофильтрация (НФ)	0,0001–0,1	1,0–1,5	Разделение и концентрирование солей и органических веществ
Обратный осмос (ОО)	>0,0001 плотные	> π 1,5–10,0	Концентрирование низкомолекулярной органики и БАВ

Применение БМП по сравнению с другими традиционными процессами удаления влаги (выпариванием, сушкой и вымораживанием) обеспечивает значительное сокращение энергозатрат (см. табл. 4). Процессы же центрифугирования, фильтрования и флотации не позволяют выделять (разделять) растворенные вещества с различной молекулярной массой.

В последние годы начинают широко применяться мембранные биореакторы (МБР). Они основаны на оптимальном сочетании биореакторов (ферментеров, дрожжегенераторов, аэротенков, метантенков) с мембранными модулями (ММ) и / или с мембранными установками (МУ).

В МБР биосинтез протекают одновременно с выделением (разделением) его продуктов с помощь мембран. МБР выгодно отличаются как от систем с иммобилизованными катализаторами, ферментами и микроорганизмами так и от биореакторов для глубинного культивирования микроорганизмов и гидролиза (ферментолиза, автолиза) высокомолекулярных соединений, дрожжей и др. микроорганизмов. От первых – тем, что ферменты (катализаторы, продуценты) находятся в растворе и биохимические реакции не лимитируются медленно протекающей диффузией, а от вторых – возможностью смещения биосинтеза или гидролиза в сторону образования целевых продуктов.

Это происходит в соответствии с одним из основных законов химической термодинамики (принципом смещения равновесия Ле-Шателье – Брауна) – удаление продукта из зоны реакции сдвигает равновесие в сторону его образования.

Таблица 4 – Энергозатраты при разделении, очистке и концентрировании растворов БАВ

Процессы разделения и концентрирования (удаления влаги)	Энергозатраты, МДж/м^3
Баромембранные процессы: – теоретическое значение при давлении 5 МПа при однонаправленном потоке в тупик (dead-end flow); – достигаемые на современных рулонных ОО – и НФ установках в проточном режиме (cross flow); – характерные для современных УФ – НФ – и МФ установок в режиме cross flow с высокой тангенциальной скоростью в межмембранных каналах	 4,9 15…25 100…150
Вакуум-выпаривание в 4-х корпусной установке	570
Сушка	2300
Вымораживание	340
Центрифугирование. Флотация	13
Фильтрование на вакуумных фильтрах	35…45

ММ или МУ в составе МБР создают предпосылки и возможности:

– увеличения концентрации продуктов биосинтеза и степени биоконверсии сырья, теоретически до 100 %;

– уменьшения объемов биореакторов за счет увеличения скорости биокатализа путем постоянного и непрерывного обновления питательной среды и вывода целевых продуктов и метаболитов, а также повышения концентрации продуцентов или ферментов.

Отечественные мембранные элементы выпускаемые ЗАО «НТЦ Владипор», ООО «Керамикфильтр» и ОАО «РМ Нанотех» отвечают требованиям биотехнологических производств.

Работа выполнена в рамках Программы Фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2019–2021 годы (тема № 0529–2019–0066).

ЛИТЕРАТУРА

1. Храмцова Е.А. Селекция продуцентов: курс лекций – Минск: БГУ, 2011. – 132 с.

2. Сырье для промышленной биотехнологии. URL: http://www.helpiks.org/9–25743.html

3. Кудряшов В.Л. Производство и использование жидкого ультраконцентрата из барды // Ликероводочное производство и виноделие. – 2012. – № 11 – 12 – С. 18–20.

4. Борщова Ю.А. Перспективы использования отходов агропромышленного комплекса (АПК) для культивирования мутантного штамма ASPERGILLUS FOETIDUS – продуцента комплекса гидролаз // Заметки ученого. – 2015. – № 3. – С. 21–25.

5. Дербышев В.В. Новая методология оптимизации производства продуктов микробиологического синтеза // Интернет-журнал о коммерческих биотехнологиях. CBio.ru. 2006. URL: http://www. cbio.ru›page/43/id/2816/

6. Оптимизация биотехнологических процессов микробиологического синтеза // URL: http://www. ohrana-bgd.ru›mikbio/mikbio2_06.html

7. Гордеева Ю.Л. Оптимизация непреывных процессв микробиологического синтеза с нелинейной кинетикой роста микроорганизмов // Теоретические основы химической технологии. – 2015. – № 6. – С. 651–658.

8. Кудряшов В.Л. Мембранный биореактор – новое гибридное оборудование для производства пищевых БАВ, биопрепаратов и очистки стоков // Пищевая пром-сть. – 2018. – № 1. – С. 14–18.

УДК 575.113:582.769:577.2:577.21

ОБЪЕДИНЕНИЕ В ОДНОМ ГЕНОТИПЕ ЛОКУСОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ НЕКОТОРЫЕ ПАРАМЕТРЫ ВОЛОКНА, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА «ПИРАМИДИРОВАНИЯ ГЕНОВ»

А.А. Туланов, М.М. Дарманов, А.Х. Макамов, О.С. Тураев, В.С. Камбурова, И.Ю. Абдурахмонов

Центр геномики и биоинформатики АН РУз, Ташкент, Узбекистан

В современной селекции при создании новых сельскохозяйственных культур активно применяют новые методы и технологии, связанные с достижениями генетики и биотехнологии. Одним из таких методов является «пирамидирование генов», позволяющее собирать в один генотип несколько хозяйственно-ценных признаков, ассоциация которых с определенными ДНК-маркерами уже известна. В настоящее время данная технология считается основной приемлемой стратегией при создании новых сортов сельскохозяйственных культур [3; 4].

Использование метода пирамидирования генов / локусов для создания сортов хлопчатника, эффективно сочетающих в себе гены / локусы нескольких признаков качества волокна, например, микронейр, прочность, длина и элонгация, позволяет существенно повысить производительность хлопководства с точки зрения текстильной индустрии. Известно, что чем тоньше, прочнее и длиннее волокно хлопчатника, тем оно ценнее и предпочтительнее для текстильной промышленности, так как из него будут сотканы ткани лучшего качества.

С учетом сказанного, целью нашего исследования было создание с помощью технологии пирамидирования генов новых линий хлопчатника, в которых ДНК-локусы, ответственные за различные показатели качества волокна (длина, прочность и элонгация) объединены в одном генотипе, что позволит получить сорта, улучшенные одновременно по нескольким признакам качества волокна.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исходным материалом для скрещивания в качестве доноров были выбраны две разновидности *Gossypium hirsutum*: первый донор – линия L-141, которая имеет в геноме маркерный локус, отвечающий за длину и прочность волокна, и второй – Saenr Pena 85, с идентифицированным QTL-локусом, определяющим элонгацию волокна. В качестве генотипа-реципиента был выбран коммерческий сорт Андижан-35.

На первом этапе исследований были получены простые гибриды в двух комбинациях скрещивания: (Андижан-35×L-141) и (Андижан-35×Saenr Pena 85). На следующем этапе эти простые гибриды были скрещены друг с другом для получения первого поколения сложного гибрида [(Андижан-35×L-141)×(Андижан-35×Saenr Pena 85)]. И, наконец, с целью закрепления остальных признаков сорта Андижан-35 и элиминации ненужных признаков доноров, кроме качества волокна, было проведено беккросс скрещивание полученных сложных гибридов (F_1) с растением – реципиентом Андижан-35. Таким образом, были получены генотипы BC_4 F_2.

До проведения последующих скрещиваний гибриды первого беккросс (BC_1) поколения были проанализированы на предмет приобретения целевого признака с помощью ПЦР-анализа, используя ДНК маркер BNL1604, ассоциированный с длиной и прочностью волокна, и ДНК-маркер BNL3650, ассоциированный с элонгацией волокна [1; 2]. Положительные гибриды, несущие интересующие нас аллели, оставляли для следующих серий скрещивания.

ДНК-маркеры. До проведения последующих скрещиваний гибриды первого беккросс (BC_1) поколения были анализированы на предмет приобретения целевого признака через ПЦР-анализ их ДНК с помощью маркера BNL1604, ассоциированного с длиной и прочностью волокна, и ДНК-маркера BNL3650, ассоциированного с элонгацией волокна [1,2].

Положительные гибриды, несущие интересующие нас аллели, оставляли для следующих серий скрещивания.

Выделение геномной ДНК. Для выделения ДНК с каждого растения собирали по 2–3 свежих листа, замораживали их в жидком азоте и хранили при -80 °C до выделения геномной ДНК. Выделение геномной ДНК проводили CTAB-методом с незначительными модификациями [5].

ПЦР и генотипирование. Для генотипирования использовали панель микросателлитных маркеров, созданных в рамках ранее проведенных исследований, чья ассоциация с определенными признаками качества волокна была установлена [1, 2]. Микросаттелитное генотипирование было проведено в соответствии с методом Reddy *et al*., 2001 [6].

Анализ качественных показателей волокна. Оценка качества волокна материалов исследования проводилась на оборудовании HVI (High Volume Instrumentation) в центре сертификации качества волокна “СИФАТ”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам молекулярно-генетического анализа каждого растения BC_4 F_2-поколения нами были идентифицированы генотипы, гомозиготные по двум маркерным локусам (BNL1604 и BNL3545) с характерным для донорных линий (L-141 и Saenr Pena85) спектром распределения аллелей. Эти генотипы были отобраны для последующих исследований технологических показателей качества волокна и для оценки влияния интрогрессированных QTL-аллелей на эти показатели.

В результате проведенных скрещиваний и индивидуального отбора были выбраны 245 гибридов BC_4 F_2, генотипирование которых показало ожидаемое распределение аллелей, т. е. маркеров в потомстве BC_4 F_2. Так, из 245 гибридов 126 растений были гетерозиготны по маркеру BNL1604 (прочность волокна), у 57 генотипов паттерн ПЦР-продуктов был похож на генотип реципиента, у остальных 62 гибридов – на генотип донора. По второму маркеру BNL3545 (элонгация волокна) распределение генотипов было следующее: 114 гибрида были гетерозиготами, 68 растений имели аллели, свойственные реципиентному генотипу и 63 – донорному.

Таким образом, анализ частоты выявления маркеров показал, что в поколении BC_4 F_2 расщепление генотипов по обоим исследуемым маркерам происходило в соотношении 1:2:1.

Полученные результаты показали, что растения BC_4 F_2 поколения, гомозиготные по обоим QTL локусам, имеют длину волокна (Len), равную 1,18 дюймам, прочность (STR) – 35,2 гс/текс и элонгацию (Elg) – 10,8 %. У реципиента-Андижан-35 эти показатели значительно ниже: длина волокна – 1,13 дюйма, прочность – 32,5 гс/текс, элонгация -9,0 %. У одного из доноров, т. е. L-141 длина и прочность волокна составляют 1,24 дюйма и 40,1 гс/текс, соответственно, а второй донор – Saenr Pena 85 имеет более высокий показатель элонгации волокна, равный 9,7 %.

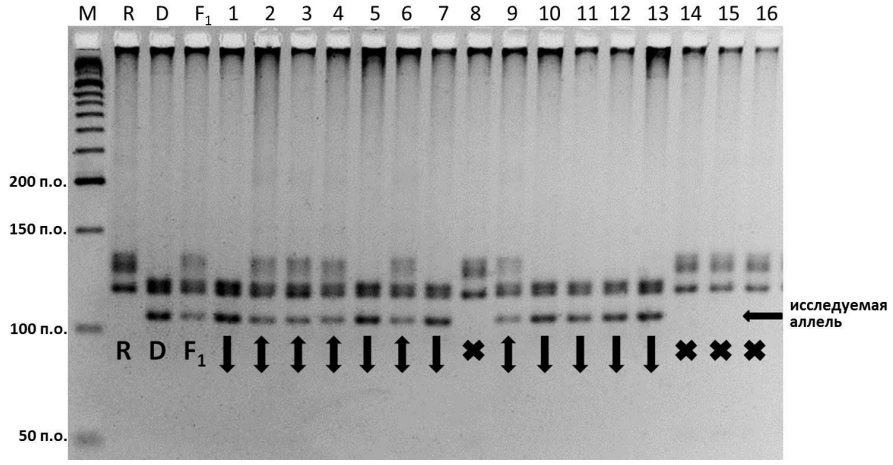


Рисунок 1. Результаты амплификации ДНК беккросс гибридов инд. отбора F2 BC4, с использованием ДНК-маркера BNL1604: M – маркер молекулярной массы ДНК, R – родитель реципиент, D – родитель донор, F1 – гибрид первого поколения, 1–16 генотипы от индивидуального отбора F2 BC4, ⬇- для размножения семян, ⬍⬍ – для дальнейшего самоопыления и скрининга, ✖ – удаляемые генотипы.

Таким образом, качество волокна у полученных гибридных растений существенно выше по сравнению с исходным материалом – рецепиентом Андижан-35: длина волокна увеличилась на 5.3 %, прочность – на 7.7 %, показатель элонгации – на 20 %. При сопоставлении с сортом Наманган-77, также заметны преимущества наших гибридов по сравнению со стандартом: длина волокна больше на 5,1 %, прочность – на 8.3 %, значение элонгации – на 4,3 % выше, чем у контрольного сорта Наманган-77.

Таким образом, мобилизация новых QTL-регионов из донорных линий в геном реципиента (Андижан-35) при «пирамидировании генов» значительно улучшила параметры длины, прочности и элонгации волокна полученных гибридов BC_4 F_2, не затрагивая и не изменяя при этом другие параметры качества волокна. Более того, результаты статистического анализа подтверждают наличие достоверной ассоциации ДНК-маркеров BNL1604 и BNL3545 с тестированными признаками волокна.

ЛИТЕРАТУРА

Abdurakhmonov I.Y., Saha S., Jenkins J.N., Buriev Z.T., Shermatov S.E., Scheffler B.E., Pepper A.E., Yu J.Z., Kohel R.J., Abdukarimov A. Linkage disequilibrium based association mapping of fiber quality traits in G. hirsutum L. variety germplasm // Genetica. – Berlin, – 2009.

Abdurakhmonov, I.Y., R.J. Kohel, J.Z. Yu, A.E. Pepper, A.A. Abdullaev, F.N. Kushanov, I.B. Salakhutdinov, Z.T. Buriev, S. Saha, B.E. Scheffler, J.N. Jenkins, and A. Abdukarimov. 2008. Molecular diversity and association mapping of fiber quality traits in exotic G. hirsutum L. germplasm. Genomics 98: 478–487.

Guo Wang-Zhen, Zhang Tian-Zhen, ZhuXie-Fei, Pan Jia-Ju (2005): Modified Backcross Pyramiding Breeding with Molecular Marker-Assisted Selection and Its Application in Cotton. – ActaAgronomicaSinica. Vol.31, No.8, pp. 963–970.

Abdurakhmonov I.Y., Z.T. Buriev, Sh. E. Shermatov, F.N. Kushanov, A. Makamov, U. Shopulatov, O. Turaev, T. Norov, Ch. Akhmedov, M. Mirzaakhmedov, A. Abdukarimov. Utilization of natural diversity in upland cotton (G.hirsutum) germplasm collection for pyramiding genes via marker-assisted selection program // 5th meeting of Asian Cotton Research and Development Network: Proceedings. – Lahore, Pakistan, 2011.

Paterson A H, Brubaker C L, Wendel J F. 1993. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*, **11**, 122–127.

Reddy O.U.K., Pepper A.E., Abdurakhmonov I.Y., Saha S., Jenkins J.N., Brooks T.D., Bolek Y. and El-Zik K.M. The identification of dinucleotide and trinucleotide microsatellite repeat loci from cotton G.hirsutum L, J. Cotton Sci. (Memphis), 2001. – No 5. – pp. 103–113.

УДК 658.562.6

ОБЕСПЕЧЕНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ

Ю.Ю. Шестакова, Н.Л. Клейменова, О.А. Орловцева, Л.И. Назина, А.Н. Пегина

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

В настоящее время каждому предприятию пищевой промышленности Российской Федерации и стран Таможенного Союза необходимо в соответствии со статьей 10 ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» [1] разработать, внедрить и поддерживать процедуры, основанные на принципах ХАССП. В Российской Федерации нормативным документом, устанавливающим требования к системе управления качеством и безопасностью пищевых продуктов на основе принципов ХАССП, является ГОСТ Р 51705.1–2001 «Системы качества. Управление качеством пищевых продуктов на основе принципов ХАССП. Общие требования» [2].

Разработку и внедрение системы безопасности рассмотрим на примере предприятия, производящего мясную продукцию [3]. Разработка системы начинается с анализа всего производства. Составляется подробная блок-схема (диаграмма потока) каждого этапа жизненного цикла (в качестве изделия выберем вареную колбасу). Диаграмма строится для создания четкой и простой последовательности операций, позволяющей идентифицировать все возможные биологические, химические и физические опасности. Стадии процесса производства представлены на рисунке 1.

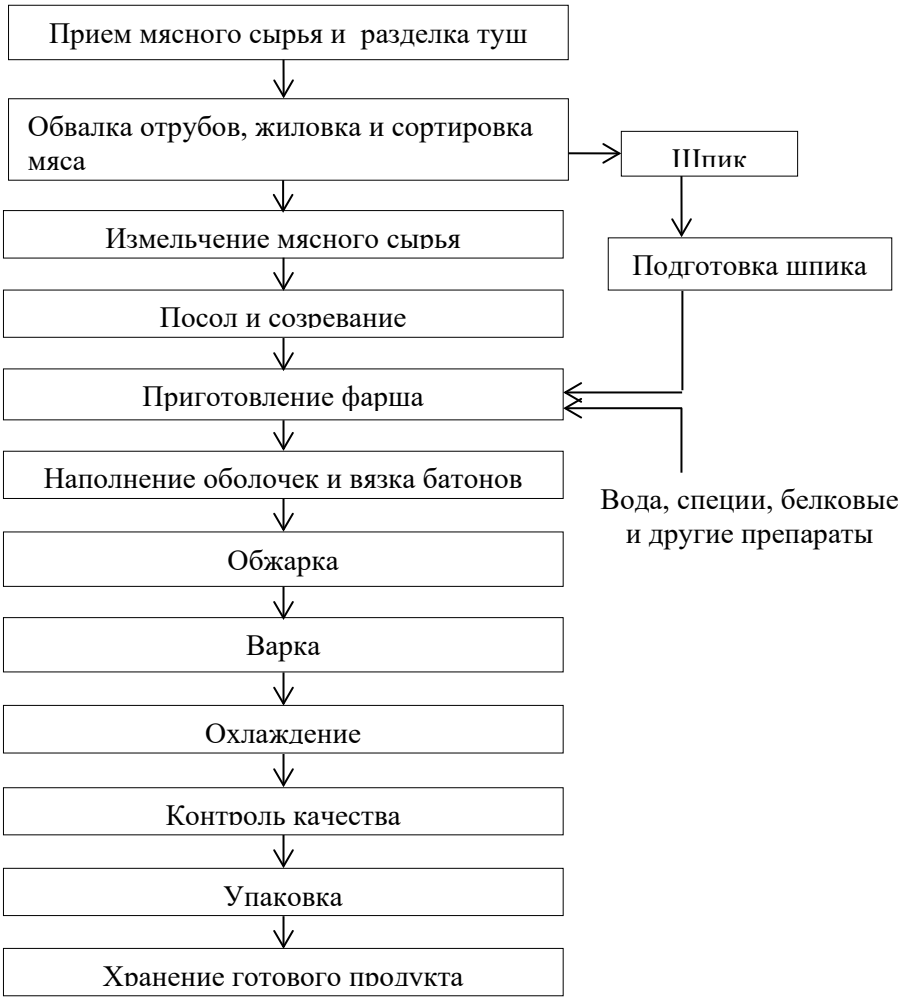


Рисунок 1 – Блок-схема производства вареной колбасы

Следующим этапом является составление перечня потенциально опасных факторов, которые могут при недостаточном и неэффективном контроле с большой вероятностью причинить вред потребителю, а также определить возможные места их возникновения.

Анализ опасностей осуществляется в две стадии: составление перечня возможных опасностей и их оценка [4]. При идентификации опасных факторов учитывалась характеристика продукта, ингредиенты, сырье, действия, производимые на каждом этапе производственного процесса, и рассматриваются возможности появления, возрастания или сохранения опасных факторов в продукте, методы хранения, опасности, исходящие от персонала, оборудования, производственной среды, вопросы безопасности, связанные с реализацией продукта на рынке, приготовлением и употреблением продукта в пищу. Таким образом, для процесса производства вареной колбасы были выявлены опасности трех видов: биологические, химические и биологические, представленные в таблице 1.

На рисунке 2 приведены потенциально опасные факторы в соответствии с этапами производства, на которых они могут возникнуть. В случае отсутствия контроля над этими факторами, они могут нанести вред здоровью или привести к различным повреждениям и заболеваниям.

После определения перечня потенциально опасных факторов необходимо перейти к анализу рисков по качественной диаграмме. Необходимость учета опасных факторов была определена при помощи диаграммы анализа рисков, которая представляет собой двухступенчатый процесс, предусматривающий выявление и оценку рисков и проведение оценки риска по каждому потенциально опасному фактору с учетом вероятности реализации опасного фактора и степени тяжести его последствий [5]. Далее выявляем критические контрольные точки с помощью «дерева принятия решения». Последовательно отвечая на вопросы, определяем возможность возникновения риска на каждой технологической операции и принимаем решение о том, является ли она критической контрольной точкой. Не учитываются точки, для которых предусмотрены предупреждающие действия, установленные в санитарных нормах и правилах и технической документации. Результат выявления критических контрольных точек представлен в таблице 2. Таким образом, было выявлено 4 критических контрольных точек: прием, зачистка, разделка туш, полутуш; термообработка; охлаждение и хранение.

Таблица 1 – Потенциально опасные факторы производства вареной колбасы

Тип опасного фактора	Опасный фактор
Биологический	КМАФАнМ (мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы)
	БГКП (бактерии группы кишечной палочки)
	Патогенные, в т. ч. сальмонеллы
	Птицы, грызуны, насекомые
Химический	Антибиотики
	Остаточное количество моющих и дезинфицирующих средств
	Смазочные материалы
	Нитриты
Физический	Персонал (отходы жизнедеятельности: волос, ногти)
	Личные вещи

После установления критических контрольных точек разрабатываем систему мониторинга. Мониторинг – это систематическое проведение серии измерений и наблюдений контрольных показателей для проверки того, находятся ли ККТ под контролем или нет. Для каждой ККТ устанавливаем контролируемые параметры, которые будут контролироваться при мониторинге (таблица 3).

Поводя итоги, можно сделать вывод о том, что ХАССП является самой эффективной и признанной во всем мире системой по управлению качеством и безопасностью пищевой продукции. Основное преимущество ХАССП состоит в том, что ошибки не выявляют, а предвидят и предупреждают при помощи поэтапного контроля на протяжении всей цепочки производства пищевых продуктов. Применение системы ХАССП на предприятии пищевой промышленности позволит оптимизировать процесс управления, снизить количество бракованной продукции, повысить доверие к продукции, выпускать конкурентоспособную продукцию и поставлять продукты на мировые рынки.



Рисунок 2 – Потенциально опасные факторы на этапах производства

Таблица 2 – Критические контрольные точки

Этап	Существуют ли средства контроля?		Можно ли на данном этапе процесса устранить или сократить опасность до приемлемого уровня?		Может ли воздействие опасности превысить допустимый уровень?		Может ли последующий этап процесса устранить или снизить опасность до приемлемого уровня?		ККТ
	Да	Нет	Да	Нет	Да	Нет	Да	Нет	
Прием, зачистка, разделка туш, полутуш	+		+						ККТ
Приготовление фарша	+			-	+		+		-
Наполнение оболочек и вязка батонов	+			-	+		+		-
Термообработка	+		+						ККТ
Охлаждение	+		+						ККТ
Хранение	+		+						ККТ

Таблица 3 – Система мониторинга по критическим контрольным точкам на этапах производства вареной колбасы

Этап	Контролируемые параметры	Система мониторинга
Прием, зачистка, разделка туш, полутуш	1. Наличие и содержание товарно-сопроводительной документации; 2. Наличие насекомых, грызунов и продуктов их жизнедеятельности	1. Анализ сопроводительной документации; 2. Визуальный контроль сырья на отсутствие металлических примесей, стекла, насекомых, грызунов и отходов их жизнедеятельности
Термообработка	1. Температура обсушки батонов 2. Температура обжарки 3. Температура варки 4. Продолжительность варки 5. Температура в центре батона после варки	1. Автоматизированная (варка происходит посредством контроля термощупом); 2. Визуальный контроль параметров/ не реже 3-х раз в процессе. По окончании термообработки проверяется температура в толще посредством портативого термометра
Охлаждение	1. Продолжительность охлаждения 2. Температура в камере охлажения 3. Температура в центре батона после варки	1. Автоматизированная (посредством программирования шагов варки); 2. Визуальный контроль параметров/ не реже 3-х раз в процессе. По окончании термообработки проверяется температура в толще посредством портативого термометра
Хранение	1. Температура и влажность на складе хранения 2. Наличие насекомых, грызунов и продуктов их жизнедеятельности	1. Контроль температуры, влажности на складе и сроков годности готового продукта на складе хранения; 2. Визуальный контроль на отсутствие грызунов, насекомых и отходов их жизнедеятельности

ЛИТЕРАТУРА

1. Технический регламент Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции»: ТР ТС № 021/2011: принят решением Таможенного союза от 9 декабря 2011 № 880. Доступ из системы «Электронный фонд правовой и нормативно-технической документации». Источник: http://docs.cntd.ru/document/902320560

2. ГОСТ Р 51705.1–2011. Системы качества. Управление качеством пищевых продуктов на основе принципов ХАССП. Общие положения. М.: Стандартинформ, 2009. 12 с.

3. ГОСТ 33182–2014. Промышленность мясная. Порядок разработки системы ХАССП. М.: Стандартинформ, 2015. 16 с.

4. Жашков А.А., Клейменова Н.Л. Предпосылки внедрения системы ХАССП на отечественных предприятиях / Экономика. Инновации. Управление качеством. 2013. № 4 (5). С. 75–78.

5. Петренкова М.А., Назина Л.И., Орловцева О.А., Клейменова Н.Л. Риск-ориентированный подход к системе менеджмента качества / В сборнике: Моделирование энергоинформационных процессов Сборник материалов VII национальной научно-практической конференции с международным участием. 2019. С. 355–359.

УДК 664.681

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА ФОСФОЛИПАЗЫ НА КАЧЕСТВЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КЕКСОВ

Е.А. Солдатова, С.Ю. Мистенева, Т.В. Савенкова

Всероссийский научно-исследовательский институт кондитерской промышленности – филиал «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова, РАН, Москва, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Современная биотехнология оказывает влияние на пищевую промышленность посредством создания новых продуктов, снижения себестоимости и усовершенствования бактериальных процессов, с незапамятных пор используемых в производстве продуктов питания [1].

Применение ферментных препаратов позволяет повышать скорость технологических процессов, увеличивать выход готовой продукции, улучшать ее качество и пищевую ценность, экономить ценное сырье и снижать количество отходов. Для этой цели, в технологии пищевых продуктов применяются ферментные препараты с амилолитической, протеолитической, липолитической, пектолитической, оксидазной активностью [2–4].

Целью работы является оптимизация технологических свойств теста для кексов и повышение качественных показателей готовой продукции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

фермент Фосфолипаза А2 PLA2 NAGASE L/R (Япония), мука пшеничная высшего сорта с содержанием клейковины 26 %, сахар-песок, яичный меланж, заменитель молочного жира, лецитин, химические разрыхлители (сода, аммоний). Объектами исследования являлись экспериментальные образцы кексов на химических разрыхлителях. Определение физико-химических и органолептических показателей продукции осуществляли стандартными методами. Определение пористости кексов производили с помощью пробника Журавлева на приборе ИПХ-1 по ГОСТ 5669–96. Активность воды определяли на анализаторе AquaLab 4TE (Decagon Devices, США) методом зеркально охлаждаемого датчика точки росы.

Фосфолипазы (англ. phospholipase) ферменты класса гидролаз, катализирующие гидролиз фосфоглицеридов. В зависимости от положения гидролизуемой связи в фосфолипиде различают 4 основных класса фосфолипаз: A, B, C и D [5]. Фосфолипаза A_2 – (EC 3.1.1.4) (PLA_2) представляет собой фермент, специально действующий на жирную кислоту в SN-2 положении фосфолипида. Эмульгирующие свойства яичного желтка и лецитина, после их обработки фосфолипазой A_2 значительно возрастают. Добавление ферментного препарата осуществлялось на стадии приготовления эмульсии, в количестве 0,01 % к массе яично-жировой смеси.

Кексы представляют собой мучное кондитерское изделие с большим содержанием жира, сахара и яйцепродуктов. Вследствие разнообразия рецептур и привлекательных вкусовых качеств, кексы занимают особую нишу на рынке МКИ и пользуются стабильно высоким спросом у всех слоев населения. Технология производства кекса предусматривает его изготовление на основе эмульсии типа «масло в воде», для этого предварительно подготовленный жировой компонент (заменитель молочного жира и смешанный с подготовленным лецитином) растирали с сахаром, пока смесь не станет воздушной, после чего, постепенно в три-четыре приема, на рабочем ходу сбивальной машины, добавляли яичный меланж, разведенный в теплой воде ферментный препарат и другие рецептурные компоненты за исключением муки. Общая продолжительность сбивания 25–30 минут. Замес теста осуществляют путем смешивания эмульсии с мукой в течение 4–5 мин. Готовое тесто с влажностью 27–30 % и температурой 23–25 °С раскладывали в формы, предварительно выстланные бумагой. Выпечка осуществлялась в течение 20 мин при температуре 190–210 °С. Во время выпечки фермент инактивируется.

В рецептуре кексов яичный меланж и лецитин выполняют роль эмульгаторов, улучшающих диспергируемость жира и повышающих стабильность эмульсии, что в свою очередь обеспечивает получение теста с большим количеством мелких пузырьков воздуха. При выпечке объем воздушных пор увеличивается, из пены получается губчатая структура мякиша кексов [6–7].

Основными компонентами лецитина, в том числе содержащегося в яичном меланже, являются фосфолипиды фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин, которые и проявляют эмульгирующие свойства, особенно выраженные у их лизоформ. Гидролитическая реакция образования лизоформ катализируется фосфолипазой A_2.

В процессе приготовления теста для кексов, за время сбивания эмульсии (порядка 30 мин) благодаря внесения фосфолипазы A_2. происходит гидролиз липидов яичного меланжа и лецитина с образованием лизофосфатидилхолина, обладающего более сильными эмульгирующими свойствами, чем фосфатидилхолин, что улучшает физико-химические и органолептические показатели готовой продукции. Кексы, приготовленные с используем фосфолипазы A_2, характеризовались увеличенным объемом, более равномерной и тонкостенной пористостью и мягкой текстурой, и меньшей крошливостью в сравнении с контрольным образцом (рис 1).

Физико-химические показатели образцов кексов

Показатель	Контроль*	С внесением фермента Фосфолипаза A_2
Влажность, %	21,0	23,0
Плотность, г/см^3	0,510	0,480
Пористость, %	68,0	74,0
Активность воды	0,90	0,87

Профилограмма органолептической оценки образцов кекса

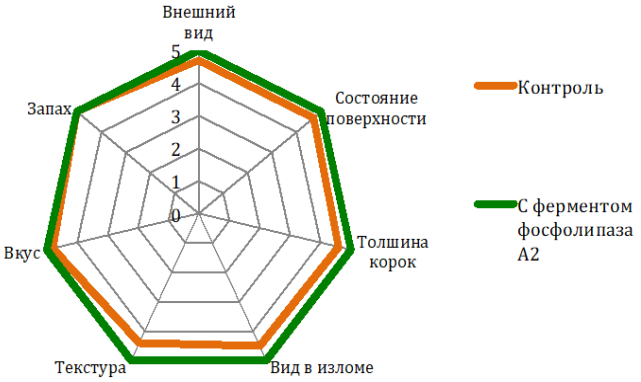


Рисунок 1. Влияние фермента фосфолипаза A_2 на физико-химические и органолептические показатели кексов

* Контроль – образец кекса, приготовленный по аналогичной рецептуре и технологии, но без использования фермента фосфолипазы A_2

В результате анализа полученных результатов установлено, что внесение фермента фосфолипазы A_2 способствует уменьшению потерь влаги при выпечке изделий, при этом готовое изделие характеризуется меньшим значением показателя активности воды, что предопределяет его лучшую сохранность в процессе хранения. Анализ полученных результатов позволяет сделать предварительный вывод о возможности уменьшения рецептурного количества яичного меланжа без ухудшения показателей качества готовой продукции, что позволит снизить ее себестоимость.

Благодаря тому, что продукты гидролиза фосфолипидов по строению идентичны пищевым эмульгаторам, а также могут вступать во взаимодействие с углеводами (моносахаридами и трисахаридами) и белками муки с образованием липопротеидных комплексов, создаются предпосылки развития технологий мучных кондитерских изделий на основе целенаправленной биохимической модификации полярных и неполярных фосфолипидов за счет применения ферментного препарата фосфолипазы A_2.

ЛИТЕРАТУРА

Чуешов Б.И. Промышленная биотехнология/Б.И. Чуешов, Егоров И.А., Рубан Е.А., Крутских Т.В. // Х.: Изд." НФаУ", 2011. 112 с.

Р.Дж. Уайтхерст, М. ван. Оорт. Ферменты в пищевой промышленности/ СПб.: Профессия, 2013, 408 с.

Жеребцов Н.А. Ферменты: Их роль в технологии пищевых продуктов/ Жеребцов Н.А. Корнеева О.С., Фараджева Е.Д. / Учебное пособие для вузов. Воронеж, Издательство Воронежского государственного университета, 1999. 120 с., ил. – ISBN 5–7455–1056–0

Чурилина Н.В. Разработка способов улучшения качества пшеничного хлеба на основе биохимической модификации липидов основного и дополнительного сырья: автореферат дис… кандидата технических наук / Москва, 2006. – 27 с.

Брагина Н.А. Липидные ингибиторы фосфолипазы A_2. / Брагина Н.А., Чупин В.В., Булгаков В.Г., Шальнев А.Н. / Биоорганическая химия 1999, 25 (2)., С. 83–96

Дункан Мэнли. Мучные кондитерские изделия/ СПб.: Профессия, 2003, 558 с.

Ковен С.П. Дополнительные рекомендации хлебопекам и кондитерам. Еще 151 вопрос и ответ/ Ковен С.П., Янг С.Л. // С. Петербург, И., Профессия, 2011, 246 с.

УДК 606:582.232

СОДЕРЖАНИЕ И СОСТАВ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ CYANOPHYTA

Д.И. Петрухина

Калужский государственный университет им. К.Э. Циолковского, Калуга, Россия

ВВЕДЕНИЕ

В исследованиях, посвященных хранению различных биологических объектов путем криоконсервации, помимо жизнеспособности, изучается также их биосинтетический потенциал после хранения при низкой температуре. Более того, исследование биосинтетического потенциала криоконсервируемых объектов считается одним из наиболее значимых параметров, который может свидетельствовать о результатах криоконсервации. Возможно, что изменения в биосинтезе являются общим компонентом реакции клеток как на физиологические, так и повреждающие воздействия. В этой связи изучение изменений биосинтеза в восстановительный период, как ответ на стресс, вызванный криоконсервацией, имеет важное значение для понимания не только криоповреждений, криоустойчивости, но и характера репарационных процессов.

Однако в работах, посвященных хранению родов *Arthrospira* и *Spirulina*, в том числе в обзорных статьях (Hubalek, 2003) приводятся данные только о выживаемости (Takano et al., 1973; Muhling, 2000; Motham et al., 2012).

Поскольку цианеи *Spirulina* и *Arthrospira* представляют интерес как продуценты экзополисахаридов, имеющих коммерческое применение (Bertocchi et al., 1990; Nicolaus et al., 1999), то необходимо было исследовать их биосинтетический потенциал до и после криоконсервации.

Известно, что полисахариды найденные в *A. platensis* обладают противовоспалительными свойствами и имеют доказанный терапевтический эффект. Кроме того, показано, что Spirulan, сульфатированный полисахарид продуцируемый *A. platensis*, является ингибитором образования метастаз в легких и может препятствовать делению раковых клеток (Nwodo et al., 2012).

Преимуществом использования экзополисахаридов заключается в том, что они экскретируются в культуральную среду, поэтому их получение не так дорого, как для эндоклеточных веществ (Friedrich, 2013). Экзополисахариды цианей могут быть связаны с наружней поверхностью клетки, так называемые экзополисахариды капсулы или слизи (Bertocchi et al., 1990; Gloaguen et al., 1995), либо быть растворенными в культуральной / питательной среде (Filali Mouhim et al., 1993).

Поскольку исследуемые штаммы цианей *S. subsalsa* PCC 9445 и *A. platensis* PCC 9223 могут представлять интерес как продуценты экзополисахаридов, имеющих коммерческое применение, было проведено исследование влияния сроков криоконсервации на биосинтетический потенциал исследуемых цианей после ре-культивации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали аксеничные штаммы *Spirulina subsalsa* PCC 9445 и *Arthrospira platensis* PCC 9223 из коллекции культур университета Пастера, Франция. Выращивание исходных культур и низкотемпературное консервирование осуществляли согласно методике, описанной нами ранее (Петрухина, Лыков, 2016).

Количество образовавшихся экзополисахаридов у исходной культуры цианей *S. subsalsa* PCC 9445 и *A. platensis* PCC 9223, а также ре-культивированных после криоконсервации в присутствии стерильного раствора глюкозы и ДМСО, определяли гравиметрически.

Определение экзополисахаридов исследуемых цианей проводили в исходной культуре (до криоконсервации) и после ре-культивирования криоконсерванных в течении 1 месяца, полугода и 1 года культур цианей и измеряли спустя 7 и 30 дней после оттаивания. Капсульные полисахариды экстрагировали из биомассы цианей, а внеклеточные растворимые полисахариды экстрагировали из питательной среды Заррука, в которой выращивали ре-культивированные цианеи после криоконсервирования.

Определение общего содержания уроновых кислот осуществляли согласно методу, описанному в статье Blumenkrantz и Asboe-Hansen (1973). Определение возможного содержания ацетил-групп осуществляли согласно методу, описанному в статье McComb и McCready (1957), а пируватных групп – согласно методу, описанному в статье Sloneker и Orentas (1962).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание экзополисахаридов цианей после криоконсервации. Исследования показали, что содержание капсульных полисахаридов, как и внеклеточных растворимых полисахаридов, у ре-культивированных цианей *S. subsalsa* PCC 9445 и *A. platensis* PCC 9223 снижалось пропорционально времени криоконсевации и в зависимости от используемого криопротектора (табл. 1.).

Таблица 1 – Содержание и состав экзополисахаридов у цианей *A. platensis* PCC 9223 и *S. subsalsa* PCC 9445 после 1 года криоконсервации и ре-культивирования в течение 7 дней

Длительность криоконсервации	Криопротектор		Экзополисахариды		Процентное содержание уроновых кислот в экзополисахаридах
			Капсульные (мг/г)	Внеклеточные растворимые (мг/л)	
***Spirulina subsalsa* PCC 9445**					
Исходная культура			0,80 ± 0,01	37,43 ± 0,16	24,10 ± 0,13
1 месяц	ДМСО	10 %	0,69 ± 0,05	39,12 ± 0,13	24,45 ± 0,13
		15 %	0,65 ± 0,04	31,62 ± 0,31	19,40 ± 0,14
	Глюкоза	10 %	0,74 ± 0,05	40,20 ± 0,31	25,75 ± 0,35
		15 %	0,71 ± 0,03	32,81 ± 0,22	19,40 ± 0,13
Полгода	ДМСО	10 %	0,59 ± 0,03	26,93 ± 0,14	17,50 ± 0,14
		15 %	0,44 ± 0,01	22,90 ± 0,13	10,50 ± 0,01
	Глюкоза	10 %	0,60 ± 0,03	28,62 ± 0,11	20,80 ± 0,51
		15 %	0,54 ± 0,01	24,33 ± 0,13	16,85 ± 0,21
1 год	ДМСО	10 %	0,60 ± 0,005	20,23 ± 0,28	18,32 ± 0,22
		15 %	0,46 ± 0,008	16,79 ± 0,29	10,35 ± 0,12
	Глюкоза	10 %	0,55 ± 0,006	25,87 ± 0,27	17,41 ± 0,19
		15 %	0,31 ± 0,01	14,00 ± 0,28	9,01 ± 0,11
***Arthrospira platensis* PCC 9223**					
Исходная культура			0,47 ± 0,01	25,81 ± 0,51	21,70 ± 0,15
1 месяц	ДМСО	10 %	0,38 ± 0,10	29,80 ± 0,43	21,50 ± 0,16
		15 %	0,38 ± 0,15	28,06 ± 0,21	16,26 ± 0,11
	Глюкоза	10 %	0,50 ± 0,15	19,72 ± 0,12	22,95 ± 0,20
		15 %	0,44 ± 0,13	16,51 ± 0,23	17,22 ± 0,33
Полгода	ДМСО	10 %	0,23 ± 0,03	13,20 ± 0,21	16,00 ± 0,08
		15 %	0,18 ± 0,08	12,52 ± 0,21	9,04 ± 0,38
	Глюкоза	10 %	0,41 ± 0,03	11,51 ± 0,13	19,80 ± 0,25
		15 %	0,35 ± 0,05	9,50 ± 0,92	14,85 ± 0,12
1 год	ДМСО	10 %	0,20 ± 0,013	8,30 ± 0,36	16,22 ± 0,17
		15 %	0,16 ± 0,01	7,90 ± 0,35	7,03 ± 0,21
	Глюкоза	10 %	0,35 ± 0,013	10,80 ± 0,28	15,4 ± 0,23
		15 %	0,28 ± 0,01	8,05 ± 0,57	8,08 ± 0,13

Полученные результаты исследования показали, что у штамма *S. subsalsa* PCC 9445 содержание экзополисахаридов, как капсульных, так и растворимых, соответственно в 1,7 раз и 1,45 раз выше, чем у *A. platensis* PCC 9223 (табл. 1.).

Содержание экзополисахаридов у обоих исследуемых цианей после криоконсервации с криопротектором в концентрации 15 % было ниже, чем при использовании 10 %-ной концентрации этого же криопротектора в независимости от времени хранения.

После кратковременного криоконсервирования (1 месяц) цианеи *S. subsalsa* PCC 9445 в присутствии 10 %-ной глюкозы содержание капсульных полисахаридов снижалось на 7,5 %, затем после полугода и 1 года – криоконсервирования на 25 % и 32,1 % соответственно. В присутствии 10 %-ного ДМСО содержание капсульных полисахаридов снижалось более резко на 13,75 %, затем на 26,25 % и 24,4 %.

Содержание растворимых полисахаридов у *S. subsalsa* PCC 9445 после кратковременного криоконсервирования в присутствии 10 %-ной глюкозы снижалось на 7,5 %, затем после полугода и 1 года криоконсервирования на 23,53 % и 30,9 % соответственно. В присутствии 10 %-ного ДМСО содержание внеклеточных полисахаридов не снижалось, но после полугода и 1 года криоконсервирования снижалось на 28,05 % и 45,9 % соответственно.

Сравнение динамики снижения содержание экзополисахаридов у двух исследуемых видов показало, что у цианеи *A. platensis* PCC 9223 после кратковременного криоконсервирования в присутствии 10 %-ной глюкозы содержание капсульных полисахаридов не снижалось, но после полугода и 1 года криоконсервирования снижалось на 12,76 % и 24,3 % соответственно. После кратковременного криоконсервирования в присутствии 10 %-ного ДМСО содержание капсульных полисахаридов снижалось на 19,14 %, затем на 51,06 % и 57,4 %, что значительно больше, чем у *S. subsalsa* PCC 9445.

Содержание растворимых полисахаридов *A. platensis* PCC 9223 после криоконсервирования также было значительно ниже, чем в случае *S. subsalsa*. Так, после кратковременного криоконсервирования *A. platensis* в присутствии 10 %-ной глюкозы снижалось на 23,59 %, затем после полугода и 1 года криоконсервирования на 55,4 % и 58,2 % соответственно. В присутствии 10 %-ного ДМСО после кратковременного криоконсервирования содержание растворимых полисахаридов не снижалось, но после полугода и 1 года криоконсервирования снижалось на 48,85 % и 67,8 % соответственно.

Таким образом, результаты исследования показали более высокое содержание экзополисахаридов у *S. subsalsa* PCC 9445, в сравнении с *A. platensis* PCC 9223. Также были выявлены значительные различия между исследуемыми видами цианей, особенно после длительной (1 год) криоконсервации (табл. 1.).

Так после ре-культивирования в течение 7 дней, штамм *S. subsalsa* PCC 9445 имел меньший процент снижения содержания экзополисахаридов, что может быть объяснено видовыми особенностями.

Было показано, что выращивание цианей сразу после оттаивания на питательной среде в присутствии криопротектора глюкозы (10 %) помогает клеткам этого штамма быстрее восстанавливаться после криоконсервирования.

Следует отметить, что содержание экзополисахаридов у цианей после ре-культивирования в течение 30 дней восстанавливалось до уровня исходной культуры.

Состав экзополисахаридов цианей после криоконсервации. С целью химической характеристики экзополисахаридов определяли содержание ацетила и пирувата у исходных культур и ре-культивированных цианей *S. subsalsa* PCC 9445 и *A. platensis* PCC 9223, которые были криоконсервированы в присутствии 10 %-ных растворов ДМСО и глюкозы в течение 1 года (табл. 2.).

Таблица 2 – Процентное содержание ацетатных и пируватных остатков в экзополисахаридах цианей *A. platensis* PCC 9223 и *S. subsalsa* PCC 9445 после криоконсервации в течение 1 года

Штамм	Соединения	Исходная культура	Криопротекторы в концентрации 10 %	
			ДМСО	Глюкоза
S. subsalsa PCC 9445	Ацетил	3,2 ± 0,02	3,10 ± 0,01	3,40 ± 0,04
	Пируват	3,0 ± 0,01	4,01 ± 0,02	4,20 ± 0,02
A. platensis PCC 9223	Ацетил	2,37 ± 0,01	2,34 ± 0,01	2,34 ± 0,03
	Пируват	2,43 ± 0,01	2,61 ± 0,01	2,60 ± 0,01

Было определено содержание ацетатных и пируватных остатков в выделенных экзополисахаридах цианеи *S. subsalsa* PCC 9445, которое составило 3,2 и 3,0 % соответственно от суммарного количества экзополисахаридов. Было показано, что аналогично уроновым кислотам, содержание ацетатных и пируватных остатков в экзополисахаридах *S. subsalsa* PCC 9445 несколько выше (на 0,63 % и 0,57 % соответственно), чем у цианеи *A. platensis* PCC 9223. В тоже время результаты исследования показали, что у *S. subsalsa* PCC 9445 после криоконсервации в присутствии 10 %-ной глюкозы содержание ацетила повышалось на 6,26 %, а пирувата на 40 % в то время как присутствии 10 %-ного ДМСО содержание ацетила снижалось на 3,13 %, а пирувата повышалось на 33,67 %. В тоже время у *A. platensis* PCC 9223 после криоконсервации в присутствии 10 %-ной глюкозы понижалось содержание ацетила на 1,26 %, а пирувата повышалось на 7,4 %. В присутствии 10 %-ного ДМСО содержание ацетила также снижалось на 1,26 %, а пирувата повышалось на 6,99 %.

Как следует из табл. 2, содержание ацетильных групп у цианей после криоконсервации сохранялось на уровне исходной культуры. В тоже время количество пируватных групп в независимости от используемого криопротектора превышало значение исходных культур.

Содержание уроновых кислот. Ранее было показано, что в составе экзополисахаридов цианей, в том числе и *Arthrospira* sp., часто присутствуют уроновые кислоты (Moore, Tischer, 1964; Bertocchi et al., 1990; Filali Mouhim et al., 1993; Gloaguen et al., 1995), играющие важное значение в определении свойств экзополисахаридов (De Philippis et al., 2001; Friedrich, 2013). Также было показано, что присутствие в составе экзополисахаридов ацетильных и пировиноградных групп играют важную роль в определении некоторых физико-химических свойств экзополисахаридов цианей. Например, из-за липофильных фрагментов, таких как ацетильные группы, у экзополисахаридов присутствует эмульгирующие свойства. А в дополнение к уроновым кислотам анионный характер экзополисахаридов часто усиливается пируватными группами (De Philippis et al., 2001; Friedrich, 2013). Однако присутствие уроновых кислот, а также ацетильных и пировиноградных групп в составе экзополисахаридов достаточно редко определяется при характеристике цианей (Bertocchi et al., 1990). Данные показатели и ранее никогда не исследовалось у *S. subsalsa*, а также для цианей при ре-культивирования после длительной (1 год) криоконсервации.

Содержание уроновых кислот исследовали у исходных культур цианей цианей *S. subsalsa* PCC 9445 и *A. platensis* PCC 9223, а также ре-культивированных после криоконсервации в течение разного периода (1 месяц, полгода и 1 год) и с использованием в роли криопротектора глюкозы и ДМСО в концентрациях 10 и 15 % (табл. 1.).

Было определено, что содержание уроновых кислот в выделенных экзополисахаридах цианеи *S. subsalsa* PCC 9445 составляет 24,1 % от суммарного количества экзополисахаридов. Как и в случае общего содержания экзополисахаридов, содержание уроновых кислот у штамма *S. subsalsa* PCC 9445 в среднем 2,6 % выше, чем у *A. platensis* PCC 9223 (табл 1.).

После краткосрочной криоконсервации цианей 10 %-ными растворами ДМСО и глюкозы содержание уроновых кислот сохранялось на уровне исходной культуры (табл. 1.). Но при более длительной криоконсервации содержание уроновых кислот снижалось для обоих штаммов, причем более значительно в случае использовании 15 %-ной концентрации криопротекторов.

Результаты исследования показали, что у *S. subsalsa* PCC 9445 после полгода и 1 года криоконсервирования в присутствии 10 %-ной глюкозы содержание уроновых кислот снижалось на 13,69 % и 27,7 % соответственно. Аналогично у *A. platensis* PCC 9223 после полугода и 1 года криоконсервирования в присутствии 10 %-ной глюкозы содержание уроновых кислот снижалось на 8,75 % и 29,1 % соответственно. При использовании в качестве криопротектора 10 %-ного ДМСО содержание уроновых кислот у обоих штаммов цианей было значительно меньшим и снижалось на 27,38 % и 24 % (*S. subsalsa*) и на 26,26 % и 25,3 % при криоконсервации в течение полугода и 1 года соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, впервые было определено содержание синтезируемых экзополисахаридов у *S. subsalsa* PCC 9445, а также содержание в них уроновых кислот и ацетатных и пируватных остатков. Было показано, что по этим показателям *S. subsalsa* PCC 9445 превосходят штамм PCC 9223 *A. platensis*. Также полученные результаты исследования свидетельствуют о восстановление биосинтетической активности в ре-культивированной культуре цианей *S. subsalsa* PCC 9445 и *A. platensis* PCC 9223 после криоконсервации. Соотношение в содержании уроновых кислот, ацетильных и пируватных групп свидетельствует об отсутствии каких-либо нарушений состава синтезируемых экзополисахаридов.

ЛИТЕРАТУРА

Петрухина Д.И., Лыков И.Н. 2016. Исследование эффективности сохранения цианобактерии *Spirulina subsalsa* после криоконсервации при -80 °С в присутствии глюкозы // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. Т. 6. № 4. С. 68–73.

Bertocchi C., Navarini L., Ceshro A. 1990. Polysaccharides from Cyanobacteria // Carbohydrate Polymers. V. 12. P. 127–153.

Blumenkrantz N., Asboe-Hansen G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids // Analytical Biochemistry. V. 54. № 2. P. 484–489.

De Philippis R., Sili C., Paperi R., Vincenzini M. 2001. Exopolysaccharide-producing cyanobacteria and their possible exploitation: a review // Journal of Applied Phycology. V. 13. P. 293–299.

Filali-Mouhim R., Cornet J.F., Fontaine T., Fournet B., Dubertret G. 1993. Production, isolation and preliminary characterization of the exopolysaccharide of the cyanobacterium *Spirulina platensis* // Biotechnology Letters. V. 15. № 6. P. 567–572.

Friedrich E.M. 2013. Charakterisierung und biologische Testung cyanobakterieller Exopolysaccharide von *Arthrospira platensis, Gloeothece membranacea* und *Phormidium* spec. PhD Thesis. Kiel: Christian-Albrechts-Universität. 140 p.

Gloaguen V., Wieruszeski J.M., Strecker G., Hoffmann L., Morvan H. 1995. Identification by NMR spectroscopy of oligosaccharides obtained by acidolysis of the capsular polysaccharides of a thermal biomass // International Journal of Biological Macromolecules. V. 17. P. 387–393.

Hubálek Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms // Cryobiology. V. 46. № 3. P. 205–229.

McComb E.A., McCready R.M. 1957. Determination of acetyl in pectin and in acetylated carbohydrate polymers. Hydroxamic acid reaction // Analytical Chemistry. V. 29. P. 819–821.

Moore B.G., Tischer R.G. 1964. Extracellular Polysaccharides of Algae: Effects on Life-Support Systems // Science. V. 145. № 3632. P. 586–587.

Motham M., Peerapornpisal Y., Tongsriri S., Pumas Ch., Vacharapiyasophon P. 2012. High Subzero Temperature Preservation of *Spirulina platensis (Arthrospira fusiformis)* and Its Ultrastucture // Chiang Mai Journal of Science. V. 39. № 4. P. 554–561.

Muhling M. 2000. Characterization of *Arthrospira (Spirulina)* strains. PhD Thesis. Durham: Durham University. 308 p.

Nicolaus B., Panico A., Lama L., Romano I., Manca M.C., De Giulio A., Gambacorta A. 1999. Chemical composition and production of exopolysaccharides from representative members of heterocystous and non-heterocystous cyanobacteria // Phytochemistry. V. 52. P. 639–647.

Nwodo U.U., Green E., Okoh A.I. 2012. Bacterial Exopolysaccharides: Functionality and Prospects // International Journal of Molecular Sciences. V. 13 № 11. P. 14002–14015.

Sloneker J.H., Orentas D.G. 1962. Pyruvic acid, a unique component of an exocellular bacterial polysaccharide // Nature. V. 194. P. 478–479.

Takano M., Sado J.I., Ogawa T., Terui G. 1973. Freezing and Freeze-Drying of *Spirulina platensis* // Cryobiology. V. 10. № 5. P. 440–444.

УДК 66.047

СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОДЛИННОСТИ И СОДЕРЖАНИЯ ОСТАТОЧНОЙ ВЛАЖНОСТИ В ВАКЦИНАХ МЕТОДОМ БИК-СПЕКТРОСКОПИИ

А.Ю. Хрущев, Ю.С. Ходькова, Т.Н. Лихих, С.В. Антонова, В.О. Бондаренко

Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов, Москва, Россия

Остаточное содержание влаги оказывает значительное влияние на стабильность биофармацевтических препаратов, в том числе, вакцин. Вода играет ключевую роль в конформационном и химическом состоянии белка, поэтому точное определение влажности имеет важное значение для решения вопросов стабильности [1]. Неустойчивость вакцин в водных растворах обусловлена различными химическими и физическими процессами. Во многих случаях удаление воды путем лиофилизации может значительно уменьшить разложение вакцин, однако необходимо контролировать содержание остаточной влажности [2]. Спектроскопия ближнего инфракрасного диапазона (БИК-спектроскопия) является быстрым, простым в использовании и достоверным инструментом контроля качества лекарственных средств. Важным отличием ее от классических методов анализа является практически полное отсутствие пробоподготовки и необходимости в использовании расходных материалах и химических реактивов [3–5]. В данной работе предложен способ определения остаточной влажности лиофилизированных вакцин, предназначенных для ветеринарного применения методом спектроскопии в ближнем инфракрасном диапазоне без вскрытия товарной упаковки. В отличие от предложенного ранее метода определения остаточной влажности вакцин с помощью БИК-спектроскопии [6,7] в данной работе показано, что для построения единой калибровочной модели для количественного определения возможно использование образцов разных торговых наименований. Таким образом был создан универсальный расчетный метод для 24 наименований вакцин. Работа заключалась в последовательном выполнении следующих этапов: 1) Анализ остаточной влажности образцов вакцин титрованием по методу К. Фишера; 2) Регистрация БИК-спектров образцов проверенной серии препарата через стеклянную стенку флакона; 3) Построение калибровочной модели с использованием хемометрических алгоритмов; 4) Проверка

модели на тестовых образцах, коррекция. В рамках данной работы был разработан способ определения подлинности вакцин, основанный на дискриминантном анализе по БИК-спектрам образцов (см. Рис. 1). Этот метод позволяет провести предварительную классификацию неизвестных образцов, что повышает достоверность результатов последующего количественного анализа.

Для построения калибровочной модели, учитывающей высокую изменчивость образцов вследствие индивидуальных спектральных характеристик, был использован метод многомерной калибровки основанный на методе главных компонент – PLS (метод проекции на латентные структуры). Проверка калибровочной модели была проведена методом перекрестной валидации (Cross-validation), а также с использованием проверочных образцов вакцин с известным содержанием воды. Для образцов, содержащих воду в количестве 20–50 мг/г ошибка определения составляет не более 5 % относительно результатов, полученных по аттестационному методу (титрование по методу К. Фишера). Доказательством применимости построенной калибровочной модели является также близость значений ошибки калибровки (RMSEC = 0,206) и проверки (RMSEP = 0,207), а также значение коэффициента корреляции калибровки – 0.9853 (см. рис. 2)

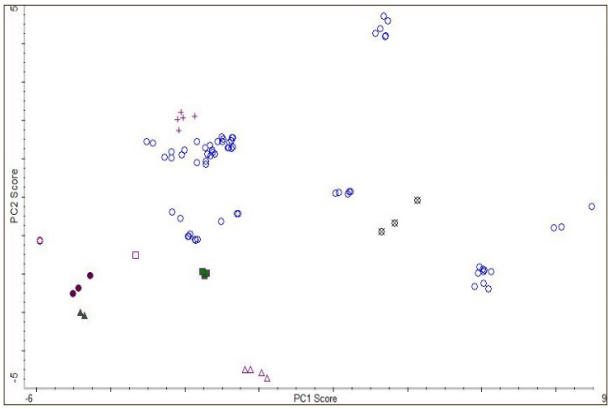


Рисунок 1. График счетов в координатах двух первых главных компонет БИК-спектров образцов вакцин

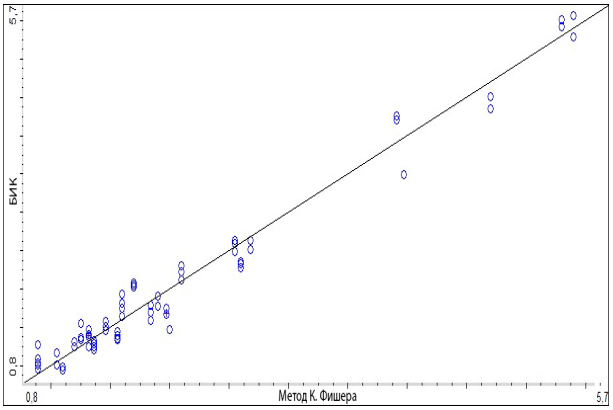


Рисунок 2. График корреляции результатов содержания остаточной воды полученных методом К. Фишера и БИК-спектроскопии

Разработанный способ позволяет значительно сократить время на проведение анализа по установлению подлинности и определению остаточной влажности вакцин. Данный подход также позволяет существенно снизить финансовые затраты, ввиду отсутствия необходимости в использовании реактивов при проведении испытаний методом БИК-спектроскопии, что также снижает степень загрязнения окружающей среды. Кроме этого разработанный способ относится к неразрушающим методам анализа, что предоставляет возможность вернуть выдерживающие испытание препараты на рынок лекарственных средств после проведения анализа.

ЛИТЕРАТУРА

Jason Rexroad, Christopher M. Wiethoff, Latoya S. Jones, and C. Russell Middaugh, Lyophilization and the Thermostability of Vaccines, Cell preservation technology. Volume 1, Number 2, 2002.

Moisture content in proteins: its effects and measurement, John K. Towns, Journal of chromatography A, 705 (1995) 115–127.

Д.А. Верескун, О.Е. Родионова, А.В. Титова. Изучение возможности использования БИК-спектроскопии в анализе таблеток комбинированного противомикробного препарата. Вестник Росздравнадзора № 2–2016: 62–66.

Арзамасцев А.П., Садчикова Н.П., Титова А.В. Метод ближней ИК-спектроскопии в системе контроля качества лекарственных средств (обзор). Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии, 2010, 1: 63–67.

Roggo Y, Chalus P, Lene Maurer L, Lema-Martinez C, Edmond CA, Jent N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. J. Pharm. Biomed. Anal., 2007, 44: 683–700.

Yiwu Zheng, Xuxin Lai, Susanne Wrang Bruun, Henrik Ipsen, Jorgen Nedergaard Larsen, Henning Lowenstein, Ib Søndergaard, Susanne Jacobsen. Determination of moisture content of lyophilized allergen vaccines by NIR spectroscopy. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 46 (2008) 592–596.

L. Sukowski. NIR-based process analytical technology: In-line residualmoisture determination for a complete batch inspection of lyophilized end-products, PhD. Thesis, University of Basel, Deutschland, 2003.

УДК 663.1, 664

ВЛИЯНИЕ ПРИРОДНОГО САХАРОЗАМЕНИТЕЛЯ НА АКТИВНОСТЬ ХЛЕБОПЕКАРНЫХ ПРЕССОВАННЫХ ДРОЖЖЕЙ И ПРОЦЕСС СОЗРЕВАНИЯ ПОЛУФАБРИКАТА

С.В. Борисова, З.Ш. Мингалеева, А.И. Биктагирова, О.А. Решетник, О.В. Старовойтова

Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, Россия

В последнее время широкое распространение получает мучная продукция лечебно-профилактичекого назначения. Большое внимание уделяется обогащению продукции полезными веществами и микронутриентами, придающими продукции лечебные и профилактические свойства. Лечебный и профилактический эффект от употребления диетических хлебобулочных и мучных кондитерских изделий обеспечивается либо введением в рецептуру необходимых дополнительных компонентов, либо исключением нежелательных или изменением технологии их приготовления [1].

В связи с неблагоприятной экологической ситуацией, сложившейся в России большое внимание уделяется производству продукции, имеющей повышенные функциональные показатели, с учетом физиологических особенностей и потребностей населения различных групп.

Немаловажным направлением в формировании ассортимента и улучшения качества мучных изделий является их производство с уменьшенным содержанием сахара белого или без него, а также производство продукции для группы населения с заболеванием поджелудочной железы, что предполагает использование сахарозаменителей [2].

В настоящее время используют широкий спектр сахарозаменителей, таких как сахаринаты, цикломаты, сукралоза, ксилит, сорбит, аспартам, мальтит, экстракт солодкового корня и.т. п. Следует отметить, что действие большинства синтетических сахарозаменителей на организм человека до конца не изучено, большинство из них являются условно съедобными, хотя в целом они не являются источниками энергии [3].

Природные сахарозаменители предпочтительнее в использовании, не смотря на то, что большие из них обладают энергетической ценностью. Однако важно обращать внимание на значение гликемического индекса используемого сахарозаменителя [4]. В этом отношении перспективным сахарозаменителем является нектар голубой агавы.

Сахароза – основное вещество сахара белого – создает высокое осмотическое давление, что негативно отражается на жизнеспособности хлебопекарных дрожжей, используемых в качестве биологического разрыхлителя при приготовлении теста, поэтому при замене сахара белого на природный сахарозаменитель нектар голубой агавы представляет интерес исследовать его влияние на бродильную активность хлебопекарных прессованных дрожжей «Люкс» и процесс созревания полуфабриката.

Важным показателем эффективности процесса брожения полуфабриката являются качественные характеристики прессованных дрожжей, такие как подъемная сила, бродильная активность и осмочувствительность. Подъемную силу определяли экспресс методом «всплывающего шарика» [5].

Были исследованы образцы теста, замешанные без сахара белого (контрольные), с сахаром белым и 25, 50, 75 и 100 % заменой сахара белого на нектар голубой агавы. Результаты исследований приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Влияние нектара голубой агавы на подъемную силу полуфабриката

Концентрация нектара голубой агавы, %	Подъемная сила, мин
Контроль	26 ± 1
0	38 ± 1
25	38 ± 1
50	34 ± 1
75	20 ± 1
100	20 ± 1

Как видно из таблицы 1, просматривается тенденция сокращения показателя подъемной силы с уменьшением концентрации сахара белого в образцах полуфабриката. Обращает на себя внимание тот факт, что образцы с заменой сахара белого на нектар голубой агавы в концентрации 75 и 100 % имели значения показателя подъемной силы меньшие, чем образцы полуфабрикатов, замешанные без добавления сахаристых веществ. Такая зависимость может быть связана с составом нектата голубой агавы, в котором помимо водорастворимых углеводов, содержатся ионы магния, которые могут стимулировать фруктозо-бифосфатный путь расщепления гексоз [6].

В целом, при оценке бродильной активности прессованных дрожжей пользуются двумя показателями – мальтазной и зимазной активностью, которые характеризуют период сбраживания растворов мальтозы и сахарозы (глюкозы или фруктозы) в концентрации 10 %.

Поскольку нектар голубой агавы представляет собой смесь соединений, содержащую гексозы и олигосахариды, большую часть из которых представляют дисахариды, то имеет смысл определять общую бродильную активность, т. е. время, за которое выделится 10 мл углекислого газа при сбраживании прессованными дрожжами 10 г. нектара голубой агавы.

В таблице 2 представлены данные по влиянию нектара голубой агавы на бродильную активность хлебопекарных прессованных дрожжей, которую определяли, используя стандартную методику [5].

Таблица 2 – Бродильная активность прессованных дрожжей

Тип ферментативной активности	Значение, мин
Зимазная активность	41 ± 1
Мальтазная активность	141 ± 1
Бродильная активность	108 ± 1

Данные таблицы 2 свидетельсвуют о том, что бродильная активность дрожжей в присутствии нектара голубой агавы выше зимазной на 67 мин, но ниже мальтазной активности на 33 мин. В целом процесс брожения дрожжей в присутствии нектара голубой агавы интенсифицировался.

Осмочувствительность – это показатель, характеризующий отношение прессованных дрожжей к осмолитикам, в основном к содержанию поваренной соли и высоким концентрациям сахаров.

Исследования проводили следующим образом. Замешивали образцы теста в соответствии со стандартной методикой [5] без поваренной соли, с поваренной солью и образцы теста с нектаром голубой агавы и с поваренной солью и нектаром голубой агавы. Определяли период времени, за который выделялось 10 мл углекислого газа. Результаты приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Способность прессованными дрожжами сбраживать сахара муки в тесте в присутствии осмолитиков

Тип образца теста	Значение, мин
Образец, замешанный с поваренной солью	50 ± 1
Образец, замешанный без поваренной соли	38 ± 1
Образец, замешанный с поваренной солью и нектаром голубой агавы	48 ± 1
Образец, замешанный без поваренной соли, с нектаром голубой агавы	33 ± 1

Как видно из таблицы 3, и поваренная соль и нектар голубой агавы угнетали процесс сбраживания сахаров муки в тесте. Однако осмочувствительность прессованных дрожжей к поваренной соли составила 12 мин, а к нектару голубой агавы – 5 мин. Следователь прессованные дрожжи проявляют большую чувствительность к поваренной соли, чем к нектару голубой агавы.

Известно, что осмолитики, особенно поваренная соль, существенно влияют на количество свободной влаги в среде. Так, рост дрожжей-сахаромицетов уже при небольших концентрациях поваренной соли сильно угнетался, т. к. в этих условиях дрожжи не способны вырабатывать достатьчного количества АТФ, необходимого для осуществления активного транспорта питательных веществ внутрь клеток дрожжей [7].

В образцах теста, замешанных с поваренной солью и нектаром голубой, 10 мл углекислого газа выделялось на 17 мин быстрее, чем в отсутствии нектара голубой агавы, хотя, казалось бы, этот период должен был бы увеличиться по времени. Видимо, присутствие сахаров в нектаре голубой агавы

позволяет нейтрализовать недостаток воды, ощущаемый дрожжами в присутствии поваренной соли – как результат – бородильная активность дрожжей возрастает. Об этом можно судить по результатам, полученным при оценке бродильной активности дрожжей в тесте, замешанном только из муки и воды, но и с добавлением поваренной соли и нектара голубой агавы.

Результаты по динамике кислотонакопления образцов теста представлены на рисунке 1.

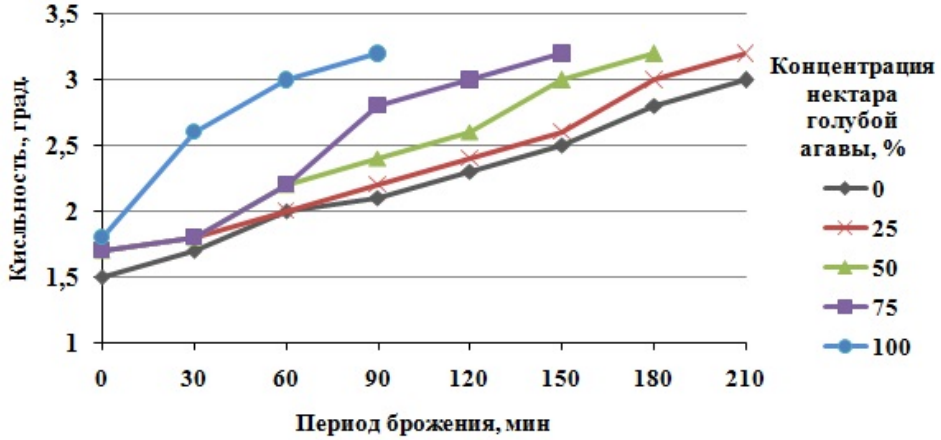


Рисунок 1 – Динамика кислотонакопления теста в присутствии нектара голубой агавы

Как видно из рисунка 1, предельное значение кислотности 3,0 град. контрольный образец, приготовленный по традиционной рецептуре, достигал в течение 210-минутного периода брожения. При замене сахара белого на нектар голубой агавы в количестве 25, 50, 75 и 100 % требуемое значение кислотности достигалось за 180, 150, 120 и 60 мин, соответственно. В целом с увеличением концентрации нектара голубой агавы в полуфабрикате процесс кислотонакопления теста заметно сокращался.

Существенное сокращение процесса созревания теста, особенно у образцов с 75 и 100 % концентрацией нектара голубой агавы, возможно, связано с повышенным, в сравнении с сахарами муки, содержанием свободных глюкозы и фруктозы. Глюкоза активно сбраживается дрожжами теста, что сопровождается интенсивным кислотонакоплением.

Таким образом, использование нектара голубой агавы приводит к интенсификации брожения полуфабриката, понижению показателя осмочувствительности и повышению бродильной активности хлебопекарных прессованных дрожжей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Скорик, А.В. Пищевая индустрия / А.В. Скорик // Индустрия хлебопечения. – 2012. – № 2. – С. 27–28.

2. Поландова, Р.Д. ГосНИИ хлебопекарной промышленности / Р.Д. Поландова // Хлебопечение России. – 2002. – № 3. – С. 5–8.

3. Люк, Э. Консерванты в пищевой промышленности / Э. Люк, М. Ягер. – СПб.: Гиорд, 2000. – 256 с.

4. Амен, Д. Мозг против лишнего веса / Д. Амен. – М.: Эскмо, 2012. – 77 с.

5. Б Биология и генетика дрожжей: учебно-методическое пособие / С.В. Борисова [и др.]. – Казань: КНИТУ, 2011. – 108 с.

6. Биохимия: учебник / под ред. Е.С. Северина. -5-е изд., испр. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. – 768 с.

7. Квасников, Е.И. Дрожжи: Биология. Пути использования / Е.И. Квасников, И.Ф. Щелокова. – Киев: Наукова думка, 1991. – 322 с.

УДК 601.4

СОЗДАНИЕ СОВРЕМЕННОЙ ТЕХНОЛОГИИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ СОРТОВ И ФОРМ ВИНОГРАДА НА ОСНОВЕ МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО АНАЛИЗА

А.В. Секридова[1], О.П. Малюченко[1], А.Г. Прилипов[2], Е.Н. Кислин[3], И.А. Шилов[1]

[1] Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия

[2] Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

[3] Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Виноград – одна из древнейших и значимых сельскохозяйственных культур, неизменно сопутствующая человечеству на всем протяжении его исторического развития. Одним из важных и необходимых этапов селекции винограда является точная идентификация сортов и диких форм. Традиционно отнесение образца к тому или иному сорту (форме) осуществлялась ампелографически (описательно) с помощью большого числа биоморфологических признаков. Часто встречающиеся ампелографические ошибки связаны как с субъективностью человеческой оценки, так и с варьированием оцениваемых признаков не только в зависимости от принадлежности растения к сорту (форме), но и от факторов среды произрастания, возраста растения и его физиологического состояния. Молекулярно-генетическая идентификация с помощью микросателлитного анализа является современным, точным, хорошо стандартизируемым и имеющим высокую дифференцирующую способность методом. Создание удобной технологии на основе данного метода актуально для селекционной работы по выбору кандидатов для скрещивания, оценки посадочного материала при закладке виноградников, оценки подвойных и привойных сортов, определения генетической дистанции и происхождения различных сортов и форм винограда, а также для сертификации и защиты авторских прав.

В настоящее время набор из 9-ти микросателлитных маркеров (VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVMD28, VVMD25, VVMD32, VrZAG62, VrZAG79) признан большинством исследователей как наиболее удобный для генетической идентификации европейских сортов и форм винограда [1, 2]. Было установлено, что данные маркерные локусы обладают высоким уровнем аллельного полиморфизма (PIC) и разрешающей способности (PD = 0.92 ÷ 0,96) [3]. Однако, их использование имеет существенные ограничения, связанные с ди-нуклеотидной природой повторов. Большому количеству детектируемых аллелей по каждому локусу сопутствует близкое расположение соответствующих им пиков в получаемых генетических профилях. Таким образом вероятность ошибки при необходимости дифференцировки двух соседних аллелей, отличающихся на два нуклеотида, является чрезвычайно высокой [4].

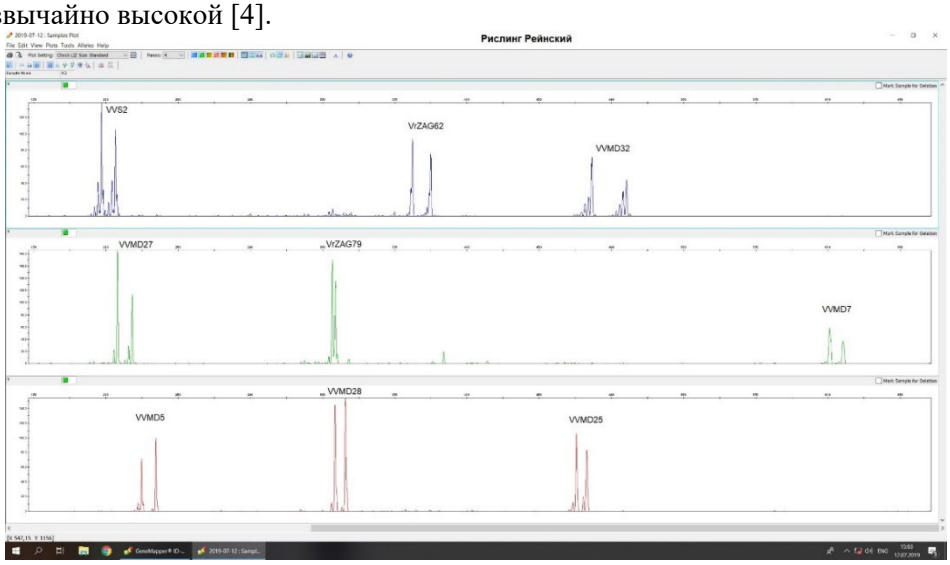


Рисунок 1

Разрабатываемая нами технология генотипирования сортов и форм винограда основана на применении 9-ти указанных микросателлитных маркерах. Была отработана методика выделения ДНК из виноградных листьев. Количество и чистота получаемой ДНК воспроизводимо отвечали технологическим требованиям. В связи с необходимостью упрощения работы с большим количеством селекционного материала, нуждающегося в генетической идентификации, нами была создана мультиплексная PCR-система для единовременного получения фрагментов по всем 9-ти локусам в одной пробирке. Определение длин получаемых фрагментов осуществляли методом электрофореза с помощью автоматического генетического анализатора Applied Biosystems® 3130. Электрофорез по всем используемым локусам проводили в одном капилляре, что существенно уменьшает затраты необходимых реактивов. В качестве референса длин использовали коммерчески доступный стандарт LIZ600. Для предотвращения ошибок, вызванных возможным отличием профилей по каждому локусу на два нуклеотида, и увеличения точности системы разрабатывался дополнительный стандарт длин – аллельная лестница. Получали индивидуальные генетические профили следующего вида. (*Рис. 1*.)

Таким образом, нами была разработана вся технологическая цепочка идентификации сортов и форм винограда на основе микросателлитного анализа. Результат нашей работы направлен на усовершенствование селекционного процесса, а также имеет значение для фундаментальных генетических исследований и практических задач виноградарства.

ЛИТЕРАТУРА

1. This P., Jung A., Boccacci P., Borrego J., Botta R., Costantini L., et al. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars // Theoretical and Applied Genetics. 2004. V. 109. P. 1448–1458.

2. Malenica N., Šimon S., Besendorfer V., Maletić E., Kontić J.K., Pejić I. Whole genome amplification and microsatellite genotyping of herbarium DNA revealed the identity of an ancient grapevine cultivar // Naturwissenschaften. 2011. V. 98. P. 763–772.

3. Jakše J., Štajner N., Tomić L. and Javornik B. Application of Microsatellite Markers in Grapevine and Olives. // The Mediterranean Genetic Code – Grapevine and Olive. Croatia: INTECH. 2013. P. 27–50.

4. Cipriani G., Marrazzo M.T., Di Gaspero G., Pfeiffer A., Morgante M. and Testolin R. A set of microsatellite markers with long core repeat optimized for grape (Vitis spp.) genotyping // BMC Plant Biology [Open access]. 2008. V. 8:127. Available from: http://www.biomedcentral.com/1471–2229/8/127.

УДК 663/66

ВЛИЯНИЕ ФП ЦЕЛЛОЛЮКС-А НА ВЫХОД СБРАЖИВАЕМЫХ УГЛЕВОДОВ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ЭТАНОЛА ИЗ ЯЧМЕНЯ

А.Н. Яковлев[1], Г.В. Агафонов[1], Т.С. Ковалева[1], С.Ф. Яковлева[1], Т.Н. Тертычная[2]

[1] Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия
[2] Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I, г. Воронеж, Россия

При производстве этанола из ячменя трудность заключается в высоком содержании гемицеллюлоз. Гемицеллюлозы ячменя способны к быстрому неограниченному набуханию, что влияет на вязкость промежуточных продуктов производства алкоголя. Использование дополнительных ферментных препаратов значительно увеличивает степень гидролиза растительного сырьядо сбраживаемых дрожжами углеводов, сокращает сроки брожения, значительно улучшает показатели готовой бражки и конечного продукта.

Сырьём является очищенный ячмень с крахмалистостью 52 и влажносью 14,5 %. При проведении водно-тепловой и ферментативной обработки замеса использовали ферментные препараты Ликвафло – препарат, содержащий бактериальную термостабильную α-амилазу, произведенный генетически модифицированным штаммом микроорганизма *Bacillus licheniformis* и ЦеллоЛюкс – А, источник β-глюканазы, ксиланазы и целлюлазы.

Готовили замес с гидромодулем 1:3. В предварительно взвешенную коническую колбу на 1 дм^3 поместили 100 г. измельченного сырья, добавили 300 мл воды температурой 60–65 и внесли рассчитанное количество ферментных препаратов Ликвафло в дозировке 0,30 ед. АС/г и ЦеллоЛюкс-А в дозировке 0,35 ед. ЦС/г. Тщательно перемешивали замес в течение 30 мин при температуре 50–55°С.

Водно-тепловую обработку проводили в 3 этапа:

Таблица 1 – Этапы водно-тепловой обработки

№ этапа	Температура, °С	Время, мин
1	50–55	20
2	60–65	40
3	70–75	60

Использование на стадии водно-тепловой обработки ферментного препарата ЦеллоЛюкс – А снижает вязкость ячменного замеса, что позволяет снизить расход амилолитического ферментного препарата в два раза, ускорить процесс водно-тепловой подготовки, снизить расход теплоэнергоресурсов, увеличить выход конечного продукта.

Осахаривание сусла проводится с целью получения сбраживаемых углеводов. Осахаривание зернового сырья необходимо, поскольку основные производственные расы спиртовых дрожжей не синтезируют амилолитические ферменты и не могут использовать крахмал в своем метаболизме, а усваивают только моносахариды и дисахариды.

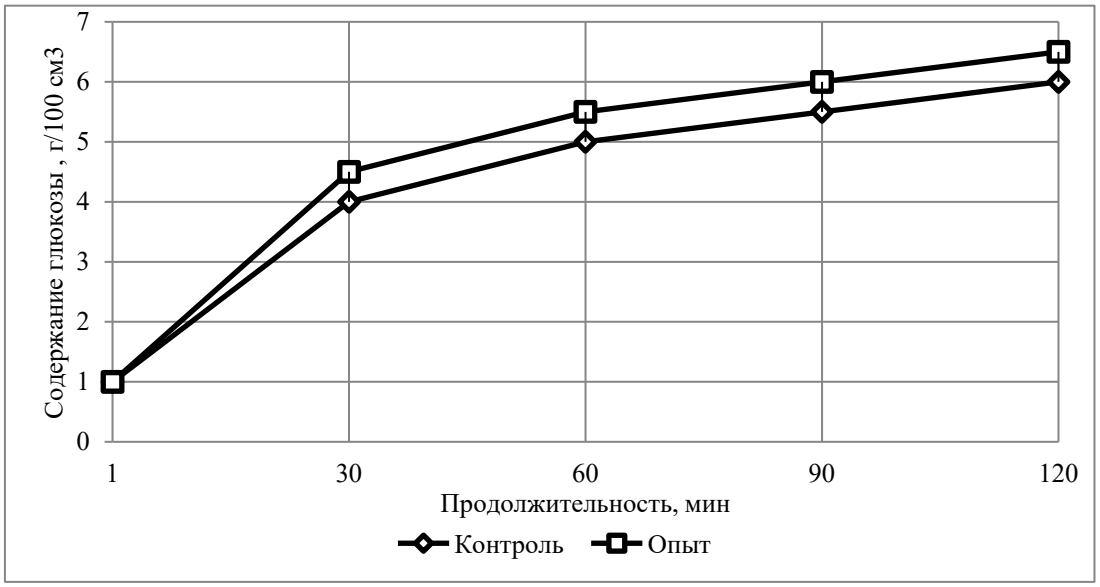


Рис. 1-Динамика накопления глюкозы в процессе осахаривания

Для осахаривания, в охлажденную до 50–60°С разваренную массу, внесли ферментные препараты: Сахзайм PLUS 2X в количестве 0,50 ед. ГлС на г крахмала, Ликвафло с дозировкой 0,30 ед. АС / г и 0,35 ед. ЦС/г ЦеллоЛюкс-А. Контролем являлась разваренная масса, полученная без внесения комплексного ферментного препарата. Осахаривание протекало при температуре 60˚С и pH = 4,5 в течение 120 мин. pH разваренной массы регулировали добавлением в нее серной кислоты. В процессе осахаривания изучали динамику накопления глюкозы в ячменном сусле. Пробы для определения глюкозы отбирали каждые 30 минут.

В опыте, при использование мультиэнзимного комплекса, включающего Ликвафло, Сахзайм PLUS 2X и ЦеллоЛюкс-А, происходит увеличение количества глюкозы на 0,5 % на г крахмала, по сравнению с контролем, потому что происходит гидролиз белковых веществ и гемицеллюлозы, следовательно, крахмал становится более доступным для действия осахаривающих ферментов и степень его гидролиза увеличивается.

УДК 577.124:577.125.3

ВЫРАЩИВАНИЕ ВЫСШЕГО ГРИБА *FLAMMULINA VELUTIPES* В ДВОЙНОЙ КУЛЬТУРЕ С *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*

О.М. Цивилева, А.Н. Шатерников, В.Е. Никитина

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

Мир высших грибов очень разнообразен с точки зрения практического использования, но многовековой опыт некоторых стран по культивированию грибных культур четко ориентирует на промышленное производство ряда наиболее ценных в этом плане базидиомицетов. Представители этого класса высших грибов интересуют битехнологов не только в качестве источника ценных пищевых ингредиентов [1; 2], но и как основа для получения высокоэффективных лекарственных препаратов [3]. Достаточно давно проводятся оказавшиеся перспективными биомедицинские исследования субстанций из ксилотрофных грибов – представителей рода Flammulina [4], в особенности из Flammulina velutipes (Curtis, 1777: Fries, 1821) Singer, 1951 (опенок зимний, зимний гриб) [5, 6]. Иммуномодулирующий белок фламмулин с общепринятой аббревиатурой Fve [7], выделенный из F. velutipes, – полипептид, нековалентно-связанный гомодимер [8]. Считается, что этот белок с лектиновой активностью является триггером митогенной пролиферации Т-лимфоцитов и Th1 цитокиновой продукции, супрессором системных анафилактических реакций [9]. До настоящего времени продолжаются научные изыскания в интересах создания препаратов ветеринарного и медицинского назначения из этого гриба [10, 11].

Поэтому остаются актуальными исследования возможной оптимизации искусственного культивирования фламмулины Биологические способы стимуляции роста мицелия позволили бы улучшить технологию выращивания, сократив время культивирования грибов и одновременно подавив рост контаминирующей микрофлоры. Одним из таких способов может стать выращивание базидиомицета в двойной культуре со стимулирующими рост бактериями, например, представителями условной несистематической группы «Plant growth promoting rhizobacteria» (PGPR), то есть ризобактериями, способствующими росту растений [напр., 12]. Бактерии рода *Azospirillum* – PGPR, грамотрицательные микроаэрофильные бактерии – вступают в ассоциации со многими растениями, в том числе и из умеренных климатических зон, и хорошо известны своими фитостимулирующими свойствами [напр., 13].

Важно выявление и исследование ростостимулирующих свойств разных штаммов азоспирилл в отношении съедобных и / или лекарственных высших грибов, а также свойств, стимулирующих подавление контаминантной микрофлоры в двойной культуре.

Системное изучение совместного культивирования базидиомицетов с бактериями рода *Azospirillum* в искусственных условиях в литературе не было описано до начала исследований в лаборатории микробиологии ИБФРМ РАН в связи с двойной культурой *Lentinula edodes* с *Azospirillum brasilense* Sp7 [14, 15]. Было изучено влияние *A. brasilense* Sp7 на рост и морфологические особенности *L. edodes* F-249 [16, 17], однако причины активизации развития мицелия оставались не выявлены. Необходим также поиск наиболее эффективного штамма азоспирилл в отношении грибов разных систематических групп. Задачи такого рода поставлены в наших продолжающихся исследованиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили: базидиомицет *Flammulina velutipes* 0535 (коллекция кафедры микологии и альгологии Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (г. Москва)), бактерии *A. brasilense* Sp245 и *A. brasilense* SR80 (Специализированная научная коллекция ИБФРМ РАН (WFCC номер 975, WDCM номер 1021) (СМ IBPPM)). Культуры гриба поддерживали на агаризованном пивном сусле (4 град по Баллингу) в темноте, бактерий – на питательных средах, рекомендуемых СМ IBPPM.

Для выращивания культур использовали среды состава, описанного в табл. 1. Плотные среды получали, добавляя в питательные растворы 1,8–2 % (*m/v*) агара.

Таблица 1. Состав сред ко-культивирования *Flammulina velutipes* и *Azospirillum brasilense*

Условное обозначение	Состав, г/л
(**I**)	Сусло пивное 1,2 град по Баллингу
(**II**)	*D*-глюкоза – 9,0; *L*-аспарагин – 1,5
(**III**)	*D*-глюкоза – 4,5; *D*-фруктоза – 4,5; *L*-аспарагин – 1,5
(**IV**)	*D*-глюкоза – 9,0; *L*-аспарагин – 1,5; KH_2PO_4 – 1; K_2HPO_4 – 1; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ – 0,002; Fe(III) – нитрилотриацетат (НТА) – 0,03; $CaCl_2$ – 0,02; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2; NaCl – 0,1; NH_4Cl – 1
(**V**)	*D*-глюкоза – 4,5; *D*-фруктоза – 4,5; *L*-аспарагин – 1,5; KH_2PO_4 – 1; K_2HPO_4 – 1; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ – 0,002; Fe(III) – нитрилотриацетат (НТА) – 0,03; $CaCl_2$ – 0,02; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2; NaCl – 0,1; NH_4Cl – 1
(**VI**)	яблочная кислота – 3,76; дрожжевой экстракт – 0,1; KH_2PO_4 – 0,4; K_2HPO_4 – 0,4; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ – 0,002; Fe(III) – НТА – 0,03; $CaCl_2$ – 0,02; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2; NaCl – 0,1
(**VII**)	*D*-глюкоза – 10; дрожжевой экстракт – 1
(**VIII**)	*D*-глюкоза – 2,5; дрожжевой экстракт – 2,5; пептон – 5
(**IX**)	*D*-глюкоза – 5; дрожжевой экстракт – 5; пептон – 10

Опенок зимний (*F. velutipes*) выращивали погруженным способом в течение 21 сут в случае монокультур гриба, либо 7 сут до объединения с *A. brasilense* Sp245 или *A. brasilense* SR80, при температуре 28ºС. После объединения бактериально-грибные культуры выращивали в течение 14 сут.

В качестве инокулята при посеве гриба использовали 14-сут культуры, выращенные на агаризованном пивном сусле (4 град по Баллингу). Глубинные посевные бактериальные культуры выращивали до экспоненциальной фазы роста при температуре +30 °С и величине pH 7.0 в течение 18 часов на модифицированной синтетической среде (**VI**). Смешанную культуру на жидких средах получали, подсевая *A. brasilense* к *F. velutipes* либо в виде смыва с агаризованных сред (**VI**) или (**VIII**), либо в виде 24-часовой культуры на жидкой среде (**VI**).

Скорость роста при глубинном культивировании определяли по накоплению сухой биомассы в единицу времени в зависимости от продолжительности выращивания. Содержимое колб, для определения сухой биомассы при данном числе повторностей опыта на данные сутки наблюдения, фильтровали через предварительно взвешенные на аналитических весах фильтры, высушивали до постоянной массы и вновь взвешивали, определяли прирост биомассы по сравнению с контрольными образцами данной среды, в качестве которых служили 3-х-часовые культуры.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор грибного объекта в настоящей работе обусловлен в том числе упомянутыми выше ценными свойствами культивируемых базидиомицетов, что в полной мере относится к фламмулине. Бактериальная деструкция лигнин-содержащих субстратов катализируется предположительно ферментами, аналогичными участвующим в трансформации лигнина высшими грибами [18]. Для совместного культивирования с ксилотрофными базидиомицетами выбрали два штамма – модельный объект изучения эндофитного симбиоза *A. brasilense* Sp245, а также эпифитный штамм SR80, у которых выявлена способность к деградации лигнина [19].

Прежде всего необходимо было решить задачу экспериментального подтверждения возможности выращивания двойной бактериально-грибной культуры для изучаемых биологических объектов. Подбирая условия совместного культивирования фламмулины и азоспирилл, использовали как описанные в литературе, так и модифицированные среды, перечисленные в разделе «Материалы и методы исследования», предположительно подходящие для оптимизации получения мицелия в погруженной культуре и / или бактериальных суспензий.

Попытку культивирования бактерий на пивном сусле (**I**) мы предприняли с учетом ранее полученных для *A. brasilense* Sp7 положительных результатов [16]. Однако в ходе экспериментов с монокультурами выяснилось, что среда (**I**) подходит только для выращивания базидиомицетов и характеризуется лишь незначительными признаками роста азоспирилл как при относительно высоких концентрациях углеводов в составе этой среды (4 град по Баллингу), так и в разбавленном ее состоянии (рис. 1).

Сбалансированный рост бактерий нарушается на субстрате, одновременно характеризующемся избыточным количеством углерода и лимитированном по эссенциальным для них питательным веществам [20]. По-видимому, пивное сусло как источник углерода используется азоспириллами для продукции энергетического резерва бактериальной клетки, биополимеров, оказывающих негативное влияние на рост гриба. Кроме того, развиваясь на данной избыточной по углероду жидкой среде, богатой разнообразными углеводами, азоспирилла продуцирует внеклеточные низкомолекулярные соединения, способные при образовании более или менее устойчивых ассоциатов с полисахаридами [21] препятствовать усвоению данного питательного субстрата макромицетом. Известны также низкомолекулярные метаболиты PGPB, тормозящие развитие мицелия низших грибов [22]. Снижение накопления биомассы при выращивании смешанных бактериально-грибных культур мы наблюдали не только у *F. velutipes*, но и у других базидиомицетов (рис. 1).

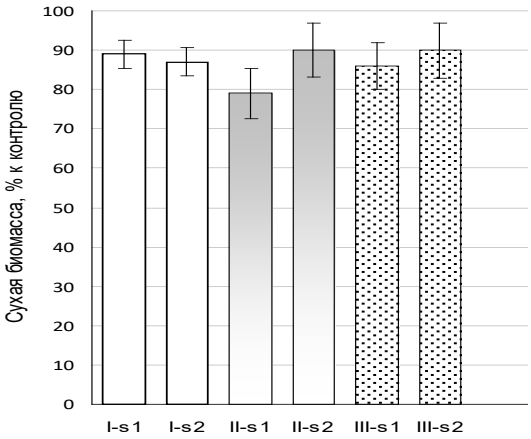


Рис. 1. Накопление биомассы погруженными ко-культурами: I – Flammulina velutipes 0535; II – Ganoderma lucidum 1315; III – Pleurotus ostreatus HK352 с Azospirillum brasilense Sp245 (s1) или A. brasilense SR80 (s2) через 21 сут на среде с пивным суслом (1,2 град по Баллингу)

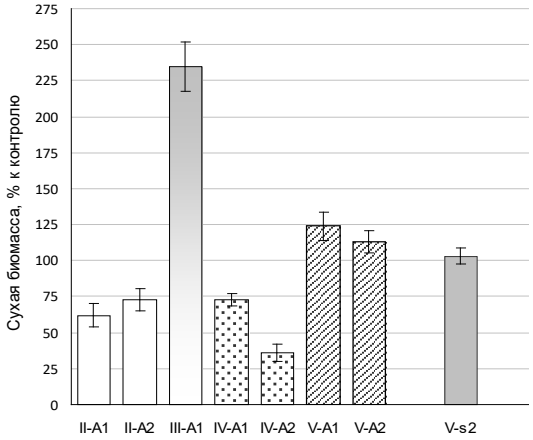


Рис. 2. Накопление биомассы глубинными ко-культурами Flammulina velutipes 0535 с Azospirillum brasilense Sp245 или A. brasilense SR80 (s2) в вариантах опыта A1 и A2 через 21 сут на углеводно-аспарагиновых средах с Glc (II, IV), Glc + Fru (III, V). Обозначения в тексте

Наиболее благоприятными средами для нормального роста и грибных, и бактериальных штаммов явились углеводно-аспарагиновые (**III**) и (**V**), в меньшей степени – среда **(VII)**. Другие среды с дрожжевым экстрактом, а именно (**VIII**) и в меньшей степени (**IX**), характеризовались нормальным ростом культур обоих бактериальных штаммов. Модифицированная малатная среда (**VI**) была нами использована для получения посевных бактериальных суспензий.

Количественные характеристики ростовых процессов двойных культур *F. velutipes* с *A. brasilense* Sp245 или *A. brasilense* SR80 определяли на жидких химически детерминированных средах (**II**), (**III**), (**IV**), (**V**) (табл. 1). Величину оптического поглощения (при $\lambda = 600$ нм) бактериальной суспензии, использованной в качестве посевного материала, условно обозначали A1; A2; A4 при объеме 0,5; 1,0; 2,0 мл соответственно в расчете на 100 мл питательной среды бактериально-грибной культуры. Величина A_{600} исходной бактериальной суспензии, измеряемая в каждой серии независимых экспериментов, составляла около 1,0. Соответствующие данные для сред (**II**) – (**V**) представлены на рис. 2.

Углеводно-аспарагиновые среды были в разной степени пригодны для увеличения (в сравнении с контрольным вариантом) сухой биомассы в двойных культурах *F. velutipes* с эндофитным штаммом *A. brasilense* Sp245 и эпифитным штаммом *A. brasilense* SR80, – в последнем случае удалось получить прирост на 3 % в одном варианте опыта с минимальной исходной плотностью бактериальной суспензии (A1) на среде (**V**).

Если в составе жидких питательных сред источник углерода был представлен только глюкозой при исключении фруктозы, но сохранении суммарного содержания углеводов (среды (**II**) и (**IV**), табл. 1), то при выращивании погруженной культуры зимнего гриба прослеживалось наиболее выраженное снижение накопления мицелиальной биомассы в ко-культурах по сравнению с контрольными вариантами опыта (рис. 2).

Эксперимент с выращиванием фламмулины совместно с *A. brasilense* Sp245 в оптимальном варианте «*A. brasilense* Sp245, A1» (рис. 2) позволил получить 235 %-ное увеличение сухой биомассы относительно контроля. Такому активному росту смешанной культуры гриба с данным штаммом азоспирилл благоприятствовала среда (**III**), содержавшая Glc и Fru в массовом соотношении 1 : 1 и отличавшаяся по составу от среды (**V**) отсутствием солей (табл. 1). При правильном дозировании бактериальной суспензии на среде (**V**) также наблюдали прирост биомассы до 24 %, и вновь при более низкой плотности посевной суспензии *A. brasilense* Sp245 (рис. 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в работе экспериментально подтверждена возможность и реализован начальный этап подбора условий совместного глубинного культивирования базидиомицета *Flammulina velutipes* с бактериями *Azospirillum brasilense*. Установлено, что биомасса мицелия совместной культуры по сравнению с монокультурой гриба в наибольшей степени увеличивается на углеводно-аспарагиновой среде (**III**) при выращивании фламмулины с бактериями *A. brasilense* Sp245.

При погруженном культивировании гриба с азоспириллами обнаружено угнетение роста эпифитного штамма, необходимость тщательного подбора состава среды и дозирования бактериальной суспензии. Исследования по эффективному получению мицелиальной биомассы и биологически активных веществ, источниками которых служат представители культивируемых базидиомицетов, обладают не только фундаментально-научной, но и практической значимостью, способствуя развитию биотехнологии получения ценных продуктов грибного происхождения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Su A., Ma G., Xie M., Ji Y., Li X., Zhao L., Hu Q. Characteristic of polysaccharides from *Flammulina velutipes in vitro* digestion under salivary, simulated gastric and small intestinal conditions and fermentation by human gut microbiota. *International Journal of Food Science & Technology*, 2019, 54(6): 2277–2287.

2. Nie Y., Jin Y., Deng C., Xu L., Yu M., Yang W., Li B., Zhao R. Rheological and microstructural properties of wheat dough supplemented with *Flammulina velutipes* (mushroom) powder and soluble polysaccharides. *CyTA-Journal of Food*, 2019, 17(1): 455–462.

3. Huang L.H., Lin H.Y., Lyu Y.T., Gung C.L., Huang C.T. Development of a transgenic *Flammulina velutipes* oral vaccine for hepatitis B. *Food Technology and Biotechnology*, 2019, 57(1): 105–112.

4. Wasser S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol*., 2002, 60: 258–274.

5. Wasser S.P., Weis A.L. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives: Review. *Int. J. Med. Mushrooms*, 1999, 1: 31–62.

6. Wasser S.P., Weis A.L. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Crit. Rev. Immunol*., 1999, 19(1): 65–96.

7. Jong S.C., Donovick R. Antitumor and antiviral substances from fungi. *Adv. Appl. Microbiol*., 1989, 34: 183–262.

8. Seow S.V., Kuo I.C., Paaventhan P., Kolatkar P.R., Chua K.Y. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies on the fungal immunomodulatory protein Fve from the golden needle mushroom (*Flammulina velutipes*). *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr*., 2003, 59(8): 1487–1489.

9. Paaventhan P., Joseph J.S., Seow S.V., Vaday S., Robinson H., Chua K.Y., Kolatkar P.R. A 1.7 Å structure of Fve, a member of the new fungal immunomodulatory protein family. *J. Mol. Biol*., 2003, 332(2): 461–470.

10. Mahfuz S., Song H., Miao Y., Liu Z. Dietary inclusion of mushroom (*Flammulina velutipes*) stem waste on growth performance and immune responses in growing layer hens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2019, 99(2): 703–710.

11. Zhao R., Hu Q., Ma G., Su A., Xie M., Li X., Chen G., Zhao L. Effects of *Flammulina velutipes polysaccharide* on immune response and intestinal microbiota in mice. *Journal of Functional Foods*, 2019, 56: 255–264.

12. Kumar A., Patel J.S., Meena V.S., Ramteke P.W. Plant growth-promoting rhizobacteria: strategies to improve abiotic stresses under sustainable agriculture. *Journal of Plant Nutrition*. 2019. 42(11–12): 1402–1415.

13. Fukami J., Cerezini P., Hungria M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Express*. 2018. 8(1): 73. 12 pp.

14. Никитина В.Е., Цивилева О.М., Лощинина Е.А. Взаимоотношения ксилотрофных базидиомицетов и почвенных азотфиксирующих бактерий рода *Azospirillum* // Успехи медицинской микологии. Том VII / Под общей научной редакцией акад. РАЕН Ю.В. Сергеева. М.: Национальная академия микологии, 2006. С. 293–294.

15. Tsivileva O.M., Pankratov A.N., Nikitina V.E. Extracellular protein production and morphogenesis of *Lentinula edodes* in submerged culture // Mycological Progress. 2010. V. 9, № 2. P. 157–167.

16. Лощинина Е.А., Никитина В.Е., Цивилева О.М., Степанова Л.В., Пономарева Е.Г., Шелудько А.В. Морфолого-культуральные характеристики базидиомицета *Lentinus edodes* при совместном культивировании с бактериями рода *Azospirillum* // Вестник СГАУ. 2006. № 6, вып. 2. С. 24–26.

17. Лощинина Е.А., Цивилева О.М., Макаров О.Е., Никитина В.Е. Изменения углеводного и жирнокислотного состава мицелия *Lentinus edodes* при совместном культивировании с *Azospırıllum brasılense* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2012. № 2 (3). С. 64–67.

18. Janusz G., Pawlik A., Sulej J., Świderska-Burek U., Jarosz-Wilkołazka A., Paszczyński A. Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution // FEMS Microbiology Reviews. 2017. V. 41, № 6. P. 941–962.

19. Купряшина М.А., Петров С.В., Пономарева Е.Г., Никитина В.Е. Лигнинолитическая активность бактерий родов *Azospirillum* и *Niveispirillum* // Микробиология. 2015. Т. 84, № 6. С. 691–696.

20. Alves M.I., Macagnan K.L., Rodrigues A.A., de Assis D.A., Torres M.M., de Oliveira P., Furlan L., Vendruscolo C.T., Moreira A.D.S. Poly (3-hydroxybutyrate) – P (3HB): Review of production process technology. *Industrial Biotechnology*, 2017, 13(4): 192–208.

21. Palacios O.A., Lopez B.R., Bashan Y., de-Bashan L.E. Early Changes in Nutritional Conditions Affect Formation of Synthetic Mutualism Between *Chlorella sorokiniana* and the Bacterium *Azospirillum brasilense. Microbial Ecology*, 2019, 77(4): 980–992.

22. Naureen Z., Rehman N.U., Hussain H., Hussain J., Gilani S.A., Al Housni S.K., Mabood F., Khan A.L., Farooq S., Abbas G., Harrasi A.A. Exploring the potentials of *Lysinibacillus sphaericus* ZA9 for plant growth promotion and biocontrol activities against phytopathogenic fungi. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1477, 11 pp.

УДК 579.66

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ НА ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТЬ КУЛЬТУРЫ LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS

Е.Б. Жалсабон, Р.Ц. Михайлова, А.Т. Бубееев, В.Ж. Цыренов

Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления, Улан-Удэ, Россия.

На сегодняшний день заболевания желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) являются наиболее распространенными [1]. В свою очередь при различных заболеваниях ЖКТ наблюдается нарушение качественного и количественного состава нормофлоры человека. К развитию патологических состояний, нарушающих нормальную микрофлору желудочно-кишечного тракта, приводят использование антибиотиков, неправильное питание, стрессы и т. д. [2].

В настоящее время в связи с распространённостью дисбактериоза востребованность медицинских пробиотических препаратов увеличивается [3]. В связис чем актуальным является увеличение ассортимента препаратов для коррекции состава микрофлоры кишечника. Особое внимание уделяется использованию препаратов, содержащих, помимо микроорганизмов или средств, стимулирующих их рост и развитие, другие соединения, прежде всего природного происхождения, корригирующие функции эукариотических клеток органов и тканей человека (фитобактериопрепараты) [4].

Особый интерес представляют растения, оказывающие влияние как на микроорганизмы, входящие в состав микрофлоры ЖКТ, так и на организм человека. Специфическая особенность растений состоит в том, что они способны синтезировать и накапливать огромное количество биологически активных веществ (БАВ), которые могут оказывать стимулирующее влияние на рост микроорганизмов – пробионтов, но практическая реализация этой концепции требует детального и разностороннего изучения факторов, влияющих на рост, развитие и спектр биологических свойств популяций микроорганизмов – пробионтов [5].

Цель работы – исследование влияния экстрактов лекарственных растений на культуру молочнокислых бактерий *Lactobacillus acidophilus*.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

Выбрать лекарственные растения, обладающих выраженной биологической активностью в отношении заболеваний желудочно-кишечного тракта человека;

Построить калибровочный график зависимости оптической плотности от концентрации клеток культуры *Lactobacillus acidophilus*

Изучить влияние экстрактов лекарственных растений на рост и развитие культуры *Lactobacillus acidophilus*

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования служили:

1. Доступные библиографические источники (глубина поиска – 40 лет), представляющие собой справочные издания, монографии, методические пособия и другие сборники рецептов, а также Государственный реестр лекарственных средств РФ.

2. Культура молочнокислых бактерий *Lactobacillus acidophilus*.

3. Лекарственные растения – зверобой продырявленный, алтей лекарственный, мята перечная, аир болотный.

В качестве материалов исследования служило обезжиренное молоко ГОСТ Р 52054–20032.

Стандартные микробиологические методы – метод Коха, простое окрашивание, метод разведений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первым этапом работы являлось построение калибровочного графика, применяемого для экспресс-анализа роста и развития культуры молочнокислых бактерий *L. acidophilus* в присутствии экстрактов лекарственных растений. Для этого необходимо было исследовать зависимость оптической плотности от концентрации клеток. Данное исследование заключалось в выращивании культуры ацидофильной палочки на жидкой питательной среде – гидролизованном молоке. Каждый час отбирали пробы культуральной жидкости на измерение оптической плотности и подсчета клеток. Для подсчета клеток пробу разбавляли методом разведений и высевали на полужидкую питательную среду в чашки Петри, через 2 суток термостатирования при температуре 37˚С, подсчитывали их количество.

Динамика роста культуры *Lactobacillus acidophilus* представлена на рисунке 1.

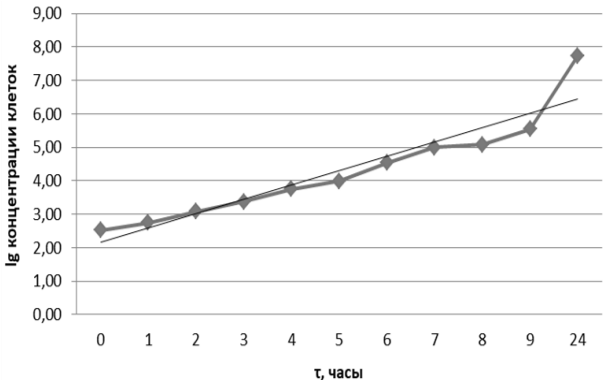


Рисунок 1 – Динамика роста культуры Lactobacillus acidophilus

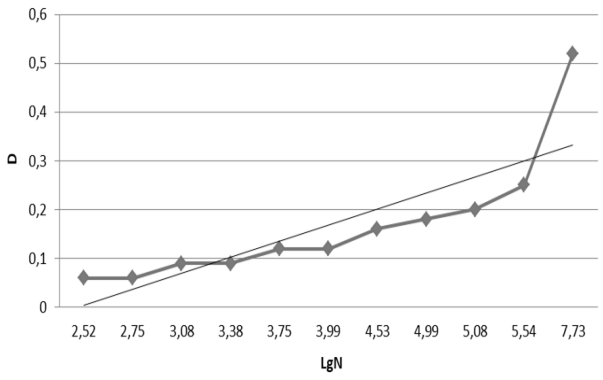


Рисунок 2 – Калибровочный график

Построили график зависимости оптической плотности от количества клеток, выраженного в десятичном логарифме – калибровочный график (рис. 2).

Дальнейшее исследование заключалось в изучении влияния экстрактов мяты перечной, зверобоя продырявленного, аира болотного, алтея лекарственного на рост и развитие культуры *Lactobacillus acidophilus*. Для этого культуру выращивали на гидролизованном молоке с добавлением 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 % экстрактов лекарственных растений от объема питательной среды. Через каждый час снимали показания оптической плотности и по калибровочному графику находили концентрацию клетки, выраженную в десятичном логарифме.

Динамика роста культуры *Lactobacillus acidophilus* при добавлении экстрактов лекарственных растений представлена на рисунке 3.

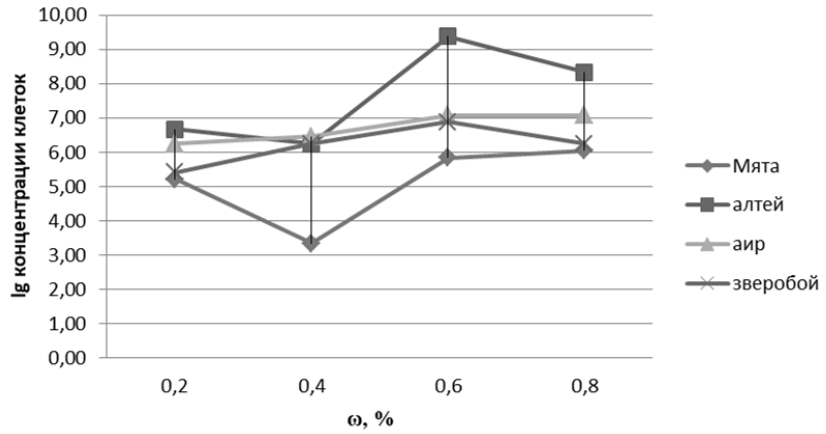


Рисунок 3 – Динамика роста культуры Lactobacillus acidophilus при добавлении экстрактов лекарственных растений

При добавлении экстракта алтея лекарственного 0,6 % от объема питательной среды наблюдается максимальный рост и составляет 9,38 единиц. При добавлении экстракта мяты различных концентраций наблюдается ингибирование ацидофильной палочки. Экстракты зверобоя и аира существенных изменений на рост культуры не оказывают.

Для дальнейшего исследования влияния экстракта на титруемую кислотность, количества белка и pH выбран алтей лекарственный.

ВЫВОДЫ

Исследована динамика роста культуры *Lactobacillus acidophilus* на гидролизованном молоке. По значениям оптической плотности от концентрации клеток построен калибровочный график.

Изучено влияние экстрактов лекарственных растений (мята, алтей, аир, зверобой) на рост и развитие культуры *Lactobacillus acidophilus*. Максимальный рост культуры *L. acidophilus* (lg 9,38) наблюдался в присутствии 0,6 % от объема питательной среды экстракта алтея лекарственного.

ЛИТЕРАТУРА

Попкова, С.М. Оценка влияния отваров лекарственных растений и противобактериальных антител к бифидобактериям на их адгезию in vitro / С.М. Попкова, Е.Л. Кичигина, С.И. Лещук и др. // Журнал микробиол. – 2004. – № 2. – С. 70–73.

Хилько, Т.В. Разработка технологии создания нового комплексного пробиотика / Т.В. Хилько // РЖ 19. Химия: 19.0. Технология органических лекарственных веществ, ветеринарных препаратов и пестицидов. 2004. – № 12. – С. 4.

Бондаренко, В.М. Дисбактериозы кишечника, их диагностика и терапия // Лабораторная диагностика. 2004. – № 3. – С. 14–18.

Шендеров, Б.А. Роль анаэробных неспорообразующих бактерий в поддержании здоровья человека / Б.А. Шендеров // Вестник РАМН. 1996. – № 2. – С. 8–11.

Решетникова А.В., Семчинская Е.И. Лечение растениями. – Киев: МП «Феникс», 1993. – 350 с.

Красникова Л.В., Гунькова П.И., Маркелова В.В. Микробиология молока и молочных продуктов: Лабораторный практикум: Учеб.-метод. пособие. СПб.: НИУ ИТМО; ИХиБТ, 2013. – 85 с.

Карамова Н.С., Хабибуллин Р.Э. Антирадикальные свойства *Lactobacillus acidophilus* n.v. Ep. 317/402 in vitro / Вестник Казанского технологического университета. 2013. т. 16. В.23. – с. 127–129.

УДК 664.844.002.237

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА КОНЦЕНТРАТА ПИЩЕВЫХ ВОЛОКОН, ПОЛУЧЕННОГО ИЗ ТОПИНАМБУРА

Р.А. Дроздов[1], М.А. Кожухова[1], А.А. Кушнерева[2], А.В. Шкуро[1]

[1] Кубанский государственный технологический университет, г. Краснодар, Россия
[2] Кубанский государственный медицинский университет, г. Краснодар, Россия

Многими исследованиями показано, что клубни топинамбура являются ценным сырьем для производства продуктов питания, особенно функционального назначения, так как содержат в своем составе инулин и фруктоолигосахариды, обладающие высокой бифидогенной активностью [1, 2].

Вовлечение топинамбура в промышленную переработку имеет экономические предпосылки, так как данная культура отличается высокой урожайностью, неприхотливостью, экологической пластичностью, устойчивостью к неблагоприятным факторам [3].

В настоящее время разработан широкий ассортимент продуктов на основе топинамбура: соки, напитки, икра, пюреобразные продукты для детского питания, соусы, быстрозамороженные овощные смеси и салаты и другие [4].

При получении сока из топинамбура образуется значительное количество отходов в виде выжимок. Ранее проведенные исследования показали, что в основном они состоят из полисахаридов клеточных стенок и могут служить источником пищевых волокон (ПВ). В связи с этим, было предложено получать концентрат пищевых волокон (КПВ) из выжимок путем высушивания [5].

Целью работы являлось определение функциональных свойств и биотехнологического потенциала КПВ, полученного из выжимок топинамбура.

Объектом исследований служили КПВ, полученный после извлечения сока из выжимок клубней топинамбура сорта «Интерес». Сок извлекали из подготовленных и измельченных клубней на лабораторном декантере, полученные выжимки собирали, высушивали в поле инфракрасного излучения при температуре в центре и на поверхности слоя исследуемого продукта 55–58 °С. Процесс сушки считали оконченным по достижению конечного содержания влаги 7–9 %.

В высушенном КПВ определяли: содержание влаги на приборе «Эвлас-2М», pH водного раствора – pH-метром «Mettler Toledo», степень и время набухания, влагоудерживающую и ионсвязывающую способность согласно методикам, приведенных в работах [6–8] соответственно. Биотехнологический потенциал оценивали путем внесения КПВ в молочную основу и сквашивания пробиотической закваской «Бифилакт-Про». При этом варьировали количество КПВ в смеси и степень его дисперстности. В процессе сквашивания контролировали pH и по полученным данным определяли кинетические показатели: максимальную скорость сквашивания (Vmax) и время достижения pH = 4,6 [9, 10].

Результаты исследований приведены в таблице 1 и на рисунках 1 и 2.

Таблица 1 – Физико-химические и функциональные свойства высушенного КПВ

Наименование показателей	КПВ топинамбура
Массовая доля сухих веществ, %	98,8
Растворимые сахара, %	22,3
Полисахариды (ПВ), %	76,0
Общая площадь поверхности, $см^2/г$	1535
pH водного раствора	6,9
Степень набухания, г/г	15,0
Время набухания, мин	55
Вагоудерживающая способность, %	58,7 ± 1
Связывающая способность, % – Pb^{2+} – Ni^{2+}	 52,7 42,1

Приём материалов статей по адресу: actbio@mail.ru

Как видно из таблицы 1, основную массу сухих веществ исследуемого порошка составляют полисахариды клеточных стенок, в состав которых входят растворимые и нерастворимые ПВ.

Важное значение имеет размер частиц КПВ, так как от него зависит влагопоглатительная и влагоудерживающая способность, общая площадь поверхности и скорость ферментации ПВ в толстой кишке. Водосвязывающая способность влияет на синеретические свойства ферментированных продуктов, а также на транзит пищи в желудочно-кишечном тракте.

Водные растворы порошков имеют слабокислую реакцию, что обуславливает возможность их внесения в молоко перед пастеризацией без риска вызвать коагуляцию казеина при последующей тепловой обработке.

Время и степень набухания необходимо учитывать при использовании высушенных КПВ в составе жидких пищевых продуктов, в том числе и молочных.

Многими отечественными и зарубежными учеными доказано, что ПВ, благодаря своей пористо-волокнистой структуре, обладают способностью связывать и выводить ионы тяжелых металлов и радионуклиды из организма человека. Так, связывающая способность КПВ топинамбура по отношению к свинцу равна 52,7 % и к никелю 42,1 % соответственно.

Из литературных источников известно, что некоторые виды ПВ обладают бифидогенным эффектом. Это объясняется наличием у бифидобактерий ферментов, способных гидролизовать полисахариды клеточных стенок и превращать их в легкоусвояемые элементы питания. Также показано, что скорость ферментации ПВ будет зависеть от их природы, химического состава и величины частиц.

В связи с этим представляло интерес исследовать кинетику сквашивания молочно-растительных смесей с добавлением КПВ топинамбура. На рисунках 1 и 2 приведены графические зависимости максимальной скорости сквашивания (Vmax) и времени достижения $T_{pH} = 4,6$ от количества и степени дисперсности КПВ.

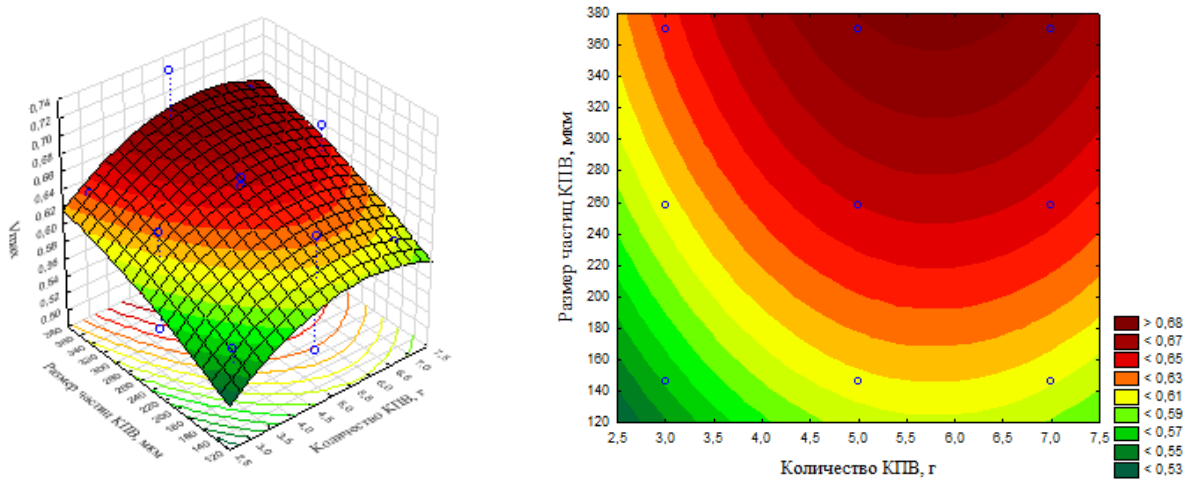


Рисунок 1 – Графики поверхности и контуров, отражающие зависимость максимальной скорости сквашивания (Vmax) от количества КПВ топинамбура и размера частиц

Как видно из представленных данных, максимальная скорость сквашивания находится в прямой зависимости от количества вносимого КПВ топинамбура. Этот объясняется наличием дополнительного количества сбраживаемых сахаров, которые изначально содержатся в растительной добавке, а также образуются в результате гидролиза полисахаридов пробиотическими культурами. При этом приемлемой величиной максимальной скорости считается $Vmax \geq 0,65$ [9,10]. Из рисунка 1 можно сделать вывод, что при внесении КПВ в количестве 5 г / 200 мл при размере частиц 220 мкм и выше достигается данная скорость сквашивания.

Результаты, представленные на рисунке 2, показывают, что время сквашивания уменьшается с увеличением количества вносимого КПВ. Следует отметить, что при дисперстности 200–340 мкм и увеличение количества КПВ от 3 до 5 г / 200 мл продолжительность сквашивания сокращается с 8 до 6 часов.

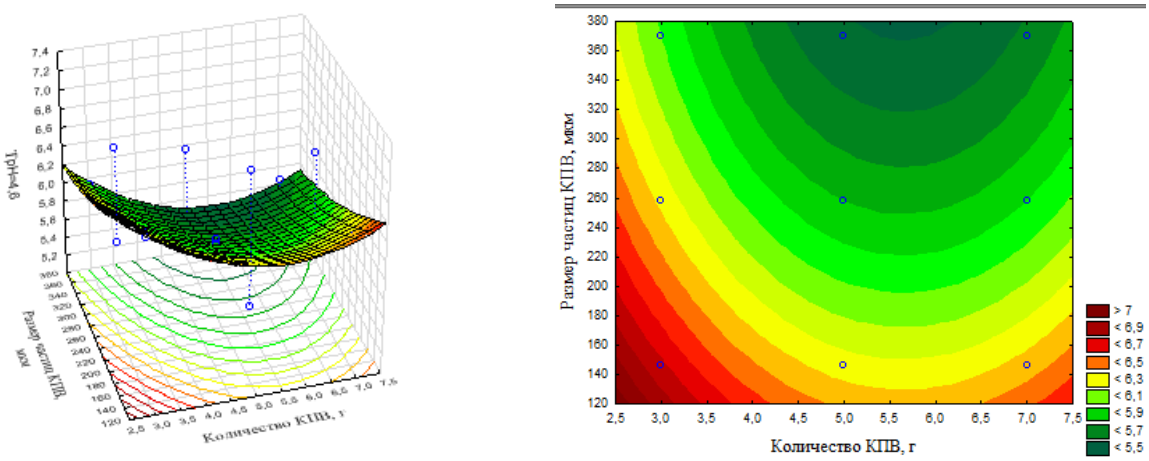


Рисунок 2 – Графики поверхности и контуров, отражающие зависимость продолжительности сквашивания (ТрН = 4,5) от количества КПВ топинамбура и размера частиц

На основании полученных экспериментальных данных было предложено использовать КПВ топинамбура в производстве пробиотических кисломолочных напитков в количестве 2,5 % с дисперстностью 250 ± 30 мкм, что позволяет обеспечить продолжительность сквашивания молочной основы при 37 ± 2˚С 6 часов и получить продукт с хорошими вкусовыми качествами и функциональными свойствами. Для выявления потенциального бифидогенного эффекта высушенного КПВ в сквашенных образцах определяли количество бифидобактерий на конец срока хранения (10 суток при температуре 4–6˚С), которое составляло не менее $6\times10^{1\circ}$ КОЕ/г.

Таким образом, в результате проведенных исследований изучены физико-химические и технологические свойства высушенного КПВ топинамбура, подтвержден его ростостимулирующий эффект, оказываемый на пробиотические культуры в процессе ферментации молочно-растительной смеси. Полученные результаты легли в основу разработки рецептуры и технологии пробиотического кисломолочного напитка, обогащенного КВП топинамбура [5].

ЛИТЕРАТУРА

1. Кочнев, Н.К. Топинамбур – биоэнергетическая культура XXI века/ Н.К. Кочнев, М.В. Каменечева. – М.: Типография «Арес», 2002. – 76 с.

2. Назаренко М.Н. Исследование процесса ферментации инулина при производстве фруктозо-глюкозного сиропа / М.Н. Назаренко, Т.В. Бархатова, М.А. Кожухова, Р.А. Дроздов // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Научный журнал КубГАУ) [Электронный ресурс]. – Краснодар: КубГАУ, 2014. – № 04(098). – IDA [article ID]: 0981404057. – Режим доступа: http://ej.kubagro.ru / 2014/04/pdf / 47.pdf, 0,813 у.п.л.;

3. Barkhatova T.V. Obtaining and identification of inulin from jerusalem artichoke (helianthus tuberosus) tubers / T.V. Barkhatova, M.N. Nazarenko, M.A. Kozhukhova, I.A. Khripko // Foods And Raw Materials. – 2015. – № 2. – P. 13–22

4. Кожухова М.А. Разработка технологии продуктов функционального питания на основе топинамбура/ М.А. Кожухова, Т.В. Бархатова, М.К. Алтуньян, И.А. Хрипко, Л.А. Рыльская // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. Изд.: КубГТУ», г. Краснодар. – 2005. – № 2–3. – С. 21–23

5. Дроздов Р.А. Оптимизация рецептуры пробиотического кисломолочного напитка с добавлением пищевых волокон топинамбура / Р.А. Дроздов, М.А. Кожухова, Т.В. Бархатова, А.М. Маренич // Ползуновский вестник. – Барнаул: Изд. Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова». – 2016. – № 4 (Т2). – С. 4–11

6. Zhang Y., Gao P., Zhao L., Chen Y. Preparation and swelling properties of a starch-g-poly(acrylic acid) / organo-mordenite hydrogel composite // Frontiers of Chemical Science and Engineering – 2016. – Volume 10. – Issue 1. – P. 147–161

7. Грек Е., Красуля Е. Исследование влияния пищевых волокон на формы связи влаги в смесях с молочной сывороткой // Maisto Chemija Ir Technologija. – 2013. – Том 47. – № 1. – С. 15–21.

8. Комплексные соединения в аналитической химии / Умланд Ф., Янсен А., Тириг Д. и др. // – М.: Мир, 1975. – 531 с.

9. Kristo E., Biliaderis C.G., Tzanetakis N. Modelling of the acidification process and rheological properties of milk fermented with a yogurt starter culture using response surface methodology // Food Chemistry – 2003. – Volume 83. – P. 437–446

10. Kristo E., Biliaderis C.G., Tzanetakis N. Modelling of rheological, microbiological and acidification properties of a fermented milk product containing a probiotic strain of Lactobacillus paracasei // International Dairy Journal – 2003. – Volume 13. – P. 517–528

УДК 613.2

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОДУКТОВ СПОРТИВНОГО ПИТАНИЯ ДЛЯ ОРГАНИЗОВАННЫХ КОЛЛЕКТИВОВ В ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

С.А. Новоселов[1], А.Н. Шаронов[2], С.М. Кузнецов[1], С.А. Лопатин[3]

[1] *Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия*
[2]*Военная академия материально – технического обеспечения имени генерала армии А.В. Хрулева, Санкт-Петербург, Россия*
[3] *Санкт-Петербургский государственный экономический университет, Россия*

Количественный и качественный состав пищевых продуктов, потребляемых лицами с повышенными энерготратами, в значительной мере определяет пределы их физических и умственных возможностей. Длительные, интенсивные, многократно повторяющиеся физические и эмоциональные нагрузки оставляют организму очень мало времени на ассимиляцию традиционной пищи в желудочно-кишечном тракте и на дальнейшее усвоение тканями питательных веществ.

В период интенсивных физических и нервно-эмоциональных нагрузок в организме военнослужащего может развиться объективная потребность в повышенном энергетическом обеспечении, витаминах, макро- и микроэлементах, способствующих увеличению уровня метаболизма, а также повышению адаптивных возможностей человека. Например, рацион военнослужащих, проходящих службу в Арктике под открытым небом (патрулирование, переходы, обслуживание военной и специальной техники и др.), должен содержать дополнительно до 3000 ккал при процентном соотношении макронутриентов (белки: жиры: углеводы), равном 16:40:44 [1]. Во время профессиональной деятельности некоторых категорий военнослужащих в экстремальных условиях величина их суточных энерготрат может увеличиваться более чем в 2 раза и вызывать резкие сдвиги в метаболизме [2].

При подобном дефиците энергии у военнослужащих появляется субъективное чувство голода, в формировании которого по современным представлениям решающую роль играет концентрация глюкозы крови. В норме у здорового человека, независимо от качества потребляемой пищи, содержание глюкозы в крови поддерживается в пределах 4,1–5,9 ммоль/л. В промежуточном мозге, печени и стенках кровеносных сосудов находятся хеморецепторы, реагирующие на концентрацию глюкозы, так называемые глюкорецепторы. Реагируя на снижение содержания глюкозы в крови, они способствуют возникновению чувства голода. Некомпенсируемые траты глюкозы крови и гликогена, содержащегося в мышцах, сопровождаются ослаблением физических умственных возможностей человека и, как следствие, заметным снижением уровня его физической и умственной работоспособности.

С помощью метода экспертной оценки проведено ранжирование основных направлений коррекции питания военнослужащих в условиях интенсивных физических и нервно-эмоциональных нагрузок. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Согласно данных, приведенных в таблице 1, в число основных направлений возможного улучшения питания военнослужащих были включены продукты спортивного питания: спортивные напитки, спортивные батончики, спортивные гели, белковые изоляты, аминокислоты, гейнеры.

Наибольший интерес среди предложенных продуктов представляют спортивные батончики, особенно группа так называемых энергетических спортивных батончиков, содержащих большое количество углеводов и сравнительно немного жиров и белков. В процессе создания указанной группы продуктов перед технологами была поставлена задача – включить в состав батончика необходимое

количество энергетических компонентов в концентрированном виде в целенаправленно созданных сочетаниях. В результате масса современных энергетических спортивных батончиков колеблется от 25 до 90 г., а их энергетическая ценность находится в интервале от 150 до 250 ккал. Однако данную группу продуктов следует рассматривать не как полноценную замену регулярного «горячего» питания, а только как полезное дополнение к нему, скорее коррегирующего характера.

Таблица 1 Результаты ранжирования возможных направлений коррекции питания военнослужащих в условиях интенсивных физических и нервно-эмоциональных нагрузок

Направления коррекции питания военнослужащих	Рейтинговое место
Увеличение количества традиционных пищевых продуктов, имеющих повышенные питательные свойства (продукты животного происхождения (молочные продукты), фрукты.	1
Использование биологически активных добавок к пище	2
Включение в рацион продуктов спортивного питания (спортивные напитки, спортивные батончики, спортивные гели, белковые изоляты, аминокислотные смеси, гейнеры, другие)	3
Использование адаптогенов растительного происхождения (женьшень, элеутерококк, маралий корень)	4
Использование функциональных пищевых продуктов	5
Разработка дешёвых средств коррекции питания для индивидуального и коллективного применения	6
Применение ингредиентов, улучшающих вкусо-ароматические свойства традиционных продуктов и блюд	7

Значительную долю в энергетических спортивных батончиках составляют углеводы с высоким гликемическим индексом (глюкоза, фруктоза, глюкозно-фруктозные сиропы, мальтодекстрин, крахмальная патока, мед), которые быстро усваиваются организмом, повышая уровень глюкозы крови. Различные углеводы не одинаковы и по эффектам на субъективные ощущения, а также метаболизм человека. Например, фруктоза способна вызывать сильное ощущение сладости (по этому показателю она почти в два раза превышает сахарозу и в три раза – глюкозу). В тоже время, фруктоза замедляет выработку гормона лептина, регулирующего ощущение субъективных чувств голода и насыщения. В результате чего при избыточном потреблении фруктозы возникновение ощущения сытости запаздывает, и человек употребляет пищу в избыточном количестве. Мальтодекстрин, (продукт частичного ферментативного разложения крахмала) относится к достаточно «быстрым» углеводам и не обладает выраженным сладким вкусом. Его гликемический индекс составляет около 105 единиц (один из наибольших среди нутриентов), что указывает на то, что по скорости обеспечения организма энергией ему фактически нет равных (для сравнения, у глюкозы указанный индекс равен – 100). В качестве источника «долгих» углеводов в состав энергетических спортивных батончиков могут включаться экструдированная воздушная кукуруза, воздушный рис, воздушная пшеница, хлопья различных злаков, а также изюм, сухофрукты, орехи, цедра лимонов и апельсинов.

Энергетические батончики имеют, как правило, вязкую жевательную консистенцию, что предотвращает образование крошек, их попадание в дыхательные пути и, как следствие, рефлекторные кашель и чихание. Они также могут рассматриваться и в качестве удобного объекта для дополнительного обогащения почти всеми необходимыми при интенсивных физических нагрузках физиологически активными веществами: витаминами, макро- и микроэлементами, аминокислотами, креатином, l-карнитином, растительными адаптогенами, антиоксидантами и т. п.

Помимо эффективного выполнения своей роли для восполнения дефицита энергии, энергетические спортивные батончики обладают другими положительными качествами: приятными вкусом, цветом и текстурой, еще, как правил, они выпускаются в удобной упаковке [3].

При высоком уровне энерготрат и, как следствие, развитии чувства утомления перспективными продуктами для использования военнослужащими могут стать также различные энергетические гели, содержащие фруктозу, глюкозу и мальтодекстрин (его доля в составе геля может достигать 90 % от общего количества углеводов), в их состав также дополнительно могут добавляться калий и натрий. Такие продукты, в отличие от батончиков, не нужно жевать, а значит они не сбивают дыхание и ими сложно подавиться. Но, как показывает практика, гели нужно обязательно запивать водой, иначе они могут усугубить состояние обезвоживания организма, развивающееся, как следствие сильного потоотделения и интенсивного дыхания, всегда сопровождающих выполнение физических нагрузок высокой интенсивности. Каждый тюбик (пакетик, бутылочка), содержащий разовую дозу энергетического геля, выпускаемого в настоящее время, обладает энергетической ценностью, равной приблизительно 70–120 ккал и содержит в среднем 17 – 42 г. легкоусвояемых углеводов. Для улучшения вкусовых характеристик гелей, как правило, используются натуральные фруктовые соки

и измельченные фрукты. Упаковка, в которой выпускаются указанные продукты, должна легко открываться. Между первым и вторым приемом энергетических гелей следует в обязательном порядке делать перерыв. Оптимально принимать их не чаще одного раза в час, что препятствует слишком быстрому повышению уровня сахара в крови.

На основании проведенного анализа химического состава, физических и органолептических свойств возможных средств коррекции суточного рациона военнослужащих, в качестве которых могут быть использованы продукты спортивного питания, рассмотренные выше, можно сформулировать следующие рекомендации: при интенсивных физических нагрузках для проведения коррекции энергетической ценности суточных рационов питания необходимо ориентироваться, в первую очередь, на величину суточных энерготрат (которая в экстремальных условиях может значительно превысить энергетическую ценность используемого рациона), затем – на данные, свидетельствующие об истощении адаптационных резервов организма и, в последнюю очередь, – на субъективные чувства голода и усталости. Для личного состава, выполняющего свои должностные обязанности в экстремальных условиях, принимать указанные средства коррекции суточного рациона питания необходимо по команде, подобно питью по команде в условиях жаркого климата (так считает около 90 % экспертов) или по собственной инициативе (мнение 10 % экспертов).

В заключении следует отметить, что продукты спортивного питания, перспективные для использования в экстремальных условиях, должны рассматриваться в системе планируемых Медико-технических требований к организации питания военнослужащих [4, 5]. Активное их применение в питании личного состава ВС РФ и должно быть организовано с учетом:

– величины энергетического дисбаланса при выполнении физической работы высокой интенсивности;

– особенностей организации питания личного состава ВС РФ;

– необходимости одновременного восстановления водно-солевого и кислотно-щелочного равновесия в организме военнослужащих, проходящих службу в экстремальных условиях;

– индивидуальных физических характеристик личного состава (выносливость, мощность, сила, гибкость);

– субъективных ощущений (чувств утомления, голода, насыщения);

– пищевых предпочтений военнослужащих.

Кроме того, включение в рацион военнослужащих продуктов спортивного питания не должно противоречить новой модели продовольственного обеспечения населения РФ, параметры которой будут базироваться не на достигнутых ранее показателях развития сельского хозяйства, а на учете физиологических потребностей современного россиянина в основных питательных веществах и энергии с целью сохранения его работоспособности, здоровья, а также продуктивного долголетия [6].

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреев В.П. Состав и энергетическое содержание рационов питания населения и военнослужащих в Арктической зоне Российской Федерации / В.П. Андреев, А.И. Андриянов, Ж.В. Плахотская // Вестник Российской Военно-медицинской академии, Приложение. Ч. 1 – СПб, 2018. – № 4 (64). С. 5–9.

2. Ендальцев Б.В. Особенности физической подготовки военнослужащих на современном этапе реформирования ВС (проблемы, решения)» // Материалы научно-практической конф. «Медико-биологические проблемы физической культуры и спорта». – СПб., 2002. – С. 77–80.

3. Штерман С.В. Продукты спортивного питания. – М., 2017. – 482 с.

4. Кузнецов С.М. Медицинские аспекты совершенствования продовольственной системы ВС РФ / С.М. Кузнецов, С.А. Лопатин, С.А. Новоселов // Вестник российской военно-медицинской академии, Приложение. Ч. 1 – 2018. – № 4 (64). Пятый Съезд военных врачей медико-профилактического профиля ВС РФ «Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия военнослужащих и населения в современных условиях» Научные доклады 22–23 ноября 2018 года / СПб., 2018. – С. 96–97.

5. Шаронов А.Н., Лопатин С.А., Кузнецов С.М., Новоселов С.А. и др. Нормирование и контроль качества как концептуальная основа развития войскового питания / Под ред. С.А. Лопатина / ФГКВОУ ВО «Военная академия материально-технического обеспечения имени генерала армии А.В. Хрулёва». – СПб.: Астерион, 2019. – 378 с.

6. Лищенко В.Ф. Введение // Будущее продовольственной системы России (в оценках экспертного сообщества) / Под ред. В.Ф. Лищенко. – М., 2014. – С. 5–10.

УДК 633.13

ОВЕС И ПРОДУКТЫ ЕГО ПЕРЕРАБОТКИ КАК ПЕРСПЕКТИВНОЕ ПИЩЕВОЕ СЫРЬЕ СЕВЕРО-ЗАПАДНОГО РЕГИОНА РОССИИ

Т.Р. Кудряшова, О.Б. Иванченко

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

Овес (Avena sativa L.) охватывает род в семействе злаковых (Gramineae), является более ранней в освоении культурой, нежели пшеница (Triticum L.) и ячмень *(*Hordeum L.*)*. До использования человеком, встречался в посевах как сорное растение. Более стойкий к условиям произрастания, чем главные культуры, овес нередко сдерживал и вытеснял их, благополучно продвигаясь в новые районы. В настоящее время эта культура распространена на всех континентах и характеризуется экологогеографическим многообразием, что обуславливает разнообразие форм, отличных по комплексу морфологических и биологических признаков [1].

Овёс был последним из главных зерновых культур, который стали возделывать для использования человеком в пищу. Предполагается, что его начали возделывать между 1000 годом до нашей эры и началом нашей эры в юго-восточной Европе и Малой Азии. Овёс, как намеренно возделываемая культура, начал упоминаться в мировой литературы в начале первого столетия нашей эры [2, с. 22].

Овес причисляется к числу влаголюбивых культур. Он выносит засуху хуже, чем яровая пшеница и ячмень. Потребность в воде у овса видоизменяется по фазам формирования и роста. Для определения подвластности урожая овса в нечерноземной зоне европейской части России от метеорологических условий и, в частности, от числа выпадающих осадков Е.А. Мызина показала, что в данной зоне на урожай овса предельное воздействие проявляют метеорологические условия в период кущения – выметывания. Для приобретения более высокого показателя урожайности овса в указанный период необходимо большее число осадков и невысокая температура воздуха. Увеличенное число осадков за время кущения–выметывания ведет к наращиванию высоты растений [3, с. 78]. Северо-западный регион России характеризуется тем, что жаркие, сухие дни здесь редкость, дневные температуры летом практически всегда около +20° С и выше. В течение всего летнего сезона здесь стоит неустойчивая погода, характерно чередование теплых солнечных дней с короткими дождливыми периодами, что создает благоприятные условия для районирования этой культуры.

Для овса характерен долгий срок поступления в растение питательных веществ. В первый период роста овес остро и быстро отвечает на внесение азотных удобрений. Потребность в фосфоре особенно обнаруживается на первых этапах роста, до формирования вторичной кормовой системы; в последующие фазы формирования фосфор впитывается более или менее равномерно. Надобность в калии равномерна во все фазы роста. Приток питательных веществ в растение овса связан с формированием его корневой системы. Величина корневой массы у овса меняется в зависимости от уровня урожая. При росте урожая овса с 16 до 30 центнеров с одного гектара количество корневой массы увеличилось с 10 до 19 центнеров на один гектар.

В переводе с латинского языка «*Avena sativa*» означает «несущий здоровье», то есть древние римляне и греки придавали особую ценность овсу. Использование зерна овса и овсяной муки в качестве продукта среди народов Европы было распространено на ранних этапах их развития. Встречены данные, свидетельствующие о том, что еще до нашей эры они добавляли овес к своей пище [4].

Применение овса и продуктов его переработки (овсяная крупа, хлопья, мука, толокно и др.) в пищевой промышленности обусловлено его богатой пищевой ценностью и наличием витаминов (табл. 1), что, безусловно, делает его необычно ценным сырьем для детского и диетического питания. Пищевые продукты из овсяного сырья обладают высокой калорийностью, но при этом легко усваиваются в организме человека.

Содержание тиамина в овсе, по сравнению с другими зерновыми, является наиболее высоким, может доходить до 8,0 мг/кг. Содержание рибофлавина в зерне овса почти такое же, как и у других зерновых культур и достигает до 1,87 мг/кг.

Кроме водорастворимых витаминов группы В масло овса содержит жирорастворимые вещества токолы – токоферолы и токотриенолы (витамин Е) [5]. Отмечается, что эти вещества обладают повышенными антиоксидантными свойствами, что обуславливает его полезность для человека и придает такому маслу большую устойчивость против окисления [6, 7].

Таблица 1 – Среднее содержание витаминов в зерне овса

Наименование витамина	Содержание, мг/кг
В1 – тиамин	7,7
В2 – рибофлавин	1,4
В3 – ниацин	9,7
В5-пантотеновая кислота	3,6
В6 – пиридоксин	1,2
В9 – фолиевая кислота	0,6

Овес – источник растворимой клетчатки, которая в отличие от нерастворимой клетчатки пшеницы и прочих зерновых культур усваивается организмом и содействует оптимальному обмену веществ. Овсяные крупы и мука имеют большое количество легкоусвояемых, богатых незаменимыми аминокислотами белков, углеводов, жиров и витаминов группы В. Из них готовят каши, слизистые отвары и супы, которые становятся диетическими и обволакивающими средствами при острых воспалительных заболеваниях желудочно-кишечного тракта (гастриты, энтероколиты), при атонии кишечника, вирусном гепатите, астении, заболеваниях нервной системы, нарушении ритма сердечной деятельности и при железодефицитной анемии, вызванной нарушением синтеза порфиринов. Овсяный кулеш применяют при туберкулёзе лёгких (как укрепляющее средство), дают детям, больным диатезом (золотухой). При диабете рекомендуют употреблять настой из неочищенного зерна. В клинических испытаниях определено, что настойка зелёного высушенного растения (травы) имеет успокоительные и снотворные свойства. Настой травы имеет такие же характеристики, но его чаще применяют при лихорадочных состояниях, подагре, при отёках, вызванных заболеваниями почек, для поднятия аппетита и подъема общего тонуса организма Отвар из зерен овса используют при малокровии, туберкулезе, болезни печени, горла. Зерно овса содержит полифенолы, которые уменьшают содержание холестерина в крови и содействуют выведению сахаров, что отдельное важно для больных диабетом. Овсяную муку применяют в медицине для лечения отдельных заболеваний ног и в парфюмерной промышленности для изготовления лечебного мыла [8, с. 43].

Овес, как и многие дикорастущие растения содержат биологически активные вещества, что обуславливает их внесение как основных компонентов в некоторые биологически активные добавки [9].

Представляет интерес и применение овса и в виде консерванта. «Овсяное молоко», приготовленное из муки овса, включает вещества, мешающие окислению жиров и масел, что защищает продукты от прогоркания [10, 11]. В Индии его добавляют в сливочное масло и маргарин.

Стебли овса применяются в качестве биофильтров в пивоваренной промышленности.

Научные изыскания свидетельствуют о пользе овса, но не столько для суставов или костей, сколько для сердца. На конференции Американского химического общества несколько лет назад был презентован доклад, посвященный позитивному воздействию овса на работу сердечно-сосудистой системы. Авторы утверждали, что в злак входит авенантрамин – фенольное соединение, располагающее не только антиоксидантными, но также противораковыми характеристиками. Доказательство приобрело и противовоспалительное влияние овса. Авенантрамин подавляет воспалительные процессы, он может тормозить формирование атеросклероза [12].

Зёрна овса применяют для изготовления овсяных хлопьев «геркулес», толокна, муки и особого овсяного кофе. Овсяную муку используют в хлебопекарной промышленности и кондитерском производстве – из неё пекут хлебцы, овсяное печенье, блины и т. п. Расплющенные зёрна овса (овсяные хлопья) – основной компонент мюслей. Из крупы, хлопьев, муки – готовят овсяный кисель.

Поскольку овес имеет самое наибольшее содержание белка среди всех злаков, он применяется для экстрагирования концентрата овсяного белка, используемого при производстве спортивного питания, протеиновых батончиков, вегетарианских продуктов и мясных аналогов, обогащения белком хлебобулочных изделий, снэков, напитков и молочных коктейлей, продуктов быстрого приготовления. Овсяный белок имеет высокую пищевую ценность, благодаря своему особому составу (табл. 2,3 и 4).

Таблица 2 – Аминокислотный состав белков пшеницы и овса, г / 100 г. белка

Аминокислота	Пшеница	Овес
Валин	4,2	7,8
Изолейцин	3,4	5,2
Лейцин	6,7	8,1
Лизин	2,8	3,9
Метионин	1,2	2,0
Треонин	2,8	3,8
Фенилаланин	4,6	6,5

Аминокислотный скор белка овса по лизину 71 %, тогда как белка пшеницы по этой аминокислоте – только 56 %. Процентное содержание белка у овса и его аминокислотный состав лучше сбалансирован по сравнению с другими зерновыми, что говорит о хорошей питательной ценности этой культуры. В среднем, содержание белка в зерне овса находится на уровне 9–12 %, максимальное содержание у некоторых сортов может доходить до 20 % [13].

Таблица 3 – Обобщённая характеристика белкового комплекса овса [14]

Показатель	Значение, %
Общее содержание белка	9–20
Белковый комплекс, в том числе:	
Альбумины	10–20
Глобулины	12–55
Проламины	12–14
Глютелины	23–54

Отдельные группы белков не только различаются по физико-химическим свойствам, но и характеризуются определенным аминокислотным составом. Пищевая ценность белков определяется в первую очередь содержанием «незаменимых» аминокислот (лизина, триптофана, метионина, треонина, валина, фенилаланина, лейцина, изолейцина) [15].

Таблица 4 – Аминокислотный состав белков зерна овса, %

Аминокислота	Альбумины	Глобулины	Проламины	Глютелины
Глицин	6,73	5,37	2,42	5,02
Аланин	8,00	5,69	4,40	5,06
Валин	6,61	4,86	5,60	5,49
Лейцин	8,60	6,84	10,60	8,05
Изолейцин	4,80	4,30	3,72	4,98
Серин	6,58	4,85	2,91	5,07
Треонин	5,58	3,61	2,27	4,42
Аспарагиновая кислота	12,23	8,80	3,33	9,99
Глутаминовая кислота	13,69	20,17	37,63	17,52
Лизин	8,18	5,53	3,28	5,02
Аргинин	5,28	9,71	4,75	9,51
Цистин	1,38	1,31	4,16	0,87
Метионин	2,40	1,83	3,66	1,79
Фенилаланин	7,26	5,85	7,01	6,75
Тирозин	3,07	2,38	1,72	4,93
Гистидин	2,90	2,90	1,71	3,06
Пролин	6,14	5,42	9,12	5,46

Сегодня приумножается использование продуктов, включающих овес. Из овсяного зерна изготавливают резаные и шлифованные крупы, овсяные хлопья, которые необычно ценны для детского питания благодаря увеличенному содержанию белка и незаменимых аминокислот (лизина, триптофана, аргинина) и легкой усвояемости. Из овсяной муки производятся пищевые галеты, овсяное

печенье, суррогат кофе. Овсяная мука в чистом виде не применяется для выпечки хлеба, так как она не содержит клейковины, однако её иногда прибавляют в ржаную или пшеничную муку.

Овес используется для приготовления алкогольных напитков. Из него изготавливают овсяное пиво, которое имеет мягкий, приятный вкус, похожий на хорошие ячменные сорта, квас. Овес иногда добавляют при приготовлении водки. Из овса и овсяного солода ставят брагу. Ранее из него изготавливали виски.

В последнее время довольно часто поднимается вопрос, о пользе и перспективах использования овсяной муки в функциональном питании. Овсяная мука – нетрадиционный вид растительного сырья, который богат клетчаткой, углеводами и белками [8].

В производстве печенья пшеничная мука может быть заменена овсяной мукой на 20 %. В песочном тесте целесообразно использовать овсяную муку взамен пшеничной для снижения клейковины и улучшения структурно – механических свойств теста и качества готовых изделий. Глютелин овса не образовывает непрерывную структуру в тесте из-за большого количества поперечных связей между молекулами белка [16].

Использования пророщенного зерна овса и продуктов его переработки является хорошим источником различных фитохимических веществ, включая фенольные соединения, флавоноиды, кумарины, терпены. Пророщенное зерно считается отличным источником феруловой кислоты, глутатиона и растительных стеролов, имеют витамины Е, В1, В2, В3 и минералы, такие как фосфор, калий, магний, кальций, цинк и марганец. Из-за высокого содержания питательных веществ, ростки играют важную роль в обогащенных продуктах для производства функциональных продуктов [17].

Для предотвращения окисления жиров в зерне овса, оно предварительно проходит гидротермическую обработку, что позволяет улучшить технологические и органолептические свойства, увеличить срок годности.

Таким образом, полезно добавлять продукты переработки овса такие как мука, хлопья и отруби, к пищевым продуктам (например, хлебопекарным и кондитерским изделиям). Целлюлоза из овса может частично заменить муку или жир в кондитерской промышленности, а мучные и хлебобулочные изделия обогащаются ценным компонентом, и одновременно уменьшается их калорийность.

ЛИТЕРАТУРА

1. И.Г. Лоскутов. Овес (*Avena L.*). Распространение, систематика, эволюция и селекционная ценность. СПб: ГНЦ РФ ВИР. 2007. 336 с.

2. Чекина М.С., Меледина Т.В., Баталова Г.А. Перспективы использования овса в производстве продуктов специального назначения // Известия СПбГАУ. 2016. № 43. С. 20–25.

3. Комарова Г.Н., Сорокина А.В. Влияние регулятора роста и развития растений гуминовой природы Гумостим на овес // Достижения науки и техники АПК. 2012. № 5. С.27–29.

4. Brown, C.M. Variation in oil content and its relation to other characters in oats / C.M. Brown, D.E. Alexander, S.G. Carner // Crop Sci. – 1966. – Vol. 6. – P. 190–191.

5. Peterson, D.M. Oat – a multifunctional grain / D.M. Peterson //Proc. 7th Inter. Oat Conference. Finland. – 2004. – P. 21–26.

6. Okarter, N. Health benefits of whole grain phytochemicals / N. Okarter, R.H. Liu //Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2010. – Vol.50. – P. 193–208.

7. Соколова А.В., Иванченко О.Б., Хабибуллин Р.Э. Использование натуральных антиокислителей как микронутриентов в продуктах питания // Вестник КНИТУ, 2016, Т.19, N.23. – С. 157–159.

8. Неумывакин И.П. Овес. Мифы и реальность. – Издательство Диля, 2007.

9. Базарнова Ю.Г., Иванченко О.Б. Исследование состава биологически-активных веществ экстрактов дикорастущих растений // Вопросы питания. 2016. – Т.5.С. 124–131.

10. Тарасова, А.А. Применение овсяной муки при выработке хлебобулочных изделий / А.А. Тарасова, И.А. Марченкова // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Здоровье человека и экологически чистые продукты питания-2014». – Орел: Госуниверситет – УНПК, 2014. – С. 393–399.

11. Лоскутов, И.Г. Овес-прошлое, настоящее и будущее / И.Г. Лоскутов // Хлебопродукты. – 2007. – No 6 – С. 50–52.

12. Sang S. et al. Oat Avenanthramides Induce Heme Oxygengase-1 Expression via Nrf2-mediated Signaling in HK-2 Cells //The FASEB Journal. – 2015. – Т. 29. – №. 1 Supplement. – С. 390.1.

13. Briggle, L.W. Protein concentration and amino acid composition of Avena sterilis L. groats / L.W. Briggle, R.T. Smith, Y. Pomeranz, G.S. Robbins // Crop Sci. -1975. – Vol. 4 (15). – P. 547–549.

14. Сидоренко, В.С. Перспективы селекции голозерного ячменя и овса в центральной России / В.С. Сидоренко, Д.В. Наумник // Научно – производственный журнал «Зернобобовые и крупяные культуры». – 2016. – No1(17). – С. 78–83.

15. Lovegrove, A. Role of polysaccharides in food, digestion, and health / A. Lovegrove, C.H. Edwards, I. De Noni // Critical reviews in food science and nutrition. – 2017. – Vol. 57 (2). – P. 237–253.

16. Филлипс, Г.О. Справочник по гидроколлоидам перевод с англ. под редакцией Кочетковой А.А. и Сарафановой Л.А. / Г.О. Филлипс. – СПб.: ГИОРД, 2006. -536 с.

17. HoltekjØlen, A.K. Antioxidant properties and sensory profiles of breads containing barley flour / A.K. HoltekjØlen, Berg H, S.H. Knutsen et. al. // Food Chemistry. – 2008. – Vol. 110(2) – P. 414–421.

УДК 579.64

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ АКТИНОБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОЧВ ПОД HERACLEUM SOSNOWSKYI MANDEN

Е.В. Товстик, И.Г. Широких, А.В. Сазанов

Вятский государственный университет, Киров, Россия

Неотъемлемым условием получения экологически безопасной растениеводческой продукции является разработка биологических препаратов на основе метаболитов высокоэффективных штаммов микроорганизмов [1, 2]. Являясь природными соединениями, микробные метаболиты исключают загрязнение почвы, не аккумулируются в окружающей среде, легко подвергаются деструкции [3]. Ожидается, что к 2020 году, доля рынка препаратов на основе микроорганизмов, стимулирующих рост и обеспечивающих защиту растений от инфекций, может превысить глобальный рынок химических средств защиты растений [4]. При этом основу рынка могут составить препараты как на основе микроскопических грибов (Ampelomyces, Coniothyrium, Paecilomyces, Phlebiopsis, Trichoderma), так и бактерий (Bacillus, Pseudomonas, Rhizobium, Serratia), включая представителей рода Streptomyces [5].

Применительно к сельскому хозяйству актинобактерии рода *Streptomyces* рассматривают как потенциальные продуценты сидерофоров, антибиотиков и других биологически активных веществ [6–8]. Основным субстратом, из которого они могут быть выделены, является почва, ризосфера растений и др. [9–11].

Цель работы – скрининг штаммов актинобактерий, перспективных для биотехнологического применения в сельском хозяйстве.

Образцы почв для выделения актинобактерий отбирали в местах массового произрастания *Heracleum sosnowskyi* Manden вблизи г. Кирова (№ 058030˚380′ Е 049036˚683′) и в Фалёнском районе Кировской области (№ 058021˚558′ Е 051033˚533′) (площадки № 1 и 2 соответственно). Содержание $C_{орг.}$ в почве составило соответственно 5,9 и 6,5 %, величина pH_{KCl} – 6,8 и 4,4 ед.

Образцы воздушно-сухой почвы суспендировали в 100 мл стерильной дистиллированной воды, с последующим разведением и высевом в трёхкратной повторности на казеин-глицериновый агар и плотную питательную среду с пропионатом натрия. Посевы инкубировали при 27 °С в течении 7–10 суток. Из выросших на средах колоний были выделены 40 изолятов актинобактерий. Хранение культур осуществляли на среде Гаузе 1 [12].

Скрининг полученных изолятов актинобактерий на биотехнологическую пригодность осуществляли путем анализа их антагонистической активности против фитопатогенных грибов из родов *Fusarium, Ulocladium, Alternaria, Trichoderma* и бактерий *Pseudomonas putida, Erwinia herbicola* методом диффузии в агар. Способность к синтезу индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) оценивали в соответствии с Meudt et al. (1967), целлюлолитическую активность изолятов – на плотной питательной среде Гетчинсона с карбоксиметилцеллюлозой (КМЦ), протеолитическую активность – на плотной питательной среде, содержащей бычий сывороточный альбумин [13–15].

Всего в ходе исследования в чистую культуру было выделено 40 штаммов актинобактерий. Скрининг показал, что наличие антагонистической активности у актинобактерий не зависит от места отбора проб почвы (рис. 1).

Изоляты проявляли бактерицидную, антифунгальную и комплексную активность. В большей степени у них был выражен антагонизм по отношению к бактериальным тест-культурам (табл.).

Таблица Антагонизм изолятов актинобактерий, выделенных из почв под *H. sosnowskyi*, в отношении тест-культур

Образец почвы	Доля антагонистически активных изолятов против тест-культур, %						
	1	2	3	4	5	6	7
1	0	5	10	10	5	60	25
2	10	10	0	10	0	55	5

Примечание: 1 – *F. culmorum*, 2 – *F. proliferatum*, 3 – *Ulocladium* sp., 4 – *Alternaria* sp., 5 – *Trichoderma* sp., 6 – *P. putida*, 7 – *E. herbicola*

Всего в ходе изучения антагонистической активности у 60 и 55 % штаммов, выделенных из почв площадок 1 и 2 соответственно, обнаружен антагонизм против *P. putida*. Доля изолятов с антифунгальной и комплексной активностью в отношении исследуемых тест-культур не превысила 20 %.

Процентное содержание изолятов актинобактерий, способных к синтезу ИУК варьировало от 5 до 10 % от общего количества выделенных штаммов (рис. 2).

Доля изолятов с целлюлолитической активностью составила 85 и 90 % от общего количества штаммов, выделенных из почв под *H. sosnowskyi*, соответственно на площадках 1 и 2. При этом соотнесение доли изолятов с низкой и высокой целлюлолитической активностью позволило заключить, что из почвы, характеризующейся меньшей кислотностью, доля изолятов с высокой целлюлолитической активностью была выше на 40 % (рис. 3).

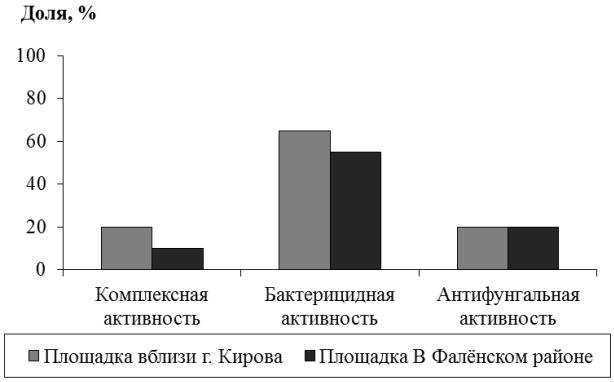


Рис. 1. Доля антагонистически активных изолятов от общего числа актинобактерий, выделенных из почв под H. sosnowskyi

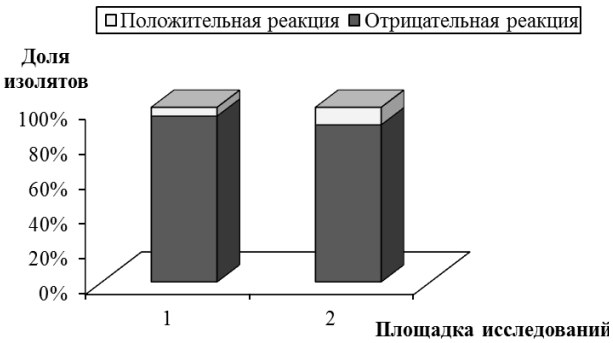


Рис. 2. Доля изолятов актинобактерий из почв под H. sosnowskyi, обладающих способностью к синтезу индолил-3-уксусной кислоты

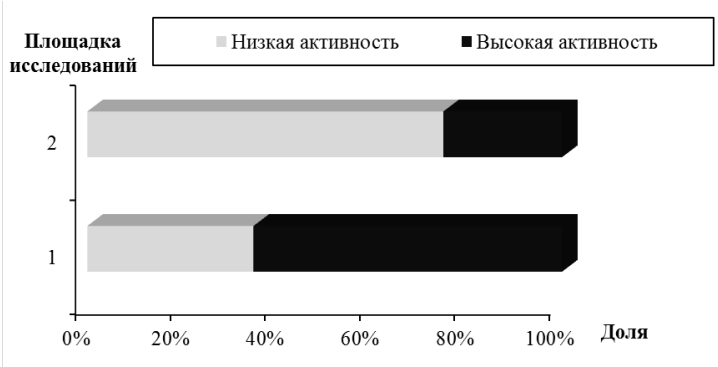


Рис. 3. Доля изолятов актинобактерий из почв под H. sosnowskyi, с разной целлюлолитической активностью

Исследованные штаммы актинобактерий не обладали протеолитической активностью.

В качестве перспективных агентов биоконтроля были отобраны штаммы 1N8, 1K6, 3K9; стимуляторов роста растений – *S.* sp. 1K6, 3N6, 3K8; агентов для биоконверсии трудноразлагаемых отходов растениеводства – *S.* sp. 1N7, 1K8, 1K10, 3K9.

Таким образом, в ходе скрининговых исследований было показано, что из общей выборки штаммов актинобактерий, выделенных из почв под *H. sosnowskyi*, чаще всего встречаются изоляты с бактерицидной активностью, реже – с антифунгальной. Несмотря на то, что доля штаммов, обладающих целлюлолитической активностью выше в более кислых почвах, в них чаще встречаются изоляты актинобактерий с низкой целлюлолитической активностью. В почвах под *H. sosnowskyi*, встречаются актинобактерии, способные к синтезу ИУК, однако их доля от общего числа выделяемых штаммов незначительна. По комплексу признаков с целью дальнейшей оценки биотехнологической пригодности для сельского хозяйства рекомендовано 8 штаммов *Streptomyces* sp.: 1N7, 1N8, 1K6, 1K8, 1K10, 3K8, 3K9, 3N6.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых учёных – кандидатов наук (*МК-2880.2018.5*).

ЛИТЕРАТУРА

1. Trivedi P.P., Schenk P.M., Wallenstein M.D., Singhet B.K. Tiny Microbes, Big Yields: enhancing food crop production with biological solutions // Microbial Biotechnology. 2017. V. 10. № 5. P. 999–1003.

2. Муродова С.С., Давранов К.Д. Комплексные микробные препараты. Применение в сельскохозяйственной практике // Biotechnologia Acta. 2014. № 6. С. 92–101.

3. Дятлова К.Д. Микробные препараты в растениеводстве // Соросовский образовательный журнал. 2001. Т. 7. № 5. С. 17–22.

4. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https:// www.marketsandmarkets.com (Дата обращения 24.07.19).

5. Mazzola M., Freilich S. Prospects for Biological Soilborne Disease Control: Application of Indigenous Versus Synthetic Microbiomes // Phytopathology. 2017. V. 107. № 3. P. 256–263.

6. Oikawa H., Ogawa H., Hosono K. et al. Desferrioxamine E produced by *Streptomyces griseus* stimulates growth and development of *Streptomyces tanashiensis* // Microbiology. 2005. V. 51. № 9. P. 2899–2905.

7. Kim B.Y., Bae M.H., Ahn J.H. et al. Isolation and Characterization of Actinomycete Strain BK185 Possessing Antifungal Activity against Ginseng Root Rot Pathogens // The Korean Journal of Pesticide Science. 2014. V. 18. № 4. P. 396–403.

8. Khebizi N., Boudjella H., Bijani C. et al. Oligomycins A and E, major bioactive secondary metabolites produced by *Streptomyces* sp. strain HG29 isolated from a Saharan soil // Journal de mycologie medicale. 2018. V. 28. № 1. P. 150–160.

9. Гришко В.Н., Сыщикова О.В., Зенова Г.М. и др. Мицелиальные актинобактерии засоленных почв аридных территорий Украины и России // Почвоведение. 2015. № 1. С. 81–86.

10. Sarmiento-Vizcaíno A., Espadas J., Martín J. et al. Atmospheric precipitations, hailstone and rainwater, as a novel source of *Streptomyces* producing bioactive natural products // Frontiers in microbiology. 2018. V. 9. P. 773.

11. Широких И.Г. Актиномицеты в ризосфере некоторых сельскохозяйственных растений // Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты: сб. мат. докл. / Отв. ред. Вл. В. Кузнецов. М: Изд-во АНО «Центр содействия научной, образовательной и просветительской деятельности «Соцветие», 2017. С. 75.

12. Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А., Терехова Л.П., Максимова Т.С. Определитель актиномицетов. Роды *Sreptomyces, Streptoverticillium, Chainia*. М.: Наука, 1983. 248 с.

13. Meudt W.J., Gaines T.P. Studies on the oxidation of indole-3-acetic acid by peroxidase Enzymes. Colorimetric Determination of Indole-3-Acetic Acid Oxidation Products // Plant Physiology. 1967. № 42. P. 1395–1399.

14. Teather R.M., Wood P.J. Use of Congo red-polysaccharide interaction in erumeration and characterization of cellulolytic bacteria the bovine rumen // Appl. Environ. Microbiol. 1982. V. 43. P. 777–780.

15. Fotedar R., Al-Hedaithy S.S. Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* and *C. dubliniensis* // Mycoses. 2005. V. 48. P. 62–67.

УДК 636.2

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОНСЕРВИРОВАННОГО СЕНАЖА В КОРМЛЕНИИ БЫЧКОВ

И.В. Миронова, Е.В. Позднякова, А.М. Багаутдинов, Х.Х. Тагиров, Ю.Н. Чернышенко

Башкирский государственный аграрный университет, Уфа, Россия
ФКУ НИИ ФСИН России, Москва, Россия

Увеличение количества и качества продуктов сельскохозяйственного производства представляет собой наиболее важную и сложную проблему аграрной науки и практики. Достижения науки и передовой практики подтверждают, что основой устойчивого роста продуктивности животноводства является обеспечения животных полноценным кормлением [1–5].

Процесс совершенствования кормовой базы можно организовать двумя способами: увеличением урожайности кормовых культур и пастбищ; использованием современных технологий заготовки и хранения кормов, для повышения их качества и питательной ценности [6].

Таким образом, поиск методов заготовки и хранения кормов на стойловый период, которые бы уменьшили нарушение естественного состояния питательных веществ свежих растений, имеет большое практическое значение.

Использование при заготовке корма консервантов в корма связано с их сохранностью, поскольку потери кормовой массы без их применения достигает 30 %. Кроме того, консерванты обладают способностью подавлять развитие нежелательных микроорганизмов, вызывающих потери питательных веществ и энергии. Следует отметить, что реальное потребление консервантов намного ниже потребностей российского животноводства. Это связано с тем, что более половины поголовья крупного рогатого скота находится в хозяйствах населения, которые, как правило, консервантами не пользуются. В тоже время не все средние и крупные сельскохозяйственные предприятия находятся в устойчивом финансовом положении и не имеют возможностей для закупок консервантов. Важно отметить, что применение консервантов экономически выгодно хозяйствам: расходы на них окупаются за счет значительного сокращения потерь кормовой массы, улучшения показателей переваримости питательных веществ и конверсии корма и, как следствие, повышения продуктивности скота. Поэтому, несмотря на все трудности, можно прогнозировать дальнейший рост использования силосных заквасок и химических консервантов [7–9].

В настоящее время насчитывают десятки хорошо изученных и проверенных практикой силосных заквасок и консервантов. Особый интерес, на наш взгляд, принадлежит новой закваске «Биотроф», разработанной заводом «Биотроф» (г. Санкт-Петербург).

Таким образом, сравнительный анализ относительной скорости роста и коэффициента увеличения живой массы с возрастом черно-пестрых бычков, при использовании сенажа, приготовленного с разной концентрацией рабочего раствора закваски «Биотроф», имеет научное и практическое значение.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыт был организован в условиях Республики Башкортостан в Чекмагушевском районе в ООО «Алга» в период с 2016 по 2017 гг.

Сенаж из люцерны готовили в четырех траншеях, первую из которых закладывали без консервантов, вторую – с консервантом «Биотроф» из расчета 2 л рабочего раствора на 1 т массы, третью – 4 л и четвертую – 6 л, соответственно. Для приготовления рабочего раствора, который использовали для обработки консервируемой массы, 1 литр препарата разводили в 500 л воды.

Относительную скорость роста и коэффициент увеличения живой массы с возрастом мы определяли расчетным методом.

Результаты собственных исследований. Известно, что достаточно информативным показателем, характеризующим напряженность роста, является относительная скорость роста животных. Полученные данные и их анализ свидетельствуют о межгрупповых различиях по этому показателю (табл. 1).

Таблица 1 Относительная скорость роста подопытных бычков, %

Возрастной период, мес	Группа			
	контрольная	опытная		
		I	II	III
10–12	16,81	18,01	18,89	18,88
12–15	21,09	22,34	22,63	22,34
15–18	16,43	17,30	17,46	17,42
10–18	53,16	56,27	57,51	57,20

Исследованиями установлено, что во все возрастные периоды величина изучаемого показателя была выше у особей опытных групп. Бычки контрольной группы уступали особям I опытной группы по относительной скорости роста в период с 10 до 12 мес. на 1,20 %; II опытной группы – на 2,08 % и III опытной группы – на 2,07 %; с 12 до 15 мес. – на 1,25 %; 1,55 % и 1,26 %; с 15 до 18 мес. – на 0,87 %; 1,04 % и 1,00 %, а за весь период наблюдений с 10 до 18 мес. – на 3,11 %; 4,35 % и 4,04 %.

Известно, что в формировании телосложения молодняка решающее значение имеют первые полтора года жизни. В этой связи нами вычислялся коэффициент увеличения промеров с возрастом (табл. 2).

Таблица 2 Увеличение промеров тела бычков к 18 мес. в сравнении с 10 мес

Промер	Группа			
	контрольная	опытная		
		I	II	III
Высота в холке	1,16	1,17	1,19	1,18
Высота в крестце	1,16	1,16	1,17	1,16
Глубина груди	1,38	1,42	1,43	1,43
Ширина груди за лопатками	1,69	1,72	1,76	1,75
Обхват груди за лопатками	1,33	1,35	1,36	1,36
Косая длина туловища	1,38	1,42	1,43	1,43
Ширина в маклоках	1,43	1,46	1,47	1,47
Полуобхват зада	1,24	1,26	1,27	1,27
Обхват пясти	1,27	1,29	1,31	1,30

Судя по величине коэффициента увеличения промеров тела от 10 до 18 мес., у бычков всех групп наблюдалась практически одинаковая закономерность роста и развития.

Характерно, что наименьшим уровнем коэффициента увеличения промеров с возрастом у бычков всех групп отличались такие промеры как высота в холке, высота в крестце и полуобхват зада. Межгрупповые различия были несущественны. В то же время отмечалась тенденция превосходства бычков II опытной группы, получавших в составе рациона сенаж с консервантом «Биотроф» в дозе 4 л/т.

Изучение мясной продуктивности бычков проводилось по данным контрольного убоя, и было установлено, что молодняк всех подопытных групп характеризовался высокими убойными качествами (табл. 3).

Таблица 3 Результаты контрольного убоя подопытных бычков

Показатель	Группа			
	контрольная	опытная		
		I	II	III
Предубойная живая масса, кг	489,0 ± 6,82	495,7 ± 4,97	503,0 ± 3,24	501,3 ± 2,48
Масса парной туши, кг	269,3 ± 6,58	275,7 ± 1,82	282,2 ± 2,32	281,0 ± 2,12
Выход туши, %	55,1 ± 0,62	55,6 ± 0,23	56,1 ± 0,12	55,9 ± 0,08
Масса внутреннего жира-сырца, кг	13,5 ± 0,21	14,0 ± 0,44	14,6 ± 0,25	14,5 ± 0,26*
Выход внутреннего жира-сырца, %	2,77 ± 0,08	2,83 ± 0,08	2,90 ± 0,24	2,88 ± 0,06
Убойная масса, кг	282,8 ± 6,37	289,8 ± 2,12	296,8 ± 2,73*	295,5 ± 2,00*
Убойный выход, %	57,8 ± 0,54	58,5 ± 0,27	59,0 ± 0,21*	58,9 ± 0,11*

Приём материалов статей по адресу: actbio@mail.ru

У бычков контрольной группы по сравнению со сверстниками опытных групп предубойная живая масса была ниже на 1,37–2,86 %; масса парной туши – на 2,38–4,79 %, выход туши – на 0,5–1,0 %; убойная масса – на 2,48–4,95 % и убойный выход – на 0,7–1,2 %.

Таким образом, бычки всех подопытных групп характеризовались высокими убойными качествами. При этом по основным показателям мясной продуктивности преимущество было на стороне животных, потребляющих консервированный сенаж закваской «Биотроф».

Экономический расчет показал, что бычки опытных групп характеризовались большей суммой производственных затрат на 0,70–1,01 %, но более высокая мясная продуктивность бычков опытных групп, способствовала снижению себестоимости 1 ц прироста живой массы на 2,66–3,97 %, повышению прибыли на 11,06–24,29 % и уровня рентабельности производства говядины на 2,0–4,4 %.

Таким образом, введение в рацион бычков черно-пестрой породы консервированного сенажа из люцерны является экономически эффективным. При этом минимальной себестоимостью 1 ц прироста живой массы, более высокой прибылью и уровнем рентабельности характеризовались бычки, получавшие в составе рациона сенаж, с консервантом «Биотроф» в дозе 4 л рабочего раствора на 1 т зеленой массы.

ЛИТЕРАТУРА

Латыпова, Г.Ф. Изучение и использование влияния цеолитов на физиологические состояние и продуктивность сельскохозяйственных животных / Г.Ф. Латыпова, А.Е. Андреева // В сборнике: Перспективы развития производства продовольственных ресурсов и рынка продуктов питания материалы международной научно-практической конференции (в рамках VIII международной специализированной выставки "ПродУрал-2002"). 2002. С. 182–184.

Mironova, I.V. Nutrient and energy digestibility in cows fed the energy supplement «Felucen» // I.V. Mironova, V.I. Kosilov, A.A. Nigmatyanov, R.R. Saifullin, O.V. Senchenko, E.N. Chernenkov, E.R. Chalirachmanov // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2018. Т. 9. № 6. С. 18–25.

Минибаев, В.Р. Гематологические показатели коров чёрно-пёстрой породы при вскармливании им сбалансированного кормового комплекса Фелуцен К 1 – 2 / В.Р. Минибаев, Р.Р. Сайфуллин, Н.М. Губайдуллин // Вестник мясного скотоводства. 2017. № 3 (99). С. 140–146.

Миронова, И.В. Эффективность использования глауконита в кормлении бычков бестужевской породы и его влияние на качество мяса / И.В. Миронова, С.Г. Канарейкина, А.А. Нигматьянов // В сборнике: Агроэкологические и социально-экономические проблемы и перспективы развития АПК Зауралья Материалы региональной научно-практической конференции. Министерство образования и науки РФ, Зауральский филиал ФГОУ ВПО «Башкирский государственный аграрный университет». 2009. С. 101–105.

Латыпова, Г.Ф. Использование природных минеральных добавок для повышения биоресурсной продуктивности кур / Г.Ф. Латыпова // диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Башкирский государственный аграрный университет. Уфа, 2006.

Миколайчик, И.Н. Современные аспекты выращивания молодняка крупного рогатого скота / И.Н. Миколайчик, Л.А. Морозова, А.А. Матасов // Кормление сельскохозяйственных животных и кормопроизводство. 2014. № 5. С. 17–25.

Усков, Г.Е. Силос из козлятника восточного в кормлении молодняка крупного рогатого скота / Г.Е. Усков, С.А. Клементьев, И.Г. Усков // Кормление сельскохозяйственных животных и кормопроизводство. 2016. № 8. С. 18–23.

Тагиров, Х.Х. Качество и кормовое достоинство сенажа из люцерны с использованием консервантов «Лаксил» и «Силостан» / Х.Х. Тагиров, Н.В. Фисенко // Вестник мясного скотоводства. 2017. № 3 (99). С. 166–170.

Фисенко, Н.В. Влияние консервантов «Лаксил» и «Силостан» на биологические особенности развития бычков / Н.В. Фисенко, Х.Х. Тагиров, З.А. Бикбова // Состояние и перспективы увеличения производства высококачественной продукции сельского хозяйства: материалы I совместной с институтом животноводства Таджикской академии сельскохозяйственных наук Международной научно-практической конференции (23–25 ноября 2017 г.) Уфа: ФГБОУ ВО Башкирский ГАУ, 2017. С. 200–202.

УДК 638.154.4–084

РАСТИТЕЛЬНЫЕ ИСТОЧНИКИ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ БОРЬБЫ С ВОЗБУДИТЕЛЕМ АСКОСФЕРОЗА ПЧЕЛ

В.И. Домаш[1], М.И. Черник[2], М.А. Белозерский[3], Я.Е. Дунаевский[3], О.А. Иванов[1], Т.Г. Шабашова[1]

[1]Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси, Минск, Беларусь
[2]Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского, Минск, Беларусь
[3]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, Россия

Благодаря хорошей приспособляемости к различным условиям внешней среды микроскопические грибы успешно выдерживают конкуренцию с другими микроорганизмами и часто вытесняют их в жизненной борьбе с того или иного субстрата. Патогенные грибы многочисленны, а вызываемые ими заболевания человека, животных и насекомых весьма разнообразны. Патогенными для медоносной пчелы являются грибы родов Ascosphaera, Mucor, Rhizopus, Aspergillus и др.

Физические, химические, биологические, стрессовые факторы (экстремальные температуры, высокая влажность, загрязнение окружающей среды пестицидами, бесконтрольное применение антибиотиков, паразитарные инвазии) вызывают снижение резистентности организма насекомого, подавляя иммунную систему и нарушая защитные барьеры оболочек тела, пищеварительного тракта, трахей и способствуют развитию грибковых инфекций пчел.

Споры грибковых инфекций пчел, могут годами находиться в ульях, на пасеке и перейти в активное состояние в любой момент. Одно из таких заболеваний – аскосфероз пчел, который представляет серьезную угрозу заболевшим семьям, способствует ослаблению насекомых, снижению медосбора и опыления, иногда приводит к гибели. Болезнь наносит ущерб всей отрасли как самостоятельно, так и в купе с другими инфекциями и инвазиями.

Аскосфероз пчел (*Ascosphaerosis*) – инфекционная болезнь, вызываемая грибом *Ascosphaera apis*, характеризующаяся поражением трутневых, пчелиных личинок и куколок, в редких случаях поражаются маточные личинки.

Существующие методы борьбы с микозами пчел в большинстве основаны на применении, в основном, препаратов химического происхождения. Однако вопрос о вредном влиянии препаратов, полученных методом химического синтеза, всегда интересовал и тревожил ученых и пчеловодов. В связи с этим, возникла необходимость внедрения в пчеловодческую практику экологически чистых средств с использованием лекарственных растений. Разностороннее изучение вопроса о применении лекарственных растений в практике пчеловодства показало, что лекарственные растения весьма широко и успешно применяются пчеловодами для борьбы с различными болезнями пчел, для стимуляции роста и развития пчелиных семей, для увеличения их продуктивности. Известно, что любые препараты, приготовленные с растительным сырьём, экологически чистые, не оказывают вредного воздействия на продукты пчеловодства и жизнедеятельность пчелиных семей, а также имеют целый ряд преимуществ, поскольку содержат комплекс биологически активных веществ, которые при введении в организм, даже в очень малых количествах, вызывают определенный физиологический эффект, благоприятно влияют на организм, обладают меньшим побочным действием, лучше переносятся организмом.

Для получения экзогенных пептидаз гриба и исследования действия на него растительных биологически активных веществ необходимо было разработать способы выращивания мицелия патогена. Особое внимание было уделено также белкам-ингибиторам протеолитических ферментов, которые обладают регуляторными, антиоксидантными и защитными свойствами. [1,2]. Растительные ингибиторы протеиназ обнаружены в тканях животных, растений и микроорганизмов. Способность белковых ингибиторов подавлять активность протеиназ млекопитающих, насекомых и микроорганизмов легли в основу представлений об их защитных функциях. Большое внимание в последнее время уделяют поиску ингибиторов среди дикорастущих видов растений, поскольку они являются поистине неоценимым и богатейшим источником разнообразных форм этих белков. Культуру энтомопатогена (*Ascosphaera apis*) получали из рабочей коллекции микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». Исследовали рост гриба на различных питательных средах: картофельно-декстрозный агар с 0,4 % дрожжевым экстрактом, сусловый агар и агар Сабуро. Посевы гриба делали на поверхность агара в центре чашки Петри одной точкой при помощи микологической иглы. Изучали рост колоний гриба в течение 10 суток. Результаты исследований показали, что оптимальной средой для выращивания мицелия гриба является картофельно-декстрозный агар с 0,4 %-ным дрожжевым экстрактом. На рис. 1 представлен общий вид 3-х дневного мицелия.

Исследования показали, что оптимальные условия для прорастания спор, роста и развития гриба: pH 5,5–7,5 и температура 30° С, такие же условия были использованы для культивирования гриба в жидкой среде Чапека с добавлением казеина и пептона. Гриб выращивали на протяжении 20 суток. Наиболее высокая активность экзопептидаз наблюдалась на 15–17 сутки. Протеазы в культуральной жидкости осаждали сульфатом аммония до 80 %-ного насыщения и исследовали ее физико-химические свойства. Оказалось, что активность фермента ингибируется ФМСФ, что указывает на принадлежность его к классу сериновых протеиназ (химотрипсиноподобным и / или субтилизиноподобным) и металлопротеазам.

Для поиска биологически активных растительных веществ были отобраны 20 видов культурных и дикорастущих растений флоры Беларуси. Было установлено, что наиболее высокая активность ингибиторов протеиназ (трипсина) характерна для корней крапивы двудомной. Этот наиболее распространенный вид растений был взят в качестве растительного сырья для получения препарата защитного действия. Воздушно сухие корневище и корни крапивы размалывали в муку, которую экстрагировали 0,2 М NaCl в соотношении 1:20 соответственно, в течение 10–12 часов при температуре 4–5° С, смесь центрифугировали 15 минут при 6000 об/мин и температуре 4–5ºС. Экстракт подкисляли 0,5 н HCl до pH 4,0 в течение 2–3 часов до образования осадка, который снова центрифугировали при 6000 об/мин в течение 15 мин. Из полученной надосадочной жидкости высаливали белки сульфатом аммония до 80 % насыщения в течение 24 часов, после центрифугирования осадок суспендировали в 30 мл дистиллированной воды и наносили на колонку с акрилексом Р-30 (гелем на основе полиакриламида), уравновешанной дистиллированной водой. Элюцию осуществляют дистиллированной водой при скорости 20 мл/час. Общий профиль хроматографии представлен на рис. 2.



Рис. 1 – Общий вид 3-х дневного мицелия Ascosphaera apis

Ингибиторные фракции белка выходили в обьеме элюата 80–180 мл. Их собирали и лиофильно высушивали. Как показали исследования, ингибитор принадлежит к классу сериновых протеиназ, обладает высокой термо – и pH-устойчивостью. Белок содержит ингибитор трипсина с молекулярной массой 8–22 кДа, белок-ингибитор химотрипсина с молекулярной массой 23–25 кДа, белок с молекулярной массой 50–70 кДа и дистиллированную воду. Соотношение компонентов следующее: белок-ингибитор трипсина – 40, белок-ингибитор химотрипсина – 20, белок-10 мас.%, остальное – вода.

Результаты исследований показали, что при внесении растительного препарата белковых ингибиторов в среду они угнетали прорастание спор и активность экзогенных пептидаз энтомопатогена *Ascosphaera apis* на 50–80 %. (табл. 1).

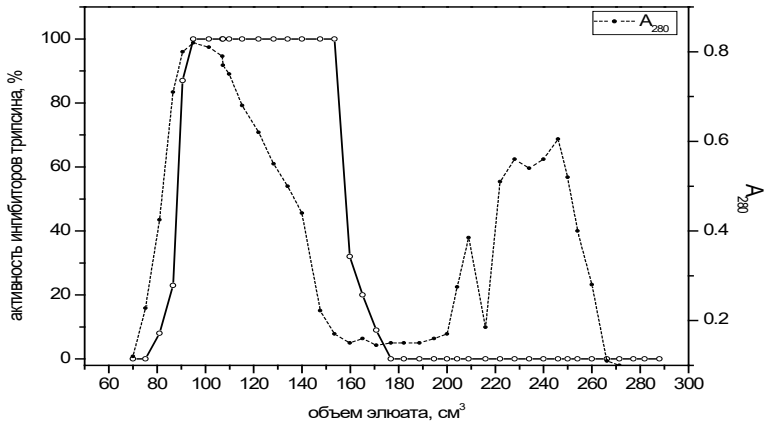


Рис. 2 – Гель-хроматография белков-ингибиторов трипсина из корневищ крапивы двудомной (Urtica dioica) на акрилексе Р-30

Таблица 1– Действие препарата на активность протеолитического фермента гриба *Ascosphaera apis*

Концентрация, %	Активность протеолитического фермента, ЕА/мл	% угнетения
Контроль (вода)	48,0	-
0,25	25,2	47,5
0,50	10,0	79,2

Угнетение площади роста энтомопатогена на 6 сутки составляло 88–100 %. (табл. 2).

Таблица 2. Действие различных концентраций препарата на площадь роста ($см^2$) энтомопатогена *Ascosphaera apis*

Концентрация, мкг/мл	Площадь через 6 суток роста, $см^2$	% угнетения
Контроль(вода)	2,5	-
250	0,3	88
500	0	100

Таким образом, препарат полученный нами из корневищ крапивы двудомной (*Urtica dioica*) позволяет использовать большие запасы данного вида растений в Республике Беларусь для борьбы с энтомопатогенным грибом *Ascosphaera apis*, вызывающего аскофероз пчел. [3,4]. Планируется дальнейшая работа по испытанию препарата в производственных условиях.

Работа поддержана грантами БРФФИ № Б18Р-053 и РФФИ № 18–54–0008-Бел.

ЛИТЕРАТУРА

Мосолов В.В., Валуева Т.А. Ингибиторы протеиназ и их функции у растений. // Прикл. биохимия и микробиол. -2005, Т.41, № 3. – С. 261–283.

Мосолов В.В., Григорьева Л.И., Валуева Т.А. Участие протеолитических ферментов и ингибиторов в защите растений (обзор). // Прикл. биохимия и микробиол. -2001. – Т.37, № 2. – С. 131–140.

Способ получения средства для борьбы с энтомопатогенным грибом Ascosphaera apis : пат. 22490 С2 Респ. Беларусь, МПК А 61 К 36/185 (2006) / В.И. Домаш, М.И. Черник, М.А. Белозерский, Я.Е. Дунаевский, О.А. Иванов, Т.Г. Шабашова, заявитель ГНУ "Институт экспериментальной ботаники имени В.Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси". – № а 20140085; заяв. 31.01.14; опубл. 30.10.15 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2019. – № 2. – С. 117–118.

Состав для борьбы с энтомопатогенным грибом Ascosphaera apis : пат. 22491 С2 Респ. Беларусь, МПК А 61 К 36/185 (2006) / В.И. Домаш, М.И. Черник, М.А. Белозерский, Я.Е. Дунаевский, О.А. Иванов, Т.Г. Шабашова, заявитель ГНУ "Институт экспериментальной ботаники имени В.Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси". – № а 20140086; заяв. 31.01.14; опубл. 30.10.15 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2019. – № 2. – С. 118.

УДК 641.05

ВЛИЯНИЕ ПОЛИСАХАРИДНОГО КОМПЛЕКСА ЛЮЦЕРНЫ НА СОРБИРОВАННЫЕ СВОЙСТВА ПИЩЕВЫХ СИСТЕМ

Л.Э. Глаголева, Александрова А.В

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время все более актуальной становится проблема состояния здоровья людей. Возрастающее внимание мирового научного сообщества к вопросу загрязнения окружающей среды и организма человека тяжелыми металлами, привел к необходимости детального изучения механизма их поступления, распределения и накопления в организме их токсичного действия. В организм токсичные вещества могут попадать через органы дыхания (80–90 % в условиях производств), кожу и желудочно-кишечный тракт.

Питание является одним из важнейших факторов в профилактике и лечении заболеваний. Известно, что более 30 % населения страны имеет избыточный вес и около 10 млн. человек страдают сахарным диабетом, около 50 млн. нуждаются в диете антисклеротической направленности и примерно столько же в лечебнопрофилактических продуктах при заболевании органов пищеварения.

Проблема загрязнения окружающей среды и организма человека тяжелыми металлами привела к необходимости детального изучения механизма их поступления, распределения и накопления в организме их токсичного действия. Неблагоприятная экологическая обстановка во многих регионах страны способствует попаданию вредных химических и биологических веществ в пищевые цепи, конечным звеном которых является человек

При попадании в организм человека в больших количествах тяжелые металлы начинают накапливаться в почках и печени. Металлы, присутствуя в живых организмах в ничтожно малых количествах, выполняют весьма важные функции, входя в состав биологически активных веществ. Значительные отклонения от соотношений концентраций металлов вызывают отрицательные, а часто губительные, последствия для живых организмов.

Воздействие на организм с тяжелых металлов можно уменьшить за счет систематического употребления продуктов питания, обладающих высокой сорбционной активностью. В связи с этим, перспективным направлением, является поиск эффективных физиологических активных веществ, позволяющих повысить сопротивляемость организма к негативным факторам окружающей среды, ускорить процесс биотрансформации ксенобиотиков, увеличить содержание в пище веществ, участвующих в связывании и выведении из организма ядов и токсичных продуктов обмена, поддерживать собственные компенсаторные силы организма, способных снизить концентрацию контаминатов в организме человека до допустимого уровня. Поэтому введение растительных ингредиентов, содержащих пищевые волокна (ПВ) в рецептуры продуктов является актуальным. Известна сорбционная активность полисахаридных растительных комплексов в отношении тяжелых металлов, что делает перспективным введение растительных ингредиентов, содержащих пищевые волокна (ПВ) в рецептуры продуктов. С этой точки зрения перспективно использование растительного комплекса люцерны. Ведь главной задачей, стоящей перед пищевой промышленостью, является удволетворение физиологических потребностей населения в высоко-качественных, билогически полноценных и экологически безопасных продуктах питания.

Цель работы – исследование сорбционной активности растиельного комплекса люцерны по отношению к ионам тяжелых металлов Ni^{2+}, Pb^{2+}, Cd^{2+}.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования были выбраны измельченные зерна растительного комплекса люцерны сорта «ВЕГА 87» 1 репродукции, которая географически произрастает в Липецкой области.

В ходе проведения работы исследованы модельные системы: водный раствор (навеска 0,5); + 0,1 $см^3$ стандартных растворов тяжелых металлов (Cd^{2+}, Pb^{2+}, Ni^{2+}) концентрацией 10 мг/л. Исследование сорбции ионов Cd, Pb, Ni проводили в статических условиях, при температуре 40ºС, в зависимости от pH среды (3,0; 4,2; 5,0; 6,3; 7,4) и достижения равновесного состояния в исследуемых системах. В результате установлены экспериментальные зависимости, характеризующие изменение концентрации ионов Cd^{2+}, Ni^{2+}, Pb^{2+} от pH среды при введении в раствор измельченного растительного комплекса люцерны, на основании которых были построены ряды активности представленные на графиках 1, 2, 3.

Исходя из полученных данных, представленных на графиках активности растительного комплекса люцерны, можно сделать вывод, что исходные значения pH среды не влияют на сорбционную активность исследуемого объекта по отношению к ионам тяжелых металлов Cd^{2+}, Ni^{2+}, Pb^{2+}.

Высокую сорбционную способность растительного комплекса люцерны можно объяснить тем, что в состав растительного сорбента входят пищевые волокна, в том числе полисахариды. Обладая высокоразвитой поверхностью полисахариды способны сорбировать значительное количество Cd^{2+}, Ni^{2+}, Pb^{2+}. Сорбционные процессы, протекающие в статических условиях вне зависимости от природы взаимодействия между сорбентом и сорбируемым веществом, определяется диффузией, обуславливающей проникновение сорбируемого вещества вглубь структуры сорбента. Поэтому одним из важных факторов, оказывающих влияние на процесс сорбции, является продолжительность контакта фаз. Анализ полученных данных свидетельствует, что время достижения сорбционного равновесия в исследуемых системах составляет 30 – 40 мин. Были проведены исследования процесса сорбции в технологических средах (сыворотка твороженная, молоко, йогурт) наибольшая сорбционная активность была отмечена в сыворотке для ионов Pb^{2+} и составила 0,45 мг/л при начальных значениях 10 мг/л. Проведенные исследования подтвердили наличие сорбционной активности выбранного растительного комплекса в отношении ионов Cd^{2+}, Ni^{2+}, Pb^{2+}.

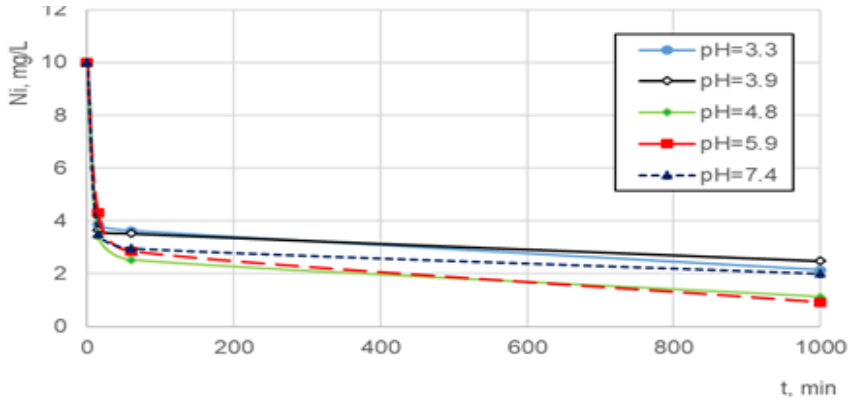


График 1 – Изменение концентрации ионов Ni^{2+}

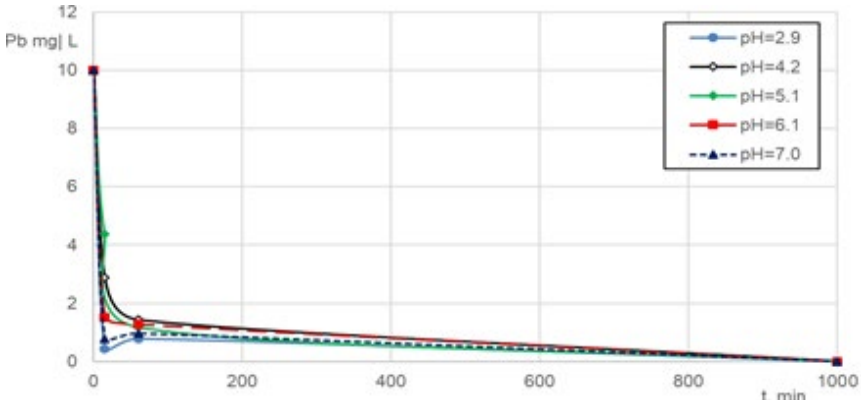


График 2- Изменение концентрации инов Pb^{2+}

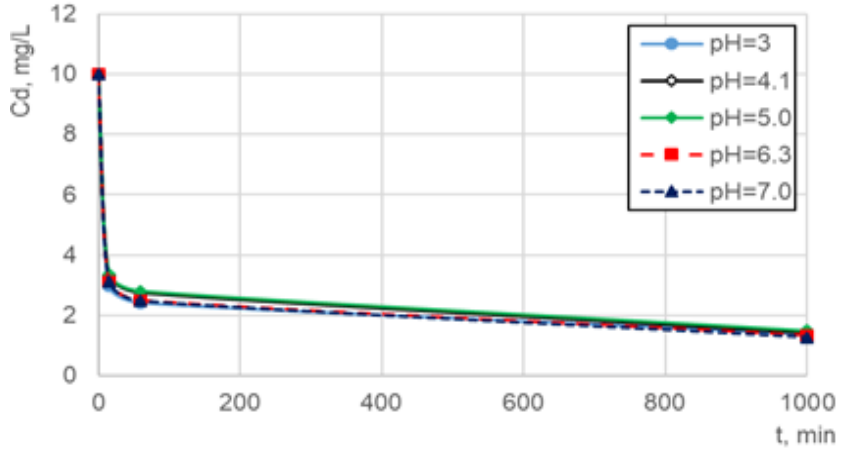


График 3- Изменение концентрации ионов Cd^{2+}

Экспериментально установленные значения позволяют сделать предположение, что растительный комплекс люцерны может быть использован в технологии производства принципиально нового пищевого продукта на молочной основе для усовершенствования его функциональной направленности, а именно для увеличения сорбционных свойств

Актуальная биотехнология

№3 (30), 2019

УДК 66.047

МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЕ МАРКЕРЫ LINARIA VULGARIS L.

О.А. Павлова[1], И.А. Владимиров[1], Д.Е. Полев[3], Д.И. Богомаз[1,2].

[1] ООО «Бигль, Санкт-Петербург, Россия

[2] Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

[3] ООО «Сербалаб»

Linaria vulgaris Mill. – широко известный вид растений из рода *Linaria*. сем *Plantaginaceae*. Большинство видов растений из рода *Linaria* являются эндемиками Средиземноморского региона, однако *L. vulgaris* вместе с рядом близкородственных видов демонстрирует необычный для представителей данного рода космополитизм. Она широко распространена на территории Евразии, в РФ её ареал охватывает всю Восточно-Европейскую равнину (кроме Прикаспийской низменности и крайнего Севера), большие районы Западно-Сибиской равнины, встречается льнянка обыкновенная и в других местах. На территории Северной Америки, куда *L. vulgaris* была завезена предположительно в 17 веке (Sing et.al, 2011), льнянка – инвазивное сорное растение, требующее мероприятий по контролю численности (Sing et.al, 2011) и инструмента для изучения динамики распространения и геногеографических исследований. *L.vulgaris* и её близкие, также космополитные родственники, например *L.dalmatica*, обладают характерной особенностью, отличающей их от эндемичных видов из того же рода – наличием в геноме вертикально наследуемых последовательностей агробактериальной клТ-ДНК (от. «клеточная» Т-ДНК) (Matveeva et al. 2012). Это редкое явление, кроме *Linaria* известное только в двух родах растений – табак *Nicotiana* (White et. al., 1983) и батат *Ipomaea* (Kyndt et.al., 2015). Для прояснения точного количества копий клТ-ДНК у *Linaria vulgaris* необходимо иметь референсную однокопийную последовательность в геноме, примеров которой у *Linaria* не выяснено, так как геном данного объекта не аннотирован. В качестве такой последовательности могут выступать микросателлитные маркеры (в случае, если для них будет показано менделевское наследование). Нами было принято решение о разработке панели микросателиитных маркеров для *Linaria vulgaris*.

Для предварительного поиска последовательностей-кандидатов, содержащих повторы микросателлитного типа, выполнили геномное секвенирование препарата ДНК из L.vulgaris (Образец 1 – Петергоф, Россия) с низким покрытием с помощью секвенатора Ion Torrent (TermoFisher Scientific). К консервативным частям 23 последовательностей-кандидатов подобрали комплекты Cy5-меченых праймеров для проведения фрагментного анализа ПЦР-продуктов с помощью фрагментного анализатора / секвенатора AlfExpress. Наборы праймеров тестировали на двух образцах ДНК географически удаленных друг от друга растений L.vulgaris (Образец 1 – Петергоф, Россия, Образец 2 – Хакассия, Россия). Пригодность последовательности и соответствующего ей комплекта праймеров для использования в качестве маркера оценивали по следующим критериям:

1) Набор праймеров должен давать на ДНК одного растения не более двух ПЦР-продуктов разной длины (обратное свидетельствует о наличии неспецифических продуктов амплификации или о возможной многокопийности маркера)

2) Длина хотя бы одного из продуктов ПЦР на ДНК растения из Петергофа (образец 1) должна с точностью до одного нуклеотида соответствовать расчетной (обратное свидетельствует о нецелевой амплификации).

В таблице 1 приведены сведения о последовательностях разработанных наборов микросателлитных праймеров, выявленных аллельных вариантах и подобранной температуре отжига для каждого конкретного маркера. С помощью маркера M009, показавшего наиболее высокую эффективность, оценили копийность Т-ДНК в *L.vulgaris*. Показано, что *L.vulgaris* содержит не одну, а как минимум две сложно устроенных вставки на гаплоидный геном (Vladimirov et.al. 2019).

Использование разработанного набора позволило проверить гипотезу о клональном характере популяций *L.vulgaris*. Характерной особенностью *L.vulgaris* является очень низкая всхожесть семян в совокупности с выраженной способностью вегетативного размножения с помощью корневищ, а также рост компактными группами, что наводит на мысли о том, что такие компактные группы являются клональными. Вопрос представляет большой интерес ввиду кажущейся несовместимости низкой всхожести семян с высокой инвазивностью и скоростью расселения вида, который за три столетия почти целиком освоил новый континент. Подробный микросателлитный анализ одной из изолированных групп растений, (10 растений, собранных на Заячьем острове Санкт-Петербурга с площади 2 м^2), показал наличие различий по длинам аллелей некоторых маркеров. Это указывает на то, что половое размножение при образовании подобных групп также имеет место.

Таблица 1.

№	Расчетная длина (согласно сиквенсам одной из аллелей)	Мотив	Список всех обнаруженных аллельных вариантов (на всех изученных растениях, включая популяционное исследование)	Праймеры (первый из пары содержит краситель cy5 на 5' – конце)	Tm	Номер последовательности в базе данных NCBI
M002	91	4 x GAA	91	GGCAAACAACCCAGAGAATC CGATCGGGAGTCACATGAT	60	MH298301
M003	81	7 x CA	81, 85, 91	TTCATCCATCTCGCCCTAC TATAGCTGTAATATACTGACTAACG	60	MH298302
M005	156	6 x GGA	156, 165, 171, 180	CTAACAAGAAATGGGTGGATGA TATAGGGACGAGTTGGTCAGAT	55	MH298303
M006	215	3 x CCAA, 3 x GGA, 12 x GT	210, 213, 215, 218	CGATGGAAATGTGATAGAACCA GCGTGTACTCCTTCCACTTTC	55	MH298304
M007	172	10 x AT	168, 170, 172, 176, 180, 186	CTAACTGCACACTTAGAAATAAGATG TTGTGAAGTAAGTTGTGAAGATGAA	55	MH298305
M009	144	5 x GTT	141, 144, 147, 153	GCAGAAGATTCATGTTCACGA ATCTGCACCCTATGAGATTTTG	55	MH298306
M010	218	11xGT, 6xGA	194, 214, 218, 220,	CACTTATGGGGCACACTT CCAAGTCCACAGTGCTCAAT	60	MH298307
M012	191	4xGGA	167, 176, 182, 191	GCCTATCACTAGGAGCTACTTCA TTAGGGTCTCTTCCACAAATGA	60	MH298308
M013	86	7xCCT	83, 86	CTTTTACGGCGACCCACAT AAGAGAAGCGAAGCGAGCA	60	MH298309
M014	101	6xGA	101	GGGTTTAGGCAACTTGTCAGT TTCCTATGTGGGATAGTGAAGC	55	MH298310
M015	105	9xGA	105, 107, 109, 111	TTTAACTTCGCCATCGTGA GCTCAAAGTTCTGGCTGTATTAC	60	MH298311
M016	179	9xTA	179	TGCCTTTGGTTTGATTTGCT TTGTATGGCACCACCATTATC	55	MH298312
M017	173	4xAAT	152, 167, 173, 179	GGGTTTGCACAATAGTTGTATTAG GTGTTTGAGAGTTTATGTGTCCA	55	MH298313
M018	268	11xATT	266, 268, 274, 280	TTGTACTGGCACGTAGGAAAT GAGGACTTCAAAATAAATGCCTT	60	MH298314
M019	183	3xCA, 9xCT	181, 183, 185	CGTCTGTTAGTGTCTGGTTACA GTAGAAATACTTGTGCTCAATAGAA	55	MH298315
M020	191	11xAT	191, 209	CACTTCTACAGAGCCTTCCAGA AGCTTAACAGCCCACAAACAT	60	MH298316
M021	202	10xAGT	200, 202	GTCGGCTCGTGAGATTCTAAT AGAGTCACAACTGGTGTATCGTA	60	MH298317
M023	193	5xCTC, 5xAAG	193	AGACTATCATGGAGACGCTGAA TTATCACTCGAATGGCTCGTA	55	MH298318

Одним из перспективных направлений использования микросателлитных маркеров может стать изучение путей расселения *L.vulgaris*, что может быть весьма интересно, принимая во внимание необычные особенности биологии *L.vulgaris*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sing, S.E. and R.K. Peterson. (2011). Assessing environmental risks for established invasive weeds: Dalmatian (*Linaria dalmatica*) and yellow (*L. vulgaris*) toadflax in North America. // *International Journal of Environmental Research and Public Health* 8(7) 2828–53.

2. White FF, Garfinkel DJ, Huffman GA, Gordon MP, Nester EW (1983). Sequence homologous to *Agrobacterium rhizogenes* TDNA in the genomes of uninfected plants. Nature 301:348–350.

3. Matveeva TV, Bogomaz DI, Pavlova OA, Nester EW, Lutova LA (2012) Horizontal gene transfer from genus *Agrobacterium* to the plant *Linaria* in nature. Mol Plant Microbe Interact 25(12) : 1542–1551. https://doi: 10.1094/MPMI-07–12–0169-R.

4. Kyndt T, Quispe D, Zhai H, Jarret R, Ghislain M, Liu Q, Gheysen G, Kreuzeb JF (2015) The genome of cultivated sweet potato contains *Agrobacterium* T-DNAs with expressed genes: An example of a naturally transgenic food crop. PNAS 112(18) : 5844–5849. https://doi: 10.1073/pnas.1419685112

5. Ivan A. Vladimirov, Olga A. Pavlova, Dmitrii E. Polev, Denis I. Bogomaz. cT-DNA in Linaria vulgaris L. is multicopy, inverted and homogenized. // 2019 https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2019/04/23/615328.full.pdf

УДК 663.4

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КЭНДИ СИРОПА В ПИВОВАРЕНИИ

М.М. Данина, О.Б. Иванченко*

Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия
** Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия*

Сегодня пиво остается наиболее популярным напитком не только в России, но и во всем мире. Более 95 % всего выпускаемого напитка промышленными пивоварнями приходится на лагерное пиво. Ассортимент выпускаемой пивоваренными заводами продукции постоянно расширяется, и сегодня мы можем наблюдать такие сорта как стауты, пшеничные эли и портеры [1,2]. Доля элей, т. е. пива верхового брожения очень мала, но с каждым годом можно заметить значительное расширение ассортимента [3–5]. Кроме того, все больше людей перестают пренебрежительно относиться к такому термину как "пивной напиток", а сорт "Бланш" уже стал неотъемлемой частью российского рынка пива. Все эти факторы, конечно же, повлияли и на минипивоваренные производства, которые проявляют также интерес к бельгийским крепким элям, что подразумевает использование "кэнди сиропов" или "кэнди сахаров".

Сахарные сиропы не редко используются в пивоварении. Для частичной замены солода, сахара и насоложенных материалов в технологии получения лагерного пива возможно использование глюкозно-мальтозных сиропов. Использование глюкозно-мальтозных сиропов является экономически выгодным для увеличения мощности предприятия по сравнению с расширением производства. Однако необходимо тщательно рассмаривать спектр и соотношение сахаристых веществ глюкозно-мальтозного сиропа и пивного сусла, чтобы избежать проблем в период главного брожения (применение дрожжей чувствительных к уровню глюкозы) и формированием вкуса пива. Кроме того, использование мальтозного сиропа позволяет регулировать сенсорные характеристики пива. В частности, следует обратить внимание на диметилсульфид (ДМС), который придает пиву вкус вареных овощей (уровень в пиве ниже 35 мкг/л). Диметилсульфид обычно получается из солода, но его наличие так же может быть результатом заражения микроорганизмами. Если используемый солод имеет повышенный уровнь ДМС, то целесообразна частичная его замена мальтозным сиропом [6,7]. Это приводит к снижению данного аромата и благоприятно сказывается на вкусовом профиле напитка. Кроме этого известно, что вкусовая стабильность пива вязана с жирными кислотами, особенно с непредельными. и применение мальтозного сиропа положительно сказывается, т. к. концентрация этих кислот не увеличивается.

Кэнди сироп (*candi syrup*) или кэнди сахар (*candi sugar*) с древних времен применяют в бельгийских элях. Их используют при изготовлении таких сортов как *Belgian strong ales* (Бельгийские крепкие эли), *Dubel* (дюбель), *Tripel* (трипели), *Quadrupel* (квадрюпель) и т. д.

Кэнди сахар – это инвертированный раствор сахарозы, но отличается по ряду технологических характеристик от инвертированного сиропа, применяемого на производствах безалкогольной продукции. Это отличие состоит в том, что при приготовлении сиропа кэнди не используется лимонная кислота и инверсия сахара происходит за счет высокой температуры, так как сахароза может выступать в роли слабой кислоты, а высокая температура ускоряет реакцию. Кэнди сахар имеет различную цветность в зависимости от сорта. К тому же сахар обладает ароматикой, что в свою очередь придает конечному продукту как вкус и аромат, так и цветность.

Еще одно отличие состоит во внесении источника аминокислот в сироп для более полного протекания реакции Майяра. Реакция образования меланоидинов более ответственна за образование тонкого вкуса в сиропе, а это именно то, что чаще всего хотят добиться при изготовлении сиропа кэнди. Тип аминокислот играет большую роль в образовании вкуса и аромата будущего сиропа. Сироп из свекловичного сахара имеет небольшое количество аминокислот (глютамин, лизин, треонин и тд.), которые в свою очередь будут не совсем положительно влиять на вкус и аромат кэнди сиропа.

Использование кэнди сиропа в пивоварении позволяет добиться разнообразных свойств напитка, прежде всего, это вкус и аромат готового пива. Так же использование сиропа позволит добиться большей степени сбраживаемости за счет инвертированной сахарозы. К тому же добавление сиропа позволит корректировать сухие вещества в сусле. И, конечно же, за счет изменения цветности "кэнди сиропа" можно придавать пиву различные оттенки.

Целью данной работы явилось приготовление и изучение свойств "Кэнди сиропа".

В начале работы приготовили "кэнди сироп" по разработанной нами рецептуре. Для восполнения отсутствующих аминокислот необходимых для протекания реакции Майяра было решено использовать солодовое сусло. Готовился затор с гидромодулем 1:3. Затирание проводилось настойным способом с 45° С. В работе использовали светлый ячменный солод *PILSEN и* пшеничный солод *Wheat*, который придает пиву характерный пшеничный аромат. Для эксперимента были приготовлены три варианта сусла:

В первом варианте было произведено затирание только ячменного солода (Pilsner) с гидромодулем 1:3. Второй вариант сусла получен при затирании 75 % ячменного солода и 25 % пшеничного солода с гидромодулем 1:3 Засыпь третьего варианта состояла из смеси солодов: 50 % пшеничного и 50 % ячменного солода. Гидромодуль 1:3.

В полученных образцах было определено содержание α-аминного азота и его количество в сусле составляло 27 мг (для первого образца), 31 мг (2-ой образец) и 36 мг\100 мл сусла (для третьего образца). Исходя из полученных данных, наиболее целесообразно использование сусла с максимальным количеством аминного азота, и нами для дальнейших исследований взята рецептура 3.

Отдельно готовили сахарные сиропы и образцы канди сиропа.

Образец № 1. Не инвертированный 75 % сахарный сироп. В нагретую до 50° С воду вносили сахар и после его растворения, температуру доводили до кипения. Кипячение производилось в течение 20 минут.

Образец № 2. Инвертный сахарный сироп. В нагретую до 50° С питьевую воду вносили сахар и полностью растворяли. После растворения сахара поднимали температуру до 70° С и вносили лимонную кислоту из расчета 1г на 1 кг сахарозы. Инверсию проводили в течение 30 минут, после чего сироп доводили до кипения и кипятили в течение 20 минут.

Образец № 3. Не инвертированный карамелизированный сахарный сироп. В нагретую до 50° С воду вносили сахар и полностью растворяли. После растворения сахара поднимали температуру до 150° С и поддерживали данный температурный режим в течение 20 минут.

Образец № 4. Инвертный карамелизированный сахарный сироп. В нагретую до 50° С воду вносили сахар и полностью растворяли. После растворения сахара поднимали температуру до 70° С и вносили лимонную кислоту из расчета 1г на 1 кг сахарозы. Инверсию проводили в течение 30 минут, после чего температуру повышали до 150° С и выдерживали в течение 20 минут.

Образец № 5. Сироп кэнди. В нагретую до 50° С смесь раствора воды и сусла (отношение 1:1) вносили сахар. Интенсивно перемешивая раствор, добивались его полного растворения в жидкости. Далее при постоянном перемешивании раствор медленно доводили до температуры 130° С. Инверсию производили в течение 30 минут. После чего доводили значение pH до 9. Для этого использовали 20 % водный раствор гидрокарбоната натрия. Щелочная среда необходима для протекания реакции Майяра. После инверсии, сироп нагревали до 145 – 150° С и данная температура поддерживалась в течение 20 мин.

Сахарные сиропы не редко используются в пивоварении. Сироп вносили в охмеленное сусло в конце кипячения. Количество вносимого сахарного сиропа варьируется от 1–3 % до 12–15 % от массы засыпи. Большое количество сахарного сиропа в сусле может повлиять на вкус конечного продукта. Во вкусе и аромате может наблюдаться недостаточно солодовых нот. Во избежание этого не рекомендуется превышать дозу внесения сахарного сиропа более 10 %.

Для исследования сбраживаемости образцы сахарных сиропов доведенных до 15 % сухих веществ сбраживались дрожжами верхового брожения *Saccharomyces cerevisiae* Safbrew **S-33** (производство Бельгия).

Исследуя брожение каждого образца, были получены зависимости содержания сухих веществ от времени. Измерения производились рефрактометрически. Результаты динамики снижения концентрации сухих веществ представлены в таблице 1.

Сахарный сироп кэнди обладает хорошей степенью сбраживаемости и хорошей скоростью брожения, незначительно уступая лишь белому инвертному сиропу и обладает ощутимым приемуществом перед карамелизированными сиропами. Сусло приготовленное на основе кэнди сахара сбродило до 2,7 % сухих веществ за 9 дней, что является хорошим показателем. При этом, использовнаие кэнди сиропа в технологии пиоварения имеет несколько приемуществ: с помощью кэнди сиропа можно влиять на цвет получаемого пива. Благодаря реакции Майара, протекающей при изготовлении кэнди сиропа, появляется свойственный вкус и аромат, что, безусловно, может оказать положительное влияние на конечный продукт.

Таблица 1 – Динамика снижения сухих веществ в исследуемых образцах

Время брожения, сутки	Концентрация сухих веществ, %				
	Образец 1	Образец 2	Образец 3	Образец 4	Образец 5
1	14,4	14,2	14,4	14,3	14,2
3	10,1	9,3	11,4	10,8	9,6
4	7,2	6,8	7,5	7,2	6,8
5	4,9	4,2	5,1	4,9	5,0
6	3,8	3,0	4,8	4,0	3,8
7	3,4	2,8	4,3	3,7	3,2
8	3,1	2,7	4,0	3,5	2,9
9	2,9	2,7	3,9	3,5	2,8
10	2,9	2,6	3,8	3,4	2,7

В дальнейшем, нами были приготовлены экспериментальные образцы сусла из смеси солодов: 50 % пшеничного и 50 % ячменного солода с гидромодулем 1:3 (вариант 3) и с разными содержанием кэнди сиропа: 10, 20 и 30 г./л. Контрольным образцом служил вариант без кэнди-сиропа. Брожение шло 6 суток. Физико-химические показатели готовых пивных напитков с разным количеством кэнди-сахара представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Физико-химические показатели готовых пивных напитков с кэнди-сиропом

Показатели	Содержание кэнди сиропа, %			
	10	20	30	0 (контроль)
Содержание спирта, % об.	4,98	5,35	5,99	4,43
Экстрактивность начального сусла, %	11,6	12,0	13,2	10,3
Видимый экстракт, %	2,47	2,15	2,19	2,11
Видимая степень сбраживания, %	78,8	82,1	83,4	79,6
Действительная степень сбраживания, %	65,1	67,8	68,8	65,8

Образцы с содержанием сиропа в количестве 20 и 30 % превосходят контроль по видимой и действительной степени сбраживания на несколько процентов. Среди всех пивных напитков наиболее выделяется образец с содержанием кэнди сиропа в дозе 20 %. Он имеет отличный солодовый вкус. Вместе с тем, можно отметить, что все образцы с добавлением кэнди-сахара превосходят по своим органолептическим характеристикам контрольный образец.

ЛИТЕРАТУРА

Петрова Н.А., Иванченко О.Б. Нетрадиционное низкоглютеновое сырье в технологиях специальных сортов пива // Пиво и напитки, 2008, N6.С. 38–42.

Петрова Н.А., Оганнисян В.Г., Иванченко О.Б. Способ приготовления безалкогольного гречишного пива // Пиво и напитки, 2011, № 5, С. 12–14

Данина М.М., Иванченко О.Б. Применение плодов шиповника в технологии пивных напитков // Пиво и напитки. – 2015, № 2.С. 12–15

Иванченко О.Б., Данина М.М. Разработка технологии эля с использованием шиповника // ВГУИТ, 2017. – Т. 79.– № 1. 145–151

Иванченко О.Б., Данина М.М. Использование экструдированной пшеницы в пивоварении // Вестник МАХ. – 2015, № 2. – С. 18–22.

Иванченко О.Б., Вишняков И.Г. Роль технологических процессов в содержании свободного ДМС в пиве // Процессы и аппараты пищевых производств, 2009. – N1.С. 51–60.

Вишняков И.Г. Иванченко О.Б. Безопасность пива и пути снижения содержания ДМС // Пиво и напитки, 2007, № 6 С. 10–12

УДК 663.88

СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЙ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКТ ГИПОХОЛЕСТЕРИНЕМИЧЕСКОГО И ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

В.М. Воробьева, В.К. Мазо, И.С. Воробьева, С.Н. Зорин

ФИЦ питания и биотехнологии, Москва, Россия

Метаболический синдром (МС) является актуальной проблемой современной медицины, обусловленной значительной распространенностью, постоянным ростом числа больных и высокой частотой сердечно-сосудистых осложнений. По современным представлениям, ключевыми факторами, приводящими к развитию нарушений обмена веществ при МС, является увеличение массы висцерального жира и снижение чувствительности периферических тканей к инсулину с развитием компенсаторной гиперинсулинемии, которые ассоциируются с нарушениями углеводного, липидного, пуринового обмена, и артериальной гипертонии. Мета-анализ широкомасштабных исследований показал, что в популяции взрослого населения МС (в мире) выявляется у 10–30 % в зависимости от ее особенностей и используемых критериев диагностики. В России его распространенность варьирует от 20 до 35 %, с возрастом число больных увеличивается. [1]

Основным фактором риска МС и ассоциированных с ним заболеваний, таких как сахарный диабет 2 типа (СД 2 типа), диабетическая нефропатия, неалкогольный стеатогепатит, сердечно-сосудистые заболевания и др., является ожирение [2], поэтому основной задачей комплексного лечения больных с МС является снижение массы тела и повышения чувствительности тканей к инсулину. Наряду с использованием фармакологических средств, важная роль принадлежит диетотерапии. Рацион больных с МС должен быть гипокалорийным: 1200 ккал для женщин, 1500 ккал для мужчин, доля жиров не должна превышать 25 %, углеводов – 55 %, белков – 20 % от суточной калорийности. Эффективность методов лечения и профилактики МС может быть существенно повышена включением в персонализированную диетотерапию пищевых продуктов, модифицированных по химическому составу, целенаправленно корригирующих нарушения углеводного и липидного обмена у этих больных за счет использования функциональных пищевых ингредиентов и биологически активных веществ различной природы, отвечающих современным требованиям безопасности и эффективности с позиций доказательной медицины. Такие пищевые продукты относятся к категории специализированной пищевой продукции диетического профилактического и диетического лечебного питания.

Целью исследования явились обоснование состава и разработка технологии специализированного пищевого продукта (СПП) гипогликемического и гипохолестеринемического действия для включения в диетотерапию МС.

Включение СПП в состав редуцированных по калорийности диет должно не только обеспечивать гипохолестеринемический и гипогликемический эффект, но и способствовать коррекции недостаточной обеспеченности организма больного макро и микронутриентами. Среди растительных белков наибольшие традиции применения для целей диетической коррекции и профилактики нарушений липидного обмена и связанных с ним ожирения, сердечно-сосудистых заболеваний, артериальной гипертензии, СД 2 типа и, соответственно, МС имеют белки сои (БС) в виде изолятов. получаемые из немодифицированной сои с использованием современной технологии водной экстракции, позволяющей выделить белковый компонент с максимальным сохранением нативного набора аминокислот, изофлавонов в активной форме при одновременном удалении ингибиторов протеолитических ферментов, лектинов, уреазы, липоксигеназы и др. Соевые изоляты содержат более 80 % белка, отличаются высокой усвояемостью, оказывают гипохолестеринемическое и антиатерогенное действие [3]. В современной научной литературе одно из возможных объяснений гипохолестеринемического действия БС связано с феноменом взаимодействия в тонком кишечнике холестерина (ХС) с пептидными фракциями, образующимися при переваривании белка в желудочно-кишечном тракте, в результате чего нарушается мицеллярная растворимость ХС, его всасывание, изменяется энтерогепатическая циркуляция желчных кислот, приводящая к снижению содержания ХС в печени, а также снижается экспрессия некоторых генов белков-медиаторов липидного транспорта. Высокое содержание в БС глутамина-аминокислоты, необходимой для образования глутатиона, может способствовать защите клеток от повреждения свободными радикалами и играть важную роль в

функционировании иммунной системы [4]. Соевый белок лимитирован по трем незаменимым аминокислотам: треонину и сумме серусодержащих аминокислот – метионина и цистеина, поэтому является целесообразным использование его в смеси с сывороточным белком молока, аминокислотный состав которого наиболее приближен к аминокислотному составу «идеального» белка. По содержанию незаменимых аминокислот (лизина, триптофана, метионина, треонина) и аминокислот с разветвленной цепью (валина, лейцина и изолейцина), необходимых для синтеза мышечного белка, сывороточные белки молока превосходят все белки животного и растительного происхождения.

Общепринятые рекомендации по коррекции нарушений липидного обмена заключаются в снижении потребления общего ХС, насыщенных жирных кислот (НЖК) при увеличении доли мононенасыщенных жирных кислот (МНЖК) до 10–15 % и полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) до 7–9 % от общей калорийности рациона. МНЖК снижают уровень атерогенных липопротеинов низкой плотности [5] и активность свободнорадикального окисления в организме [6], а также предотвращают развитие инсулинорезистентности [7]. Омега-3 ПНЖК благоприятно влияют на липидный профиль крови и снижают риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, в частности, курсовое применение докозагексаеновой и эйкозапентаеновой кислот у больных с МС и ишемической болезнью сердца оказывает гиполипидемический, гипокоагуляционный и снижающий массу тела эффект [8].

Модификация углеводного состава СПП может быть осуществлена за счет исключения быстро всасываемых сахаров, введением в рецептуру СПП медленно перевариваемых и медленно всасываемых углеводов, а для формирования органолептического профиля, свойственного сладким напиткам, используют интенсивные подсластители природного происхождения и синтетические, сахарозаменители из семейства полиолов.

Гипохолестеринемический эффект растворимых пищевых волокон (ПВ) обусловлен их способностью связывать, увеличивать выведение и ускорять обмен желчных кислот, замедлять абсорбцию ХС в тонком кишечнике, снижать усвояемость липидов за счет увеличения их экскреции, ингибировать синтез ХС в печени под влиянием короткоцепочечных жирных кислот, образующихся в процессе ферментации в толстом кишечнике растворимых ПВ. Положительное влияние на показатели липидного и углеводного обмена оказывают преимущественно растворимые пищевые (альгинаты, пектин, инулин, бета-глюканы, гуммиарабик, некоторые виды гемицеллюлоз, модифицированные целлюлозы) [9].

Для улучшения микронутриентной обеспеченности в состав СПП для больных с МС целесообразно включать витамины (группы B, C, E, A, D, бета-каротин), минеральные вещества (калий, магний, кальций) и микроэлементы (хром, цинк), позволяющие оптимизировать показатели углеводного и липидного обмена у этого контингента больных. Трехвалентный хром, как эссенциальный микроэлемент, стимулирует поступление глюкозы в клетки организма, индуцируя гены внутриклеточных сигнальных систем. Имеются свидетельства непосредственного взаимодействия хрома с инсулином (в частности, с его димерами), стабилизирующего таким образом структуру гормона или усиливающего его связывание с рецептором [10]. Биохимическое и физиологическое действие цинка в организме млекопитающих включает, среди прочих проявлений, регуляцию хронического воспалительного статуса путем уменьшения воспалительных цитокинов, снижение воздействия оксидативного стресса, участие в липидном и углеводном метаболизме. Дефицит цинка может быть важным фактором риска развития СД 2 типа. Уровни цинка в плазме крови имеют обратную корреляцию с уровнем гликированного гемоглобина при СД 2 типа [11]. Цинк улучшает метаболизм глюкозы, чувствительность к инсулину у пациентов с СД [12] и играет важную роль в синтезе, депонировании и секреции инсулина в бета-клетках поджелудочной железы. Снижение содержания цинка в организме отрицательно влияет на чувствительность к инсулину и толерантность к глюкозе [13]. Цинк также стимулирует гликолиз, ингибирует глюконеогенез и принимает участие в транспорте глюкозы в адипоцитах [14]. Метаболический эффект цинка при ожирении связан с его влиянием на активность адипокинов, гормонов жировой ткани (интерлейкина 6, фактора некроза опухоли TNFa, лептина, адипонектина и других). Для нормального функционирования адипоцитов и синтеза лептина необходим адекватный уровень цинка в жировой ткани [15]. Для получения новых пищевых источников хрома и цинка в органически связанной высокоусвояемой форме могут быть эффективно использованы реакции комплексирования этих микроэлементов с ферментативными гидролизатами различных пищевых белков.

Как показывает практика применения СПП в составе диетотерапии, наиболее приемлемой для «доставки» организму необходимых нутриентов является порошкообразная форма продукта. Преимущества обусловлены удобством приготовления напитка из порошкообразной смеси, а также возможностью добавлять её в блюда рациона. Сухая форма продукта имеет ещё ряд преимуществ, связанных с транспортированием и хранением, микробиологической стабильностью, обеспечивающей длительные сроки годности. Технология производства порошкообразных напитков дает возможность создания разнообразных вкусов и ароматов, которые оказывают позитивное влияние на психоэмоциональное состояние пациента.

В соответствии с вышеизложенным нами разработан СПП, предназначенный для диетической профилактики и коррекции нарушений углеводного, липидного обмена, антиоксидантного статуса у больных с МС. При разработке рецептуры использованы в соотношении 1:1 изолят соевого белка (ИСБ) и концентрат сывороточного белка молока (КСБ), полученный с использованием мембранной технологии. ИСБ содержит 85 % белка, около 3 % жира, 1 % углеводов, минеральные вещества, мг / 100 г.: кальций – 50, фосфор – 900, магний – 34, калий – 1300, натрий – 780, железо – 12, медь – 1,6. КСБ содержит около 80 % полноценного легкоусвояемого белка, имеющего высокий аминокислотный скор незаменимых аминокислот относительно эталонной шкалы ФАО/ВОЗ (1985) [16], содержит минеральные вещества, мг / 100 г.: кальций – 365, натрий – 246, магний – 52, калий – 524. Низкое содержание лактозы (в сравнении с сухим молоком) позволяет включать этот источник белка в состав продуктов для людей с лактазной недостаточностью.

В качестве жирового компонента в состав СПП включены в микрокапсулированной форме моно- и полиненасыщенные жирные кислоты, в том числе семейства омега-3. В качестве источника углеводов использован мальтодекстрин – продукт неполного гидролиза кукурузного крахмала, представитель так называемых «сложных» углеводов, имеющий коэффициент сладости относительно сахарозы (Ксл.) от 0 до 0,3.

Для формирования вкусового профиля восстановленного напитка внесены подсластители – многоатомный спирт мальтит, получаемый путем гидрогенизации мальтозы, и смесь «Стевилия Е», состоящая из эритритола и экстракта стевии. Ксл. мальтита равен 0,8 относительно сахарозы, смесь подсластителей «Стевилия Е» в 5 раз слаще сахара.

С учетом особенности свойств высокоэтерифицированных пектинов, а именно их повышенной растворимости в воде в сравнении с низкоэтерифицированными, в состав СПП включен пектин со степенью этерификации 58–62 %, полученный из цитрусовых методом водной экстракции.

Для включения в состав СПП биотехнологическим методом были получены органически связанные формы цинка и хрома в виде белково-хелатных комплексов (БХК) с ферментативным гидролизатом ИСБ (ФГИБС-Zn и ФГИБС-Cr). Процесс получения этих комплексов, являющийся одним из блоков в технологической схеме производства СПП, включал следующие стадии: приготовление растворов ФГИБС, солей цинка и хрома; смешивание этих растворов и доведение pH до оптимального значения; инкубация; микро- и нанофильтрация полученной смеси; лиофильная сушка. Для получения ФГИБС-Zn к предварительно приготовленному 10 %-ному водному раствору ФГИБС добавляли 25 %-ный водный раствор хлористого цинка в соотношении 10 весовых частей белка / 1 весовая часть соли, перемешивали и доводили pH полученного раствора до значения 7,0–7,1 раствором гидроокиси натрия. Смесь инкубировали в течение 60 мин при постоянном перемешивании при комнатной температуре. После окончания процесса полученный микроэлементный комплекс осветляли на микрофильтрационной установке (в тангенциальном потоке, диаметр пор не более 5,0 мкм) для удаления осадка и механических примесей. Отфильтрованный раствор переносили в нанофильтрационную установку для удаления возможного присутствия в нем не связанных с пептидно-аминокислотной матрицей ионов цинка, после чего пастеризовали при температуре 75° С в течение 30 с и подвергали лиофильной сушке. При получении БХК ФГИБС-Cr использовали 10 %-ный водный раствор хлористого хрома в соотношениях 100 весовых частей белка / 1 весовая часть соли хрома. Из технологического процесса исключалась стадия нанофильтрации. Полученные БХК измельчали и просеивали через сито с диаметром ячеек 1,0 мм. Органические источники микроэлементов цинка и хрома представляют собой мелкодисперсные порошки бежевого цвета со специфическим запахом, горько-соленым вкусом.

В состав СПП также введены эссенциальные нутриенты и биологически активные вещества, обладающие определенным функциональным дествием: лактат магния, карбонат кальция, премикс витаминный (витамины А, Е, С, D_3, B_1, B_2, B_6, B_{12}, РР, фолиевая кислота, пантотеновая кислота, K_1, биотин), L-карнитин, бета-каротин.

Все ингредиенты по показателям безопасности соответствовали требованиям, установленным техническими регламентами Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции», ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции», ТР ТС 029/2012 «Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств».

Разработанный СПП представляет собой многокомпонентную смесь порошкообразных ингредиентов, в состав которой, кроме основных (по массе) рецептурных компонентов – источников белков, жиров, углеводов, входят микродобавки – макро- и микроэлементы, витамины, минорные биологически активные вещества, ароматизаторы, поэтому одной из основных технологических задач является равномерное их распределение в массе продукта, которое достигается при использовании процесса поэтапного смешивания ингредиентов.

Содержание пищевых и биологически активных веществ в разработанном СПП соответствует медико-биологическим требованиям и соотносится с нормами физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах с учётом рекомендаций его суточного потребления – одна порция в день. СПП можно добавлять в готовые каши и кисломолочные продукты или употреблять в восстановленном. Для приготовления одной порции напитка или коктейля содержимое пакета (30 г.) высыпать в стакан, добавить 100–150 мл питьевой воды температурой 60–80^o С, интенсивно перемешивая до получения однородного продукта, или взбить блендером. В зависимости от желаемой консистенции количество воды можно варьировать.

Разработана и утверждена техническая документация, выработана опытная партия СПП для оценки его эффективности в составе гипокалорийной диеты пациентов с МС.

Таким образом, с учетом требований к диетической терапии при МС осуществлен научно обоснованный выбор функциональных ингредиентов и биологически активных веществ, обладающих определенным физиологическим действием, разработана рецептура СПП. Разработанная технология позволила получить однородную порошкообразную смесь, в которой равномерно распределены все минорные рецептурные ингредиенты, что обеспечивает поступление в организм необходимых в рекомендуемых количествах нутриентов с суточной порцией продукта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рекомендации по ведению больных с метаболическим синдромом. Клинические рекомендации. М. 2013. 43 с.

2. Диагностика, лечение, профилактика ожирения и ассоциированных с ним заболеваний (национальные клинические рекомендации) С. Петербург. 2017. 164 с.

3. Погожева А.В. Применение природных фитоэстрогенов для коррекции нарушений липидного обмена // Кардиология. 2011. № 5.С. 75–80.

4. Field, CJ, Johnson, I and Pratt, VC. Glutamine and arginine: immunonutrients for improved health. Med. Sci in Sports Exerc. 2000; 32(7) Suppl: S377-S388

5. Hodson L., Skeaff C.M., Chisholm W.A. The effect of replacing dietary saturated fat with polyunsaturated or monounsaturated fat on plasma lipids in free-living young adults // Eur. J. Clin. Nutr. 2001. V. 55. No 10. P. 908–915.

6. Abel S., Schuhr I., Gelderblom W.A. The antioxidant potential of oleic acid and effect on cell survival in carcinogenesis // ISSFAL, 2010. P. 141.

7. Yokoyama J., Someya Y., Yoshihara R. et al. Effects of high-monounsaturated fatty acid enteral formula versus high-carbohydrate enteral formula on plasma glucose concentration and insulin secretion in healthy individuals and diabetic patients // J. Int. Med. Res. 2008. V. 36. No 1. P. 137–146.

8. Ершов А.А. Влияние омега-3 полиненасыщенных жирных кислот на дислипидемию и гемостаз у больных ишемическои болезнью сердца и метаболическим синдромом: Автореф дис. канд. мед. наук. М., 2007.

9. Тутельян В.А., Байгарин Е.К., Погожева А.В. Пищевые волокна: гигиеническая характеристика и оценка эффективности. М.: СвР АРГУС. 2012. 244 с.

10. Sreekanth R, Pattabhi V, Rajan SS: Molecular basis of chromium insulin interactions. Biochem Biophys Res Commun 2008, 369:725–729.

11. Sinha S, Sen S (2014) Status of zinc and magnesium levels in type 2 diabetes mellitus and its relationship with glycemic status. Int J Diabetes Dev Ctries 34(4) : 220–223.

12. Islam MR, Attia J, Ali L, McEvoy M, Selim S, Sibbritt D, Akhter A, Akter S, Peel R, Faruque O, Mona T, Lona H, Milton AH (2016) Zinc supplementation for improving glucose handling in pre-diabetes: a double-blind randomized placebo controlled pilot study. Diabetes Res Clin Pract 115:39–46 J Physiol Sci (2018) 68:19–31.

13. Yanga HK, Leea SH, Hanc K, Kanga B, Leed SY, Yoona KH, Kwona HS, Parkf YM (2015) Lower serum zinc levels are associated with unhealthy metabolic status in normal-weight adults: the 2010 Korea National Health and Nutrition Examination Survey. Diabetes Metabol 41:282–290.

14. Ranasinghe P, Pigera S, Galappatthy P, Katulanda P, Constantine GR (2015) Zinc and diabetes mellitus: understanding molecular mechanisms and clinical implications. Daru 23(1) : 44. doi : 10.1186/s40199–015–0127–4.

15. Baltaci AK, Mogulkoc R (2012) Leptin and zinc relation: in regulation of food intake and immunity. Indian J Endocrinol Metab 16 (Suppl 3): S611-S616.

16. FAO/UNU Expert Consultation. Energy and Protein Requirements. Technical Report Series 724 // Word Health Organization, Geneva. – 1985

УДК 581.1.581.14

ИУК И АБК СТИМУЛИРУЮТ ПРОРАСТАНИЕ *IN VITRO* МУЖСКОГО ГАМЕТОФИТА ПЕТУНИИ, АКТИВИРУЯ К ± КАНАЛЫ В ПМ ПЫЛЬЦЕВЫХ ТРУБОК.

А.С. Воронков, Ю.В. Минкина[1], Г.В. Тимофеева, Л.В. Ковалева

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия
[1]Обнинский институт атомной энергетики, Обнинск, Россия

Прорастание пыльцевых зерен и рост пыльцевых трубок зависит от водных и ионных (Ca^{2+}, H^{+}, K^{+}, Cl^{-}) потоков [2]. Калий, основной осмотический агент в клетках растений, обеспечивает поддержание тургорного давления и его поглощение создает движущую силу для трансмембранных осмотических потоков воды в клетки. Как осмотический регулятор, калий необходим и для прорастания ПЗ, и для роста ПТ, которые используют K+, наряду с другими осмотиками, такими как сахароза. Транспорт K^{+} через ПМ пыльцы регулируется K ± каналами [2, 3, 4, 5]. Присутствие этого катиона выявлено в области апертуры зрелой пыльцы и, учитывая синхронизированное появление K^{+} в зрелой пыльце, пыльниках и папиллах, авторы предположили, что K^{+} может регулировать раскрывание пыльника, набухание пыльцы и гидратацию папилл и совместно с ионами Ca^{2+} и H^{+} участвует в регуляции полярного роста ПТ [3]. Брейгина и др. [1] установили, что гидратация ПЗ как в условиях in vivo, так и in vitro сопровождается выходом из него подвижных ионов K^{+} и Cl^{-} Мы провели исследование, направленное на выяснение механизма включения ИУК и АБК в осморегуляцию прорастающего in vitro мужского гаметофита петунии. Результаты представлены на рис. 1 и в таблицах 1–3. Пыльца петунии прорастает на воде, однако длина ПТ остается постоянной в течение 2 ч и составляет 15 мкм (рис. 1а; табл. 1). Внесение гормонов, ИУК или АБК, стимулировало в 2 раза прорастание ПЗ. При культивировании пыльцы на среде, содержащей 0.4 М сахарозу и 1.6 мМ $H_3 BO_3$, гормоны стимулировали как прорастание ПТ, так и рост ПТ (рис. 1а, 1б; табл. 2). В первые 0.5 ч культивирования, на стадии гидратации ПЗ и инициации прорастания ПТ, % прорастания ПЗ и длина ПТ на среде (без гормонов) были идентичны этим показателям при культивировании ПЗ на воде в присутствии ИУК или АБК, причем АБК в большей степени стимулировала прорастание ПЗ, а ИУК – рост ПТ (рис. 1а, 1б). При последующем культивировании оба гормона (АБК в большей степени) стимулировали и прорастание ПЗ, и рост ПТ (рис. 1а, 1б; табл. 1 и 2).

ТИБК, ингибитор транспорта ИУК и флуридон, ингибитор синтеза АБК, тормозили рост ПТ. При этом флуридон полностью ингибировал рост ПТ на воде, в то время как ТИБК снижала в 3 раза рост ПТ на среде (табл. 1 и 2).

В ходе ингибиторного анализа было установлено, что ингибитор K ± каналов TEA-Cl ингибировал прорастание ПЗ, культивируемых на среде, содержащей 0.4 М сахарозу и 1.6 мМ $H_3 BO_3$ (табл. 3). При совместном внесении в среду гормонов с TEA-Cl наблюдали снятие ингибиторного эффекта TEA-Cl и прорастание ПЗ и рост ПТ. Эффект АБК был более значительный, а именно, ее присутствие в среде культивирования стимулировало прорастание ПЗ в 3 раза, а рост ПТ в 2 раза (по сравнению с контролем), в то время как ИУК стимулировала рост лишь незначительного числа

Таблица 1. Влияние ИУК, АБК, ТИБК и флуридона на рост пыльцевых трубок (в мкм)

Время культиви – рования	Вода (К)	Вода + ИУК	Вода + ТИБК	Вода + ТИБК + ИУК	Вода + АБК	Вода + флуридон	Вода + АБК + флуридон
1 ч	15 ± 0.9	22.9 ± 1.7	10.41 ± 0.7	10 ± 0.6	13.72 ± 0.7	-	12.5 ± 0.5
2 ч	22.9 ± 1.9	23.0 ± 2.1	10.5 ± 0.9	27.5 ± 1.9	23.1 ± 2.1	-	27.1 ± 2.2

Таблица 2. Влияние ИУК, АБК, ТИБК и флуридона на рост пыльцевых трубок (в мкм)

Время культиви – рования	Среда (К)	Среда + ИУК	Среда + ТИБК	Среда + ТИБК + ИУК	Среда + АБК	Среда + флуридон	Среда + АБК + флуридон
1 ч	89.5 ± 5.5	110.4 ± 8.2	37.5 ± 2.8	47.5 ± 2.8	147.5 ± 3.1	18.75 ± 0.9	40 ± 2.2
2 ч	235 ± 12.5	337.5 ± 15.8	78.7 ± 5.1	75.5 ± 4.2	365 ± 23.1	202.1 ± 3.4	282.5 ± 1.7

* Время культивирования

Таблица 3. Влияние TEA-Cl, ингибитора К ± каналов, на прорастание пыльцевых зерен и рост пыльцевых трубок петунии

Вариант	Время культивирования на среде (0.4 М сахароза + 1.6 мМ H_3BO_3)	% прорастания пыльцевых зерен	Длина пыльцевых трубок, мкм
Контроль	1 ч	5	4.5 ± 0.31
Контроль	2 ч	10	11.83 ± 0.63
TEA-Cl 20 мМ	1 ч	-	-
TEA-Cl 20 мМ	2 ч	-	-
TEA-Cl + ИУК 5 мкМ	1 ч	ед.	3.5 ± 0.17
TEA-Cl + ИУК 5 мкМ	2 ч	ед.	10.85 ± 0.75
TEA-Cl + АБК 5 мкМ	1 ч	20	11.66 ± 0.74
TEA-Cl + АБК 5 мкМ	2 ч	30	20.16 ± 1.81

ПТ, сравнимых по длине с контрольными ПТ. Полагаем, что АБК снимала действие TEA-Cl, стимулируя транспорт ионов К + через ПМ прорастающего мужского гаметофита. Полученные результаты о роли ионов К + в гормональном контроле движущих сил транспорта воды в прорастающем мужском гаметофите позволили сформулировать гипотезу, объясняющую возможную роль фитогормонов в этом процессе. Мы полагаем, АБК и ИУК стимулируют прорастание ПЗ и рост ПТ, активируя К ± каналы в ПМ ПТ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Брейгина М.А., Матвеева Н.П., Андреюк Д.С. и др. Трансмембранный перенос К + и Cl – в процессе активации пыльцевого зерна in vivo и in vitro // Онтогенез. 2012. Т. 43. С. 103–112.

2. Feijo J.A., Malho R., Obermeyer G. Ion dynamics and its possible role during in vitro pollen germination and tube growth // Protoplasma. 1995. V. 187. P. 155–167.

3. Rehman S., Yun S.J. Developmental regulation of K accumulation in pollen, anthers, and papillae: are anther dehiscence, papillae hydration, and pollen swelling leading to pollination and fertilization in barley (Hordeum vulgare L.) regulated by changes in K concentration? // J. Exp. Bot. 2006. V. 57. P. 1315–1321.

4. Safiarian M.J., Pertl-Obermeyer H., Lughofer P. et al. Lost in traffic? The K + channel of lily polle, LilKT1, is detected at the endomembranes inside yeast cells, tobacco leaves, and lily pollen // Front Plant Sci. 2015. 6: Article 47. doi: 10.3389/fpls.2015.00047

5. Zhao L. – N., Shen L. – K., Zhang W. – Z. et al. Ca2 ± dependent protein kinase11 and 24 modulate the activity of the inward rectifying K + channels in Arabidopsis pollen tube // Plant Cell. 2013. V. 25. P. 649–661.

УДК 604.4

ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА КИСЛОМОЛОЧНОЙ ПАСТЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ШТАММОВ ЛАКТОБАКТЕРИЙ СЕЛЕКЦИИ НИИ БИОТЕХНОЛОГИИ ГОРСКОГО ГАУ И КЛУБНЕЙ ТОПИНАМБУРА СОРТА ИНТЕРЕС

А.М. Хозиев, Б.Г. Цугкиев, З.Л. Дзиццоева, И.Б. Цугкиева

Горский государственный аграрный университет, Владикавказ, Россия

В настоящее время в целях выработки высококачественных кисломолочных продуктов проводится большая работа, связанная с поиском и получением местных производственно-ценных штаммов микроорганизмов, адаптированных к местным природно-климатическим условиям. Кроме того в качестве наполнителей используют сырье содержащее целый ряд биологически активных компонентов. Таким сырьем являются и клубни топинамбура. Народы Греции и Рима, Индии и Ближнего Востока, Закавказья уже в далекой древности употребляли кисломолочные напитки, которые приготовляли из коровьего, овечьего или ослиного молока. У скифов был известен кумыс – кисломолочный напиток из кобыльего молока [1].

Аминокислоты молока настолько хорошо сбалансированы, что его белки усваиваются на 98 %. По этому показателю они уступают (и только на 2 %) белкам яйца, аминокислотный баланс которого принят Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) за эталон (100 %). [3]. Углеводы в молоке представлены в основном лактозой, которая нигде больше не встречается. В отличие от детей, у которых молоко усваивается нормально, не у всех взрослых людей (примерно у 40 %) присутствуют ферменты, расщепляющие лактозу, что вызывает вздутие кишечника и слабительный эффект. [6]. Молочнокислые бактерии широко распространенны в природе. Они входят в состав эпифитной микрофлоры растений, являются постоянными обитателями слизистых поверхностей и кишечника человека и животных, выделяются из почвы. [2].

В мировой практике, как известно, топинамбур является сырьем для получения спирта, фруктозы, используется в медицине и как ценное пищевое растение [4]. В клубнях топинамбура нет крахмала, а содержится, инулин и другие полисахариды, дающие при гидролизе фруктозу. Применение концентрата топинамбура как добавка в диету тяжелым ожоговым больным свидетельствует о выраженном клиническом эффекте. Положительные данные о клинической эффективности концентрата топинамбура позволяют сделать заключение о целесообразности его применения в качестве биологически активной добавки в диете больных ожоговой болезнью в условиях стационара [5].

Целью работы явилась разработка технологии производства нового кисломолочного продукта – кисломолочной пасты, с использованием в качестве растительного наполнителя пудры из клубней топинамбура сорта Интерес.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальная закваска составлена из чистых культур местных штаммов *Streptococcus salivarius* и *Lactobacillus helveticus*.

Материалом для исследований послужили: коровье молоко, пудра из клубней топинамбура сорта Интерес, молочнокислые бактерии *Streptococcus salivarius* – штаммы Н-9 и Н-11 и *Lactobacilus helveticus* – штаммы Н-14 и Н-16, а также готовая молочнокислая паста. Технологическая схема производства пудры из клубней топинамбура состояла из следующих стадий: дробления клубней, высушивание при комнатной температуры, с последующим высушиванием в сушильном шкафу до постоянной массы, дробление высушенных клубней до состояния пудры. В пудре изучался химический состав. Установлено, что пудра из клубней топинамбура сорта Интерес обладает высокой пищевой и биологической ценностью. Молочнокислую пасту готовили из цельного коровьего молока. Пастеризация осуществлялась при температуре 95° С с выдержкой 2–3 минуты. После пастеризации молоко охлаждали до температуры заквашивания – 37° С. В охлажденное до 37° С молоко вносили бактериальную закваску в количестве 5 % и термостатировали при 37° С до образования плотного ровного сгустка, без разрывов и пузырьков газа. Сгусток образовывался через 5–6 часов термостатирования. Готовый продукт при кислотности 75–80° Т охлаждали до температуры 4° С и вносили наполнитель – пудру из клубней топинамбура в количестве 5 % от объема сквашенного молока. Завершающим этапом приготовления молочнокислой пасты было отделение от сыворотки, путем процеживания через фильтровальную ткань в условиях холодильной камеры.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Число КОЕ/г молочнокислых микроорганизмов в пасте определяли методом серийных разведений и установлено, что данный показатель равен $10^{1\circ}$ – 10^{12} КОЕ/г.

Доля сухого вещества в разработанной кисломолочной пасте составляет 19 – 20,0 %.

Антагонистическую активность молочнокислых микроорганизмов в составе кисломолочной пасты определяли методом диффузии в агар. Установлено, что антагонистическая активность кисломолочной пасты по отношению к *E.coli* достигает -27–29 мм, а по отношению к *Staph.aureus* – 25–26 мм. Наибольшей антагонистической активностью обладает штамм *Lactobacillus helveticus* Н-14. Данное свойство позволяет судить о высокой антибиотической активности разработанной кисломолочной пасты, что делает продукт функциональным и повышающим резистентность организма к патогенным и условно патогенным микроорганизмам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана технология производства функциональной кисломолочной пасты, которая может быть использована в случаях нарушения равновесия нормального биоценоза пищеварительного тракта и обмена веществ, так как обладает антагонистической активностью по отношению патогенной и условно патогенной микрофлоры и содержит БАВ.

ЛИТЕРАТУРА

Баженов Л.Г., Бондаренко В.М., Лыкова Е.А., Огай Д.К. Изучение антагонистического действия лактобацилл на Helicobacter pylori // Журн. микробиол. 1997. № 3. С. 89–91.

Бабёнышев С.П., Мамай Д.С. Переработка топинамбура на основе обратноосмотического и ультрафильтрационного разделения его жидких экстрактов/ Вестн. АПК Ставрополья. – 2011. – 1(01) – С. 36–39.

Бондаренко В.М. Классификация бактерий рода Lactobacillus // Материалы VIII съезда Всерос. общества эпидемиол., микробиол. и паразитологов. М., 2002. Т. 1. С. 140.

Королев Д.Д. Картофель и топинамбур – продукты будущего./Д.Д. Королев, Е.А. Симаков, В.И. Старовойтов и др.; – М.: – 2007. – С. 236–239

Кочнев Н.К. Лечебно-диетические свойства топинамбура. / Н.К. Кочнев, Л.А. Решетник. – Иркутск: 1997. – С. 6–11.

Макиев, О.Н. Аминокислотный и минеральный состав клубней батата культурного/ О.Н. Макиев, Л.Ч. Гагиева, З.Л. Дзиццоева // Вестник научных трудов молодых ученых ФГОУ «Горский государственный аграрный университет». – Вып. 52. – Владикавказ, 2015. – С. 91–93.

УДК 634.8:631.524.85:57.85:57.085.1/.2

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА СОХРАНЕНИЯ И РАЗМНОЖЕНИЯ СОРТОВ И КЛОНОВ ВИНОГРАДА

И.А. Павлова, В.П. Клименко

Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач, РАН, Республика Крым, г. Ялта, Россия

Применение методов биотехнологии способствует переводувиноградарства в мирена высокоэффективные энергосберегающие технологии, обеспечивающие максимальное использование экологических ресурсов, а также приводит повышениюдолговечности, продуктивностинасаждений. Биотехнологическая система клонального размножения может быть использована для оздоровления и массового размножения безвирусных клонов в производстве оздоровленного посадочного материала, а также для размножения ценных перспективных форм и новых сортов винограда [1–3].

Метод длительного беспересадочного хранения пробирочных растений в режиме замедленного роста – один из распространенных способов поддержания коллекции растительных ресурсов в условиях *in vitro*. Депонирование позволяет уменьшить затраты труда и времени, сэкономить расходы на реактивы и материалы [3–8].

С целью сохранения, оздоровления и дальнейшего массового размножения в институте «Магарач» создана коллекция растений *in vitro* сортов, клонов и гибридов винограда [4]. Основное ядро коллекции составляют сорта, клоны и гибриды института «Магарач», а также автохтонные крымские сорта. Образцы представленыполноценными растениями, находящими в процессе замедленного роста или состоянии глубокого покоя.



Рис. 1. Растение винограда после 365 дней культивирования на свету

Проведены исследования с целью оптимизации условий сохранения растений *in vitro* для замедления ростовых процессов. Определеныпараметры 6 основных факторов, влияющих на эффективность беспересадочного культивирования растений винограда в вегетирующей коллекции на свету и в темноте. Разработаны технологические режимы сохранения растений винограда *in vitro*, не требующие специального оборудования, асреды не содержат гормональных добавок, которые в результате длительного культивирования могут привести к мутациям [9,10]. После одного-двух лет беспересадочного культивирования растения сохраняют жизнеспособностьи обладают относительно высокой регенерирующей способностью почки(рис. 1).

По итогам многолетних исследований по оптимизации условий размножения и сохранения растений винограда разработана блок-схема комплексной технологии длительного сохранения растений и клонального размножения винограда *in vitro*(рис. 2). Объединены в одну систему технологии сохранения и размножения винограда. Схема состоит из трех блоков.

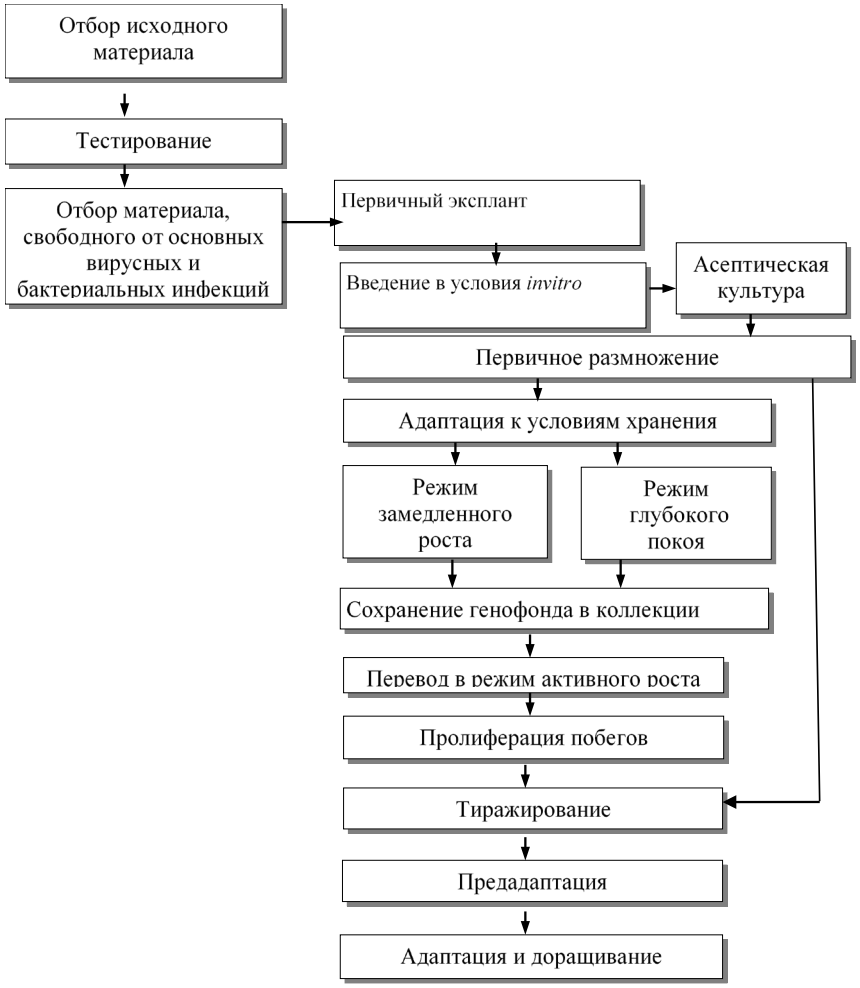


Рис. 2. Схема комплексной технологии длительного сохранениями клонального микроразмножения растений винограда in vitro

Приём материалов статей по адресу: actbio@mail.ru

Первый блок отражает основные этапыотбора исходного материала для выделения первичного экспланта, который, в той или иной форме, будет вводиться в условия *in vitro*. Этот этап имеет ключевое значение. От чистоты исходного материала напрямую зависит качество конечного продукта. Поэтому особое внимание уделяется фитосанитарному состоянию маточного растения, его качественным характеристикам. Для введения в условия *invitro* материал может поступать как непосредственно с поля, так и после проращивания одревесневшей лозы в лабораторных условиях. На основе результатов тестирования проводится отбор материала, свободного от основных вирусных и бактериальных инфекций.

Второй блок включает основные технологические процессы клонального микроразмножения: получение асептической культуры растений и первичное размножение (подготовка экспланта, стерилизация, индукция побегообразования, укоренение); тиражирование методом микрочеренкования с циклами пассажей по мере развития растений; предадаптацию, адаптацию и доращивание.

На этапе первичного размножения в схему клонального микроразмножения встраивается отдельным сегментом блок, включающий ряд последовательных операций по переводу растений в режим сохранения, непосредственно режим сохранения и переход в режим активной вегетации. Определение взаимосвязанных параметров факторов культивирования растений винограда, позволило сохранять вегетирующую коллекцию без субкультивирований в режиме замедленного роста и состоянии глубокого покоя. Она является источником оздоровленного посадочного материала винограда для массового размножения, способствует сокращению селекционного процесса и ускорению внедрения новых сортов в производство.

Таким образом, внедрение в производство объединенной в одну биотехнологическую систему, комплексной технологии длительного сохранения растений и клонального размножения винограда *in vitro*, позволит с небольшими затратами поддерживатьобразцы оздоровленного первичного материлаперспективных сортов и клонов винограда в рамках коллекции *in vitro*, что значительно укорит процессразмножения, создания маточных насаждений.

ЛИТЕРАТУРА

1. МулюкинаН.А., Зеленянская Н.Н., Джабурия Л.В. Применение методов культуры тканей и органов *invitro* для размножения исходного клонового материала винограда // Садоводство и виноградарство. – 2013. – № 2. – С. 36–40.

2. Дорошенко Н.П. Оздоровление, клональное микроразмножение и депонирование винограда в культуре *in vitro* // «Магарач». Виноградарство и виноделие. – 2015. – № 3. – С. 49–51.

3. Павлова И.А., Зленко В.А., ВолынкинВ.А. Применение методов биотехнологии для получения оздоровленного посадочного материала винограда // Сучасний стан та перспективи розвитку насінництва в Україні: Наукові праці Південного філіалу «Кримський Агротехнологічний університет» Національного аграрного університету. – Сімферополь, 2008. – Вип. 107. – С. 161–164.

4. Клименко В.П., Павлова И.А. Перспективы использования вегетирующей коллекции винограда *invitro* для создания базисных маточников // «Магарач». Виноградарство и виноделие. – 2017. – № 3. – С. 6–9.

5. Решетников В.Н., Спиридович Е.В., Носов А.М. Биотехнология растений и перспективы ее развития // Физиология растений и генетика. -2014. – Т. 46, № 1. – С. 3–18.

6. Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур. – К.: Аграрна наука, 2011. – 344 с.

7. Cruz-CruzC.A. Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity / González-ArnaoM.T., Engelmann F. // Resources. – 2013. – V. 2. – P. 73–95.

8. Молканова О.И., Коновалова Л.Н., Стахеева Т.С. Особенности размножения и сохранения ценных и редких видов растений в условиях *in vitro* // Бюллетень ГНБС. – 2016. – Вып. 120. – С.17–23.

9. Павлова И.А., Клименко В.П. Параметры культивированиядля длительного хранения растений винограда в вегетирующей коллекции *in vitro* // «Магарач». Виноградарство и виноделие. – 2018. – № 2. – С. 9–11.

10. Клименко В.П., Павлова И.А. Создание посадочного материала винограда высоких биологических категорий качества на основе использования современных агробиотехнологий // «Магарач». Виноградарство и виноделие. – 2018. – № 4. – С. 34–36

УДК 58.085

ВЛИЯНИЕ ФИТОГОРМОНОВ НА РИЗОГЕНЕЗ SALVIA AUSTRIACA L.

Е.В. Васильченко

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону. Россия

Шалфей австрийский (*Salvia austriaca* Jacq.) – лекарственное, эфирномасличное, медоносное, декоративное степное травянистое растение, встречающееся в области в приазовских разнотравно-дерновиннозлаковых целинных степях на высококарбонатных чернозёмах, в каменистых степях на карбонатных породах, на склонах балок, а также среди низкорослых степных кустарников. Имеет узкую экологическую амплитуду, малочислен в большинстве популяций. Лимитирующими факторами распространения являются уничтожение местообитаний при хозяйственной деятельности и антропогенные нарушения среды обитания. Входит в красную книгу РО. Категория статуса редкости 2 а. Относится к видам с сокращающейся численностью в результате изменения условий существования или разрушения местообитаний. [8].

Цель работы – изучить влияние различных фитогормонов на ризогенез шалфея австрийского.

Исследование проводилось на базе лаборатории клеточных и геномных технологий растений ботанического сада ЮФУ.

В качестве первичного экспланта использовались семена из коллекции ботанического сада ЮФУ. Семена стерилизовались по следующей схеме: 70 % раствор этанола (30 сек.), обработка 20 % раствора «белизны» в течение 2,5 мин. (3 % раствор в пересчете на гипохлорит натрия) [7] и промывка стерильной дистиллированной водой (3 раза по 10 мин.). После стерилизации семена высаживались на среду Мурасиге-Скуга (МС) [6] без добавления фитогормонов.

Стерилизация и высадка всех эксплантов осуществлялась в ламинар-боксе.

Для мультипликации побегов использовали среду МС с добавлением 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) и 0,1 мг/л нафтилуксусной кислоты (НУК). Далее растения-регенеранты переносились на безгормональную среду МС, а затем на одну из сред для укоренения: МС с половинным содержанием солей с добавлением индолилуксусной кислоты (ИУК) (0,25 мг/л; 0,5 мг/л; 1 мг/л), нафтилуксусной кислоты (НУК) (0,25 мг/л; 0,5 мг/л; 1 мг/л) или индолилмасляной кислоты (ИМК) (0,25 мг/л; 0,5 мг/л; 1 мг/л).

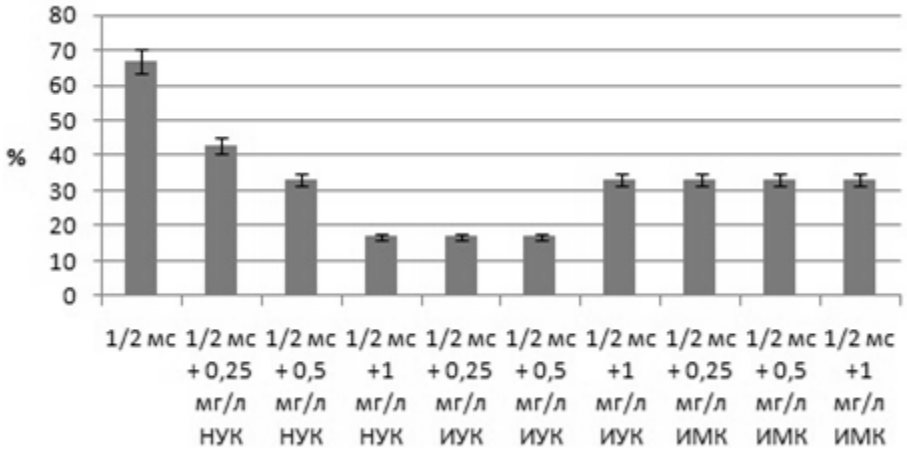


Рисунок 1 – Эффективность укоренения шалфея австрийского

Стерилизация сред проводилась в автоклаве при температуре 121 ºС в течение 20 минут. В качестве гелеобразующего средства применялся агар-агар (7 г/л). РН сред доводился до значения 5,8 с помощью 1 М КОН. Культуры помещались в условия 16-часового фотопериода при температуре 25 ºС.

В ходе работы было установлено, что добавление ИУК, НУК и ИМК к концентрациях 0,25 мг/л, 0,5 мг/л и 1 мг/л тормозит ризогенез шалфея австрийского (рис. 1). Испанские исследователи также сообщают, что у *S. valentina* Vahl, *S. blancoana* Webb& Heldr ризогенез проходит лучше на безгормональной среде, а добавление ауксинов тормозит данный процесс [1]. Американские авторы

отмечают, что высокие концентрации ИУК при ризогенезе стимулируют каллусогенез и пролиферацию каллуса, что тормозит процессы роста и укоренения [3]. В тоже время для некоторых видов шалфея (*S. broussonetii* Benth., *S. guaranitica* Benth., *S. splendens* Sellowex Nees) приводятся данные по более успешному ризогенезу при использовании ИУК [2, 4, 5].

ЛИТЕРАТУРА

Cuenca S., Amo-Marco J.B. In vitro propagation of two spanish endemic species of salvia throught bud proliferation //In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. – 2000. – Т. 36. – №. 3. – С. 225–229.

Echeverrigaray S., Carrer R.P., Andrade L.B. Micropropagation of Salvia guaraniticaBenth. through axillary shoot proliferation //Brazilian Archives of Biology and Technology. – 2010. – Т. 53. – №. 4. – С. 883–888.

Liu W. et al. Regeneration of Salvia sclarea via organogenesis //In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. – 2000. – Т. 36. – №. 3. – С. 201–206.

Mederos-Molina S. Micropropagation of Salvia broussonetiiBenth.-a medicinal plant species //Plant Tissue Culture and Biotechnology. – 2006. – Т. 16. – №. 1. – С. 19–23.

Sharma S. et al. In vitro propagation and synseed production of scarlet salvia (Salvia splendens) // RendicontiLincei. – 2014. – Т. 25. – №. 3. – С. 359–368.

Егорова Н.А., Ставцева И.В., Митрофанова И.В. Морфогенез и клональноемикроразмножениеSalviasclarea L. in vitro // Сборник научных трудов Государственного Никитского ботанического сада. – 2011. – №. 133.

Карпеченко К.А. и др. Введение в культуру in vitro шалфея клейкого (Salvia glutinosa L.) // Фундаментальные исследования. – 2012. – Т. 1. – №. 5.

Красная книга Ростовской области: В 2 тт. / Администрация Ростовской области, Комитет но охране окружающей среды и природных ресурсов. – Ростов н/Д: Малыш, 2004. – Т. 2: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения грибы, лишайники и растения / Отв. ред. В.В. Федяева; авт.-сост. Т.И. Абрамова [и др.]. – 333 с.

УДК 577.22: 577.088

МИКРОСАТЕЛЛИТНОЕ ГЕНОТИПИРОВАНИЕ СОРТОВ КЛЕВЕРА ЛУГОВОГО И ЛЮЦЕРНЫ СЕЛЕКЦИИ ВНИИ КОРМОВ ИМ. В.Р. ВИЛЬЯМСА

И.А. Клименко, А.О. Шамустакимова, Н.В. Капустина, М.А. Макаренков

ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса, Лобня Московской обл., Россия

В Государственном реестре селекционных достижений РФ зарегистрировано 150 сортов кормовых культур селекции ВНИИ кормов, что составляет около 14 % от всех районированных на территории России. Сорт в современном кормопроизводстве определяет решение многих экологических и экономических проблем, является основой формирования отбора ценных генотипов для использования в селекционных программах. Быстрое развитие селекции и появление ежегодно большого количества новых сортов растений обусловливает необходимость применения надежной системы маркирования для контроля подлинности и генетической однородности материала, охраны интеллектуальной собственности селекционеров. В последние годы эти задачи успешно решаются внедрением в практику современных биотехнологических подходов, основанных на изучении генетической изменчивости с помощью ДНК-маркеров.

Молекулярные методы идентификации сортов растений основаны на определении длины фрагмента ДНК в отдельном участке хромосом. Количество таких участков в геноме велико, поэтому возможности метода неограниченны при условии выбора наиболее информативных и удобных для анализа молекулярных маркеров. Чаще всего при изучении биоразнообразия растительных видов, популяций, отдельных генотипов используют микросателлиты – монолокусные ДНК-маркеры, которые характеризуются высокой частотой распределения по геному и кодоминантным типом наследования [1].

Цель работы – оценка ДНК-полиморфизма сортов клевера лугового и люцерны на основе анализа микросателлитов и определении набора генетических маркеров для межсортовой дифференциации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследований служили 6 сортов клевера лугового – Ранний 2, Марс, ВИК 77, Топаз, Трио, Метеор – и 6 сортов люцерны – Соната, перспективный сортообразец А2, Находка, Мира, Агния, Пастбищная 88 – селекции ВНИИ кормов им. В.Р. Вильямса.

Геномную ДНК для ПЦР выделяли, руководствуясь методикой, известной под названием балк-анализ [2; 3]. Для этого от каждого сорта формировали общую навеску из 30 проростков семян, предварительно проскарифицированных и выращенных в чашках Петри в течение 7 дней. ДНК-экстракцию провели с использованием реагентов из коммерческого набора «ДНК-Экстран-4» от компании «Синтол» (Россия) по инструкции производителя с некоторыми модификациями. В частности, лизирующий буфер готовили в соответствии с протоколом SDS-метода из расчета на вес пробы растительной ткани для каждого индивидуального образца.

Оценка ДНК-полиморфизма проведена с использованием 6 микросателлитных (SSR) праймеров, разработанных ранее для изучения генома клевера лугового [4; 5]. Праймеры синтезированы в компании «Евроген» (Россия). Амплификация была выполнена в термоциклере «Bio-Rad iCycler» (США) в соответствии с условиями, описанными в вышеуказанных литературных источниках.

Полученные ПЦР-продукты разделяли путем электрофореза в 4 % агарозном геле («MetaPhor^{R} Agarose», США) в присутствии бромистого этидия. Для определения размера фрагментов ДНК использовали маркер молекулярной массы 20 bp DNA Ladder («Takara BIO Inc.», Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В серии ПЦР с большей частью испытанных праймеров получены фрагменты амплифицированной ДНК разного размера и интенсивности, за исключением RCS1640, амплификация с которым была слабовыраженной и невоспроизводимой в повторных экспериментах на изучаемых культурах. Для статистической обработки отбирали наиболее отчетливые и воспроизводимые бэнды (полоски фрагментов амплифицированной ДНК). Индекс информативности праймеров и показатели, характеризующие генетическое разнообразие изучаемого материала, определяли с помощью специализированных компьютерных программ «Microsatellite toolkit» и «GelAnalyzer» (табл. 1).

Таблица 1. Полиморфизм SSR-локусов, полученных при анализе сортов клевера лугового и люцерны селекции ВНИИ кормов им. В.Р. Вильямса

Локус	Число аллелей		Размер аллелей, п.н.		He		PIC	
	сорта клевера лугового	сорта люцерны	сорта клевера лугового	сорта люцерны	сорта клевера лугового	сорта люцерны	сорта клевера лугового	сорта люцерны
RCS1307 (Sato et al., 2003)	3	5	149–159	104–140	0,747	0,867	0,641	0,745
RCS3711 (Sato et al., 2003)	5	4	147–153	157–162	0,835	0,788	0,740	0.671
RCS3095 (Sato et al., 2003)	12	-	207–224	-	0,923	-	0,842	-
RCS0033 (Sato et al., 2003)	-	6	-	132–138	-	0,848	-	0,744
TPSSR16 (Kölliker et al., 2006)	-	7	-	180–216		0,924		0,828
RCS1640 (Sato et al., 2003)	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: PIC – polymorphism information content (индекс информативности маркера), He – ожидаемая гетерозиготность

Праймер RCS1307 оказался информативным при анализе сортов как клевера лугового, так и люцерны. С ним выявлены сортоспецифичные микросателлитные локусы. Например, в спектрах сортов Трио и Метеор обнаружены фрагменты амплификации амплификации в 140 и 150 п.н., которые отсутствовали у других сортов. С этим же праймером получены специфичные фрагменты амплификации для сортов люцерны Соната и Пастбищная 88 (110 п.н.). С праймером TPSSR16 получен специфический фрагмент амплификации (200 п.н.) для сорта люцерны Мира. Выявленные ДНК-маркеры можно применять для дифференциации указанных сортов на генетическом уровне.

Таким образом, установлено, что микросателлитные маркеры обладают сортоспецифичностью и могут быть использованы для различения и идентификации селекционного материала. По результатам генотипирования определены 2 информативных SSR-праймера, выявляющие ДНК-полиморфизм между сортами клевера лугового и люцерны селекции ВНИИ кормов им. В.Р. Вильямса: RCS1307 и TPSSR16. Исследования продолжаются с расширенной выборкой сортов и дополнительным набором SSR-праймеров. Полученные данные вносятся в электронный каталог сортов, а уникальные спектры, представленные в виде комбинации длин фрагментов ДНК в конкретных участках хромосом, будут использованы при разработке молекулярно-генетического паспорта для каждого изученного сорта.

ЛИТЕРАТУРА

Tautz, D. and Renz, M. (1984). Simple Sequences Are Ubiquitous Repetitive Components of Eukaryotic Genomes. Nucleic Acids Research, 12, 4127–4138.

Steve Quarrie, Vesna Lazic Jancic, Dragan Kovacevic, Andy Steed and Sofija Pekic. Balk-segregant analysis with molecular markers and its use for improving drought resistance in maze. Journal of Experimental Botany. 1999. Vol. 50, No. 337. P. 1299–1306.

Kölliker R, Jones ES, Jahufer MZ, Forster JW (2001). Bulked AFLP analysis for the assessment of genetic diversity in white clover (*Trifolium repens* L.). Euphytica 121: 305–315.

S. Sato, S. Isobe, E. Asamizu, N. Ohmido, K. Okumura, I. Klimenko, S. Sasamoto, T. Wada and S. Tabata. Comprehensive Structural Analysis of the Genome of Red Clover (*Trifolium pratense* L.) // DNA Research 12, 301–364 (2005).

Kölliker R, Enkerly J, Widmer F (2006). Characterization of novel microsatellite loci for red clover (*Trifolium pratense* L.) from enriched genomic libraries. Mol Ecol Notes 5:50–53.

УДК 664.642 (664.681.1)

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ДРОЖЖЕВОГО ПЕЧЕНЬЯ

О.В. Старовойтова, З.Ш. Мингалеева, О.А. Решетник

Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, Россия

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время актуально, появление новых полезных продуктов в том, числе и с добавками растительного происхождения, производимые местными предприятиями. В последние годы освоена переработка семян тыквы, производство тыквенного масла и муки. Если раньше эти продукты реализовались только в аптеках, то теперь они находят применение в пищевой промышленности, в том числе и при производстве мучных изделий.

Анализ литературы [1–3], показал необходимость развития новых подходов к поиску и применению различных добавок растительного происхождения при производстве мучных изделий. Очевидна актуальность применения муки из семян тыквы при создании новых продуктов с учетом требований здорового питания. Мука из семян тыквы богата витаминами, пищевыми волокнами, среди однотипных продуктов тыквенная мука является чемпионом по содержанию цинка, калия и магния. Кроме того, применение натурального сырья растительного происхождения при производстве мучных кондитерских изделий позволяет не только повышать качество и пищевую ценность, расширять ассортимент изделий, но и рационально использовать местные сырьевые ресурсы.

Цель работы заключалась в исследовании влияния муки из семян тыквы на свойства основного сырья при приготовлении мучных изделий и разработка технологии дрожжевого печенья.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения экспериментов была использована пшеничная мука высшего сорта. Прессованные хлебопекарные дрожжи и мука из семян тыквы. Муку из семян тыквы при проведении исследований добавляли в дозировке 2–10 % к массе муки. За опытные образцы принимали образцы с внесением муки из семян тыквы, за контрольные – без нее.

Проводили исследования влияния муки из семян тыквы на количество и качество клейковины.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из данных, приведенных на рисунке 1, внесение муки из семян тыквы существенно не влияет на выход сырой клейковины пшеничной муки высшего сорта.

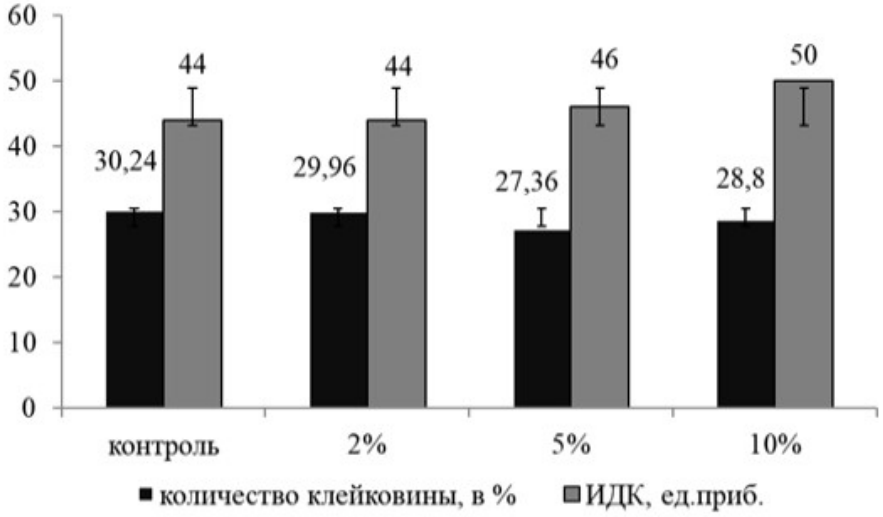


Рисунок 1 – Влияние муки из семян тыквы на содержание и упругие свойства клейковины

Из диаграммы видно, что мука из семян тыквы в дозировках 2–10 % не оказывала существенного влияние на количество клейковины. С увеличением дозировки муки из семян тыквы упругие свойства клейковины, определяемые на приборе ИДК, усиливались. Отмечено укрепление клейковины на 5–8 %. Укрепление сырой клейковины можно объяснить образованием сложных липопротеиновых комплексов, образующихся при взаимодействии клейковинного белка с отдельными группами липидов, входящих в состав муки из семян тыквы, а также действием окислительных реагентов на белковые вещества муки и теста.

Для исследования влияния муки из семян тыквы на жизнедеятельность хлебопекарных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, определяли подъемную силу, при внесении муки в тесто различных дозировок. Определение подъемной силы дрожжей проводили по скорости всплывания шарика теста. Ускоренный метод определения быстроты подъема основан на измерении скорости всплытия в воде шарика теста, замешенного в строго определенных условиях. Для проведения исследований тесто замешивали из пшеничной муки высшего сорта с добавлением муки из семян тыквы в количестве 2–10 % к массе муки. На рисунке 2 показано изменение подъемной силы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в зависимости от дозировки муки из семян тыквы.

Результаты исследования влияния муки из семян тыквы на подъемную силу прессованных дрожжей показали, что при увеличении дозировке до 10 % время подъема шарика снижается на 20 минут, что свидетельствует о повышении бродильной активности хлебопекарных дрожжей. По-видимому, это связано с тем, что мука из семян тыквы содержит сахара, аминокислоты, соли минеральных веществ, органические кислоты, которые обеспечивает дополнительное доступное питание для дрожжевых клеток и активацию бродильных ферментов.

Максимальное снижение времени подъема на 20 мин отмечено при добавлении муки из семян тыквы в дозировке 10 % от массы муки.

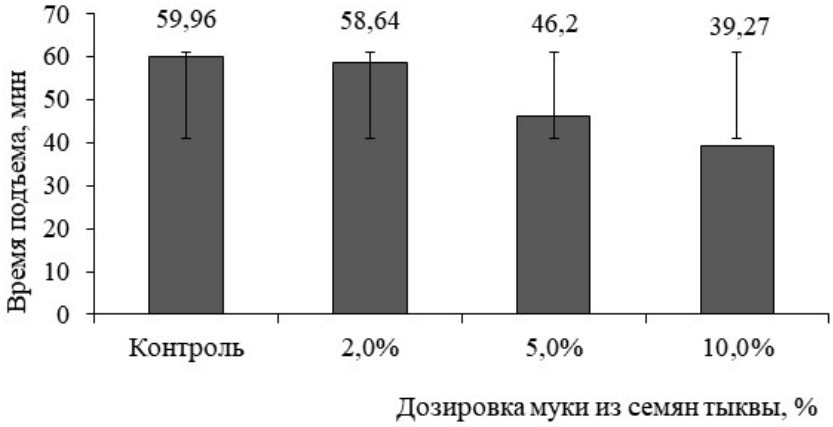


Рисунок 2 – Подъемная сила дрожжей Saccharomyces cerevisiae в зависимости от дозировки муки из семян тыквы

Дальнейшие исследования были связаны с рассмотрением возможности исключения жиросодержащего сырья из традиционной рецептуры печенья при производстве опытных образцов печенья с добавлением муки из семян тыквы. Результаты исследований, свидетельствуют о том, что все показатели качества контрольных и опытных образцов, приготовленного дрожжевого печенья соответствовали требованиям нормативной документации. Установлено, что с увеличением дозировки муки из семян тыквы в опытных образцах, повышается влажность готовых изделий. Максимальное значение показателя влажности отмечено в опытных образцах, содержащих 10 % муки из семян тыквы. Показатель кислотность готовых изделий существенно не менялся в зависимости от дозировки муки из семян тыквы. Такие показатели как намокаемость и плотность опытных образцов печенья максимум повышались на 6,7 % и 22 % соответственно относительно контроля. Наилучшие показатели качества дрожжевого печенья отмечены в опытных образцах, содержащих муку из семян тыквы в дозировках 5 и 10 % к массе муки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований разработана технология для приготовления нового дрожжевого печенье «Эмеральд» с применение муки из семян тыквы. Энергетическая ценность печенья «Эмеральд» составляет 375,3 ккал / 100 г., что ниже аналогов на 123,9 ккал. Отмечено в сравнении с контрольным образцом в разработанной продукции снижение количества жира и повышение количества белка на 8 %. Кроме того, дрожжевое печенье «Эмеральд» обогатилось витаминами, макро-и микроэлементами, пищевыми волокнами. Таким образом, разработанная технология дрожжевого печенья показала эффективность применения муки из семян тыквы в качестве растительной добавки при производстве печенья.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вершинина, О.Л. Применение пищевых добавок в технологии хлебопечения / О.Л. Вершинина, Н.Н. Корнен, С.А. Ильинова // Известия вузов. Пищевая технология. – № 5–6. – 2010. – С. 27–30.

2. Шершнева, О.М. Производство хлебобулочных изделий при использовании биологических добавок / О.М. Шершнева, С.Ф Рюмшина // Хранение и переработка сырья. – 2017. – С. 18–21.

3. Корнен, Н.Н. Влияние растительных пищевых добавок на свойства пшеничной муки и теста/ Н.Н. Корнен, Т.А. Шахрой, С.А. Калманович // Научный журнал Куб ГАУ. – № 128 (04). – 2017. – С. 1–13.

УДК 641.12:612.398

ПРОЕКТИРОВАНИЕ ГИПОАЛЛЕРГЕННОЙ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ ИЗ МЯСА ИНДЕЙКИ СО СБАЛАНСИРОВАННЫМ АМИНОКИСЛОТНЫМ СОСТАВОМ

А.А. Смоленцева, Р.А. Бежанова

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия
Высшая школа биотехнологий и пищевых производств, Санкт-Петербург, Россия

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время большое внимание уделяется разработке гипоаллергенной продукции для детского питания. По данным ВОЗ около 40 % населения в мире страдает разными аллергическими заболеваниями. Среди них от 2 % до 7 % взрослых людей и 7,5 % –13 % детей имеют пищевую аллергию [1]. Наиболее частой причиной развития пищевой аллергии у детей является непереносимость белков коровьего молока. Нередко эта непереносимость сочетается с сенсибилизацией к другим продуктам: говядине, крупам, овощам и фруктам. Значительной аллергенной активностью обладают белки куриных яиц, мяса и бульона. Среди белков злаковых наибольшей аллергенностью обладает белок пшеницы, ржи, ячменя – глютен, который может быть причиной, как пищевой аллергии, так и целиакии. Распространены аллергические реакции при употреблении рыбы и различных морепродуктов [2].

По степени аллергизирующей активности выделяют три группы пищевых продуктов [3]: высокая – коровье молоко, рыба, яйцо, куриное мясо, говядина, телятина, пшеница, рожь; средняя – кукуруза, картофель, горох, свинина, индейка, кролик; низкая – конина, баранина.

Одним из принципов создания гипоаллергенных продуктов, является замена сырья с высокой степенью аллергенности на гипоаллергенное. Такой подход используется при разработке гипоаллергенных молочных смесей, мясных, овощных и крупяных продуктов для детей первых лет жизни. Организация питания детей с аллергией старше трех лет в дошкольных и школьных образовательных учреждениях не предусматривает индивидуализации рациона и заключается чаще всего в исключении аллергенных продуктов. Это приводит к снижению пищевой и биологической ценности рациона, недостатку важных для детского организма минеральных веществ и витаминов [4]. Так, исключаемые продукты обеспечивают 77 % суточной потребности ребенка в белках, 68 % в жирах, 9 % в углеводах, 73 % в кальции, 64 % в магнии, 93 % в фосфоре, 100 % в витамине А[5]. В связи с этим разработка гипоаллергенной кулинарной продукции из мяса индейки для организации питания детей в социальных учреждениях является актуальной задачей.

Гипоаллергенные продуктовые наборы, разработанные для организации питания детей разных возрастных групп в дошкольных и школьных образовательных учреждениях, включают мясо индейки, кролика, свинины, гречневую и рисовую крупы, овощи с белой и зеленой окраской [5]. Ассортимент кулинарной продукции из мяса индейки в действующей нормативной документации представлен блюдами из мелкокускового тушеного мяса, такими как плов, рагу, и блюдами из рубленого мяса – котлеты, биточки, кнели, суфле. Традиционные рубленые изделия из мяса птицы готовят с добавлением пшеничного хлеба, молока и куриных яиц [6]. Заменить эти аллергенные продукты можно безглютеновыми крупами или мукой, например, рисовой и гречневой.

По данным ряда авторов [7, 8, 9], сочетание в рецептурах продуктов животного и растительного происхождения позволяет получать продукцию более высокой биологической ценности, чем исходные продукты. Поэтому целью нашего исследования является оптимизация рецептур гипоаллергенной кулинарной продукции мяса индейки и круп по аминокислотному составу. Для реализации этой цели решали следующие задачи: исследовать аминокислотный состав мяса индейки и круп; изучить динамику изменения скора лимитирующей аминокислоты и неутилизируемой части белка в зависимости от соотношения продуктов в рецептуре; найти оптимальное соотношение продуктов при создании гипоаллергенной кулинарной продукции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования были выбраны мясо индейки, рисовая крупа и мука; кулинарная продукция из мяса птицы.

Оптимизацию рецептур проводили расчетно-графическим методом, разработанным Н.И. Ковалевым с соавторами [9]. В качестве критериев оптимизации применяли: аминокислотный скор, который должен стремиться к 100 %; неутилизируемую часть белка (ΔБ, мг), котораядолжна стремиться к минимальному значению. Последний критерийрассчитывали по формуле (1)

$$\Delta Б = \sum_{i=1}^{8} AK_{факт.i} - \min(\frac{AK_{факт.i}}{AK_{ид.i}}) \cdot 360 \quad (1)$$

где $AK_{факт.i}$ – содержание і-той незаменимой аминокислоты в 1 г белка продукта, мг; $AK_{ид.i}$ – содержание і-той незаменимой аминокислоты в 1 г идеального белка, мг; 360 – сумма незаменимых аминокислот в 1 г идеального белка, мг.

Оценочным показателем биологической ценности продукта или смеси продуктов, является коэффициент утилизации белка (КУБ, %), который рассчитывали по формуле (2)

$$K_{уб} = \frac{1000 \cdot K_{усв.см.} - \Delta Б}{1000} \cdot 100\% \quad (2)$$

Коэффициент усвоения белка смеси рассчитывали по формуле (3)

$$K_{усв.см.} = \sum_{j=1}^{N} \alpha_j \cdot K_j \quad (3)$$

где α_j – доля ингредиента в смеси, %; K_j – коэффициент усвоения белка ингредиента смеси.

Предложенный метод реализован в компьютерной программе «Оптимизация аминокислотного состава». Программа позволяет находить оптимальное соотношение продуктов и визуализировать зависимость критериев оптимизации от соотношения продуктов в смеси.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При проектировании гипоаллергенной продукции использовали данные по содержанию белка и аминокислот из доступных источников [10, 11, 12] (табл. 1, 2).

Таблица 1 – Показатели биологической ценности белка мяса индейки

Наименование показателя	Белое мясо индейки без кожи [10]		Красное мясо индейки без кожи [10]		Индейка 1 категории с кожей [11]		Индейка 2 категории с кожей [11]	
	мг на 100 г.	скор, %	мг на 100 г.	скор, %	мг на 100 г.	скор, %	мг на 100 г.	скор, %
Белок, г	14,64		12,15		19,5		21,6	
Сумма незаменимых аминокислот	7962		7650		8357		9334	
Валин	990	135	894	147	930	95	1017	94
Изолейцин	982	168	935	192	963	123	1028	119
Лейцин	1509	147	1491	175	1587	116	1819	120
Лизин	1544	191	1600	239	1636	152	1931	163
Метионин + цистин	275 + 182	**89**	136 + 151	**67**	497 + 121	**91**	518 + 144	**88**
Треонин	971	166	1009	207	875	113	961	111
Триптофан	-	-	-	-	329	169	354	164
Фенилаланин + тирозин	837 + 672	172	817 + 617	196	803 + 616	121	851 + 711	120
Неутилизируемая часть белка (ΔБ), мг	245,2		413,7		102,6		116,9	
Коэффициент утилизации белка (КУБ), %	70,5		53,6		84,7		83,3	

Расчет показателей биологической ценности (табл. 1) показал, что белок мяса индейки лимитирован по серосодержащим аминокислотам. Наименьший скор имеет белок мышечной ткани окорочков (красное мясо). Сравнительная характеристика аминокислотного состава разных частей туши индейки представлена на диаграмме (рис. 1).

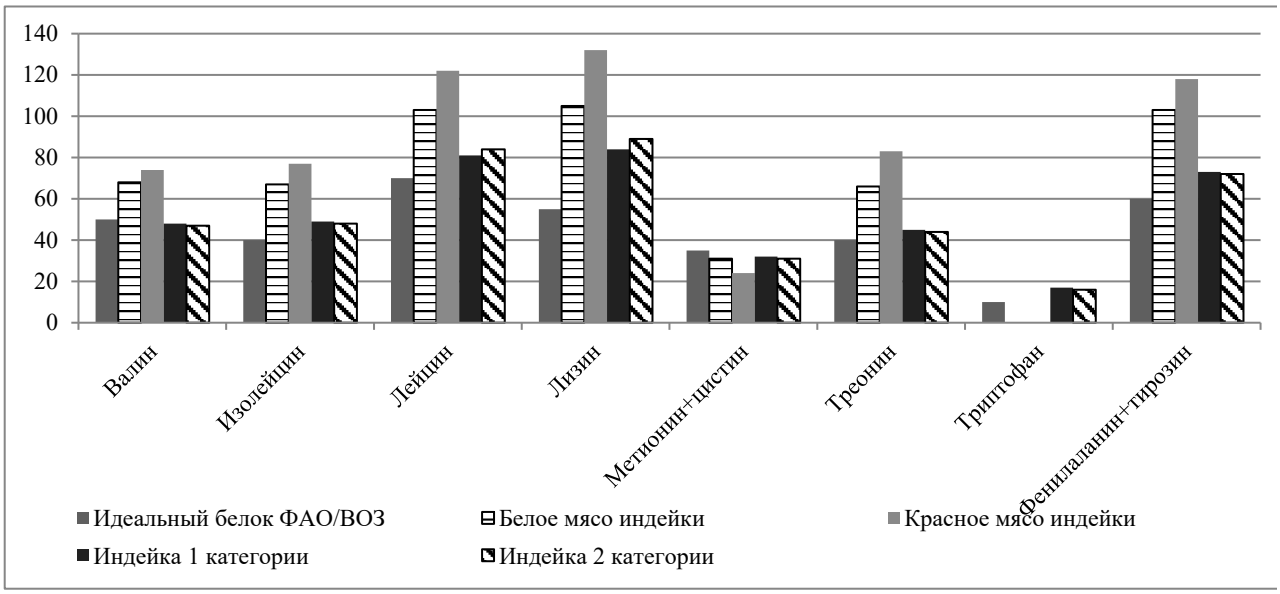


Рисунок 1 – Сравнительная характеристика аминокислотного состава (мг на 1 г белка)

Несмотря на высокое содержание незаменимых аминокислот в красном мясе, лучшей сбалансированностью отличается мясо индейки с кожей. Об этом свидетельствует наименьшее значение неутилизируемой части белка (ΔБ = 102,6 мг) и наибольшее значение коэффициента утилизации белка (КУБ = 84,7 %). Высокое содержание лизина во всех образцах создает предпосылки для комбинирования мяса индейки с растительными белками крупяных культур.

Показатели биологической ценности белка круп и муки приведены в таблице 2. Аминокислотный состав гречневой крупы и муки характеризуется лучшей сбалансированностью по сравнению с рисом. Лимитирующей аминокислотой в рисовой муке и крупе является лизин, а в гречневой – лейцин. В свою очередь наблюдается избыточное содержание метионина в сумме с цистином, что позволяет восполнить недостаток этих аминокислот при комбинировании круп с мясом индейки.

Таблица 2 – Показатели биологической ценности белка круп и муки [12]

Наименование показателя	Рисовая				Гречневая			
	крупа		мука		крупа		мука	
	мг на 100 г.	скор, %	мг на 100 г.	скор, %	мг на 100 г.	скор, %	мг на 100 г.	скор, %
Белок, г	6,9		6,8		13.1		12,4	
Незаменимые аминокислоты, мг	2579		2488		4020		3811	
Валин	472	137	466	134	577	88	559	89
Изолейцин	351	127	354	128	471	90	462	91
Лейцин	657	136	660	136	765	**83**	688	**79**
Лизин	252	**66**	259	**69**	674	99	624	97
Метионин + цистин	143 + 128	112	140 + 129	110	298 + 372	146	288 + 351	147
Треонин	236	86	248	86	467	89	452	91
Триптофан	100	143	100	152	180	143	175	141
Фенилаланин + тирозин	368 + 288	158	366 + 294	151	588 + 452	129	563 + 402	123
Неутилизируемая часть белка (ΔБ), мг	195,0		194,2		69,4		82,7	
Коэффициент утилизации белка (КУБ), %	64,5		64,6		71,1		69,7	

Динамика изменения показателей биологической ценности белка в смеси «индейка с кожей + рисовая крупа» представлена на рис. 2.

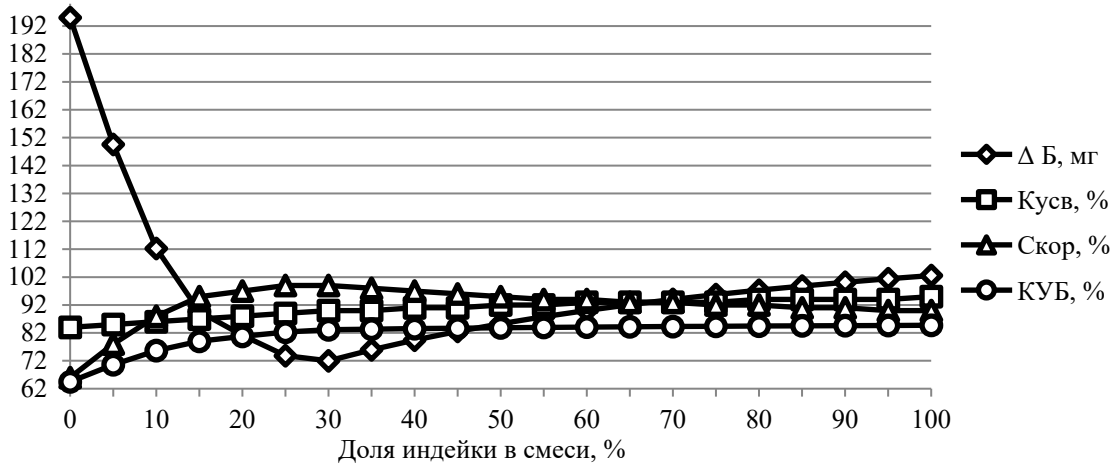


Рисунок 2 – График зависимости показателей биологической ценности белка смеси «индейка с кожей + рисовая крупа» от соотношения компонентов

Графики зависимости основных критериев оптимизации имеют точки перелома при содержании 30 % индейки в рецептуре, при этомскорлимитирующей аминокислоты достигает 99 %, а неутилизируемая часть белка снижается до 72 мг. Коэффициенты усвоения и утилизации белка возрастают с увеличением доли индейки до 30 %, а затем остаются постоянными. Анализ графика позволяет сделать вывод, что комбинирование рисовой крупы с мясом индейки повышает биологическую ценность конечной продукции, если доля риса не превышает 70 %.

Таблица 3 – Показатели биологической ценности двухкомпонентных смесей продуктов

Продукт	Соотношение продуктов	Белок, г в 100 г. продукции	$К_{усв.}$, %	$\Delta Б$, мг	Аминокислотный скор, %	КУБ, %	Кулинарная продукция [6]
Белое мясо индейки + рисовая мука	79 : 21	12,99	93	224,7	91 Мт + Цс	71,4	Суп-пюре из птицы
	15 : 85 33 : 67	7,96 9,38	87 89	99,0 150,4	105 Мт + Цс 100 Мт + Цс	77,4 75,0	
Белое мясо индейки + гречневая мука	90 : 10	14,41	93	216,0	93 Мт + Цс	72,2	Суфле из птицы
	46 : 54 75 : 25	13,43 14,08	85 91	60,9 168,6	115 Валин 100 Мт + Цс	81,1 74,9	
Красное мясо индейки + рисовая крупа	66 : 34	10,4	92	334,9	76 Мт + Цс	59,2	Плов из риса с птицей
	15 : 85	7,68	86	129,8	100 Мт + Цс	73,9	
Красное мясо индейки + гречневая крупа	66 : 34	12,47	89	235,2	92Мт + Цс	66,2	Плов из гречи с птицей
	39 : 61 55 : 45	12,72 12,57	85 87	84,0 174,3	112 Валин 100 Мт + Цс	76,8 70,4	
Индейка с кожей + рисовая мука	92 : 8	18,48	94	100,9	92 Мт + Цс	84,6	Кнели с рисом
	29 : 71	10,48	90	74,2	100 Мт + Цс	82,8	
Индейка с кожей + гречневая крупа	92 : 8	18,98	94	90,7	93 Мт + Цс	85,1	Котлеты паровые
	87 : 13	18,66	93	82,7	94 Валин	85,4	

В таблице 3 представлены значения показателей биологической ценности некоторых видов кулинарной продукции из мяса индейки и круп: суп-пюре, плов, суфле, кнели, котлеты паровые [6]. Высокие значения неутилизируемой части белка от 101 до 335 мг говорят о плохой сбалансированности аминокислот в белке кулинарной продукции.

Ниже приведены оптимальные соотношения продуктов, характеризующиеся более высокими значениями скора лимитирующей аминокислоты (более 100 %) и коэффициента утилизации белка. Оптимальные соотношения продуктов целесообразно использовать для корректировки рецептур суфле из птицы, плова, котлет паровых с гречневой крупой. В остальных случаях увеличение доли крупяного компонента в рецептурахсупа-пюре, плова из риса, кнелей значительно снижает содержание белка в продукции ине соответствует технологическим требованиям.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Белок мяса индейки нельзя считать полноценным, т. к. все исследованные образцы лимитированы по серосодержащим аминокислотам при высоком содержании остальных незаменимых аминокислот. Существенные различия в аминокислотном составе мяса индейки и круп позволяют проектировать кулинарную продукцию повышенной биологической ценности. Рассчитанные оптимальные соотношения продуктов целесообразно использовать для корректировки рецептур гипоаллергенной продукции, если это не противоречит технологическим требованиям.

ЛИТЕРАТУРА

Sampson, H.A. Food allergy. Part 1: Immuno pathogenesis and clinical disorders. JAllergyClinImmunol. 1999; 103: 717–728

Сафонова, А.И. Особенности организации прикорма у детей с пищевой аллергией // Вопросы детской диетологии. – 2011. – т. 9. – № 2. – С. 21–24.

Жаринов, А.И. Структурно-параметрическая модель гипоаллергенного продукта питания с оценкой адекватности/ А.И. Жаринов, Ю.И. Куликов, М.А. Никитина, М.Ю. Попова, Ю.В. Железная // Вестник Северо-Кавказского гос. техн. ун-та. – 2006. – № 5(9). – С. 55–60.

Куткина, М.Н. Организация питания детей и подростков: Учебное пособие./М.Н. Куткина, Е.П. Линич, Н.В. Барсукова, А.А. Смоленцева. – СПб.: Изд-во «Лань», 2017. – 320 с.

Смоленцева, А.А., Попова, В.Ю. Оценка пищевой ценности продуктового набора для детей и подростков с аллергией на белок коровьего молока. / В сборнике: Здоровьесберегающие технологии в ВУЗе: состояние и перспективы. Мат. Всеросс. н-практ. конф. Под общей редакцией Ю.Н.°Зубцова, 2018. – С. 73–79.

Сборник методических рекомендаций по организации питания детей и подростков в учреждения образования Санкт-Петербурга. – СПб.: Речь, 2008. – 800 с.

Иринина, О.И., Смоленцева, А.А. Оптимизация биологической ценности комбинированных рыборастительных кулинарных изделий. // Пищевая промышленность. – 2009. – № 10. – С. 66–67

Стружкина, А.А., Смоленцева, А.А. Биологическая ценность комбинированных мясорастительных кулинарных изделий/ В сборнике: Здоровьесберегающие технологии в ВУЗе: состояние и перспективы Материалы Всероссийской научно-практической конференции. Под общей редакцией Ю.Н. Зубцова, 2018. – С. 158–162

Kovalev, N.I. AnwendungeinergraphischrechnerischenMethodezurOptimierung von Mehrkomponenten-Eiweißgemischen / N.I. Kovalev, N.J. Karzeva; V.O. Fiterer; A.A. Smolenzeva A.A. // Food Nahrung. 1991; 35(1): 1–12

Гасилина, В.А., Тарарина, Л.И. Изучение показателей химического состава белого и красного мяса индеек в промышленных условиях Красноярского края // Вестник КрасГАУ. – 2010. – № 9. – С. 143–147

Химический состав пищевых продуктов. Кн. 2: справочные таблицы содержания аминокислот, жирных кислот, витаминов, макро- и микроэлементов, органических кислот и углеводов / Под ред. д-ра техн. наук И.М. Скурихина и проф., д-ра мед. наук М.Н. Волгарева. – М.: Агропромиздат, 1987. – 360 с.

Смоленцева, А.А. Полуфабрикаты из круп для диетического питания: дис. канд. техн. наук. – Л., 1989. – 260 с.

УДК 347.327

ИССЛЕДОВАНИЕ СУЛЬФИРОВАНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ РАСТИТЕЛЬНОГО МАСЛА

А.В. Протопопов, А.В. Голод, А.Е. Бовина

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

В настоящее время в мире ежегодно растет потребление синтетических моющих средств на основе ПАВ, также наблюдается устойчивый рост производства ПАВ. Заводы сульфирования, производящие в основном анионные поверхностно-активные вещества, находятся во всем мире. Сейчас существует дефицит сульфатов жирных кислот на отечественном рынке, который восполняется менее эффективными ПАВ или импортными, более дорогими аналогами. В настоящей работе представлено получения аналогов лаурилсульфата натрия методом сульфирования. В качестве сульфирующего агента применяется олеум, в качестве нейтрализующих агентов применяем щелочь.

Основными характеристиками, определяющими масштабы производства тех или иных ПАВ помимо их физико-химических свойств, являются их стоимость, наличие источников сырья и экологическая безопасность. Проблема синтеза хорошо биоразлагаемых ПАВ приобрела в настоящее время особенную актуальность. Основная доля в структуре потребления анионных ПАВ для технических и бытовых целей, принадлежит синтетическим моющим средствам (СМС). А из последних, наибольшее значение сегодня имеют алкилбензолсульфонаты (АБС). Однако экологические аспекты проблемы расширения производства СМС привели к снижению уровня выпуска АБС, поскольку они не подвергаются полному биохимическому разложению из-за наличия ароматического кольца. К числу практически полностью биоразлагаемых относятся олефинсульфонаты, производство которых стало бурно развиваться за рубежом в 1970-х годах.

Процессы сульфирования и сульфатирования очень важны, поскольку позволяют получать органические соединения, растворимые в воде.

В процессе сульфирования образуются сульфокислоты, RSO_2 OH, в которых сульфогруппа связана с атомом углерода алифатического или ароматического остатка. Сульфатированием называется реакция образования сложных эфиров серной кислоты – алкилсульфатов, $ROSO_2$ OH.

Сульфокислоты обычно хорошо растворимы в сульфомассе. Поэтому их чаще всего выделяют в виде солей.

Нами проведено исследование получения алкилсульфокислот непосредственно из подсолнечного масла. Подсолнечное масло обрабатывали олеумом при низких температурах и выдерживали в течении получаса. После взаимодействия образовывался смолистый продукт с высокой вязкостью, темно-красного цвета на просвет. После обработки полученного продукта раствором едкого натра были получены водорастворимые продукты, которые после высыхания представляют собой светложелтый твердый продукт.

Полученный алкилсульфонат проявляет хорошее смачивающее, диспергирующее, эмульсифицирующее действие и дает устойчивую обильную пену.

Следующим шагом мы провели анализ на анион – катион активность выборочных образцов.

К заранее рассчитанным образцам были добавлены 20 мл воды. В пробирке смешиваем 8 мл воды, 5 мл хлороформа, добавляем каплю метиленовый синий. Далее по 2 мл добавляем готовые образцы и наблюдаем за окраской. Метод анализа основан на способности ПАВ образовывать окрашенное соединение с ионами органического красителя противоположного заряда.

По итогу анализа, все образцы повели себя как анион активные.

Далее мы изучили растворимость выборочных образцов полученных из масла, в спирте, ацетоне, четырёххлористом углероде и эфире.

По результатам анализа большинство сульфатов жирных кислот растворимы в приведенных растворителях.

Исследование методом ИК-спектроскопии подтвердило образование сульфопроизводных жирных кислот растительного масла.

По сравнению с ИК-спектром исходного подсолнечного масла, на спектрах продуктов сульфирования появляются полосы поглощения гидроксильных групп и полосы поглощения в областях 1250 и 1050 $см^{-1}$, ответственные за колебания связи S-O в сульфокислотах.

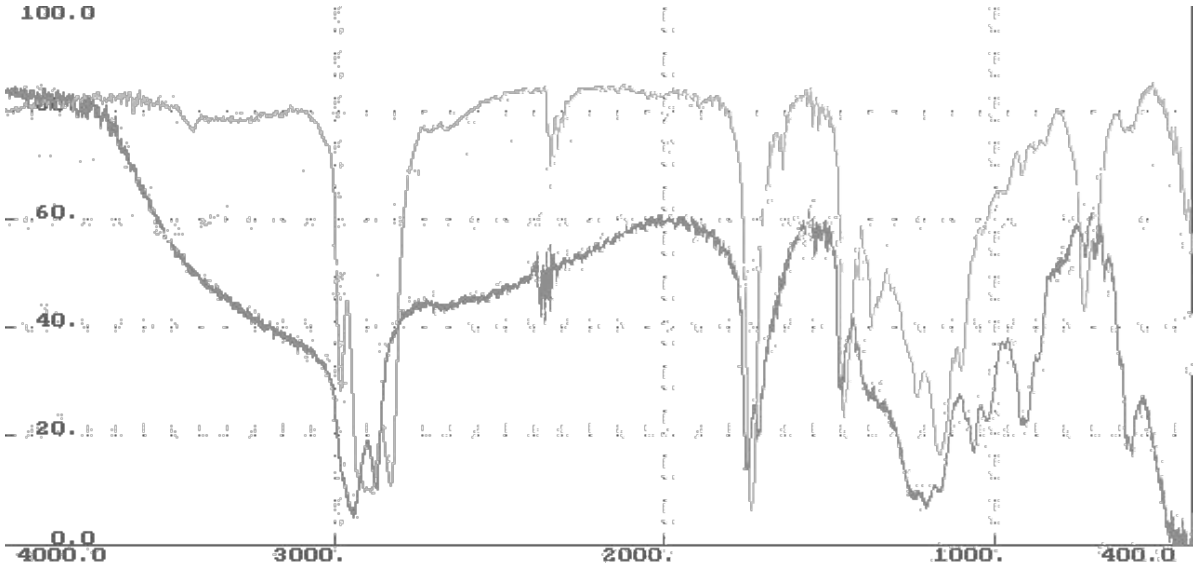


Рисунок 1 – Ик-спектр сульфатированного масла

Полученные сульфопроизводные поверхностно-активные вещества обладают липофильными свойствами и могут быть использованы в качестве добавок для буровых растворов, при нефтедобыче, в качестве эмульгаторов, флотореагентов, ингибиторов коррозии. Натриевые соли получаемых сульфокислот обладают хорошими поверхностно-активными свойствами и могут быть использованы в качестве компонентов моющих средств и гидрофильных добавок в качестве эмульгаторов и стабилизаторов.

ЛИТЕРАТУРА

1 Synthesis of palm oil-based diethanolamides / Lee C.S. [et al.] // J. Am. Oil. Chem. Soc. – 2007 – V. 84 – P. 945–952.

2 Synthesis of alkanolamide: a nonionic surfactant from the oil of gliricidia sepium / A. Adewuyi [et al.] // J. Surfact Deterg. – 2012 – V. 15 – P. 89–96.

3 Reck R.A. Industrial uses of palm, palm kernel and coconut oils: nitrogen derivatives / R.A. Reck // JAOCS. – 1985 – V. 62., issue 2 – P. 355–365.

4 Maag H. Fatty acid derivatives: important surfactants for household, cosmetic and industrial purposes / H. Maag // JAOCS. – 1984 – V. 61., issue 2 – P. 259–267.

УДК 636.087.69

ТЕХНОЛОГИЯ КОРМОВЫХ ДОБАВОК НА ОСНОВЕ ОТХОДОВ ПРОИЗВОДСТВА МИДИЙ

О.Е. Битютская, О.И. Лавриненко, Е.В. Спирато

Керченский государственный морской технологический университет, г. Керчь, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Одна из самых затратных статей в животноводстве – корма, на них приходится от 50 до 80 % всех расходов. С ценовой политикой на корма связана нерентабельность и неконкурентоспособность не только отдельных отраслей, но и животноводства в целом. Но и при таких затратах нет гарантии в том, что корм сбалансирован по питательным веществам, макро- и микроэлементам, витаминам. Поэтому для современного животноводства по-прежнему актуальны вопросы и полноценности рациона, и его экономичности.

Известно, что для развития животноводства особое значение имеют кормовые добавки животного происхождения. Их недостаточность в кормах приводит к перерасходу растительных кормов [1, 2]. В литературе имеются данные об использовании двустворчатых моллюсков для получения кормовых паст, гидролизатов для кормления птиц и животных [3, 4].

Исследованиями, проведенными в 2002 – 2011 гг., было показано, что черноморские мидии *Mytilus galloprovinciallis* Lam. и отходы их переработки целесообразно использовать для получения комбинированных кормовых добавок для животноводства [5–8].

Цель работы – разработка технологии кормовых добавок на основе отходов мидийного производства.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В результате ферментативного гидролиза мидийного сырья [9] был получен плотный (непроферментованый) остаток пастообразной консистенции, который составлял в среднем 6,5 % с содержанием сухих веществ 26,7 %. Химический состав плотного остатка характеризовался содержанием в среднем: белка (14 ± 0,5) %, жира (5,8 ± 0,7) %, минеральных веществ (2,6 ± 0,1) %, углеводов (4,4 ± 0,5) % и общей энергетической питательностью (ОЭ) (4,2 ± 0,2) МДж/кг ((0,37 ± 0,02) к.е.) (таблица 1).

Таблица 1 Химический состав мидийного плотного остатка

Сухие вещества	Массовая доля, % сырого вещества				БЭР, г/кг	ОЭ, МДж/кг
	жир	минеральные вещества	белок (N_o×6,25)	углеводы		
30,2	7,3	2,7	15,3	4,2	49,0	4,8
27,4	5,3	2,9	13,8	6,1	54,0	4,0
25,2	4,6	2,3	12,7	5,2	56,0	3,6
23,6	2,8	3,0	12,5	5,4	53,0	3,1
26,6	7,9	2,3	13,2	3,4	32,0	4,7
26,4	6,1	2,2	14,5	3,8	36,0	4,3
27,7	6,5	2,7	16,2	2,4	23,0	4,6

В аминокислотном составе белков плотного остатка преобладали аспарагиновая и глутаминовая кислоты, из незаменимых – триптофан (таблица 2). Показатели аминокислотного скора ниже такого в идеальном белке, но коэффициент аминокислотной сбалансированности ($U \to 1$) составляет 0,9.

Таблица 2 Аминокислотный состав белка мидийного плотного остатка

Наименование аминокислот	Содержание аминокислот		Аминокислотный скор относительно шкалы ФАО/ВОЗ
	в образце, г / 100 г. белка	в идеальном белке, г / 100 г. белка	
Незаменимые, в т. ч.	27,95		
Валин	3,40	5,0	0,68
Изолейцин	3,43	4,0	0,86
Лейцин	5,20	7,0	0,74
Лизин	4,57	5,5	0,83
Метионин + Цистин	1,66 + 0,95	3,5	0,75
Треонин	3,04	4,0	0,76
Триптофан	0,99	1,0	0,99
Фенилаланин + Тирозин	2,57 + 2,14	6,0	0,79
Заменимые, в т. ч.	38,51		
Аланин	3,35		
Аргинин	4,20	-	-
Аспаргинова кислота	6,99	-	-
Гистидин	1,32	-	-
Глицин	4,90	-	-
Глутаминовая кислота	10,60	-	-
Пролин	3,66	-	-
Серин	3,49	-	-

Липиды мидийного плотного остатка содержали до 30 % ПНЖК, из них 46 % приходилось на жирные кислоты семьи ω 3 (таблица 3). Для сравнения, на долю ПНЖК в кормовых продуктах, полученных путем ферментативного гидролиза, с черноморской хамсы и криля приходится соответственно 8,60 % и 15 % [10].

Таблица 3 Жирнокислотный состав липидов мидийного плотного остатка

Наименование жирных кислот	Содержание, % суммарного содержания ЖК в пересчете на сухие вещества	Наименование жирных кислот	Содержание, % суммарного содержания ЖК в пересчете на сухие вещества
Насыщенные, в т. ч	39,0	Полиненасыщенные, у т. ч.	27,9
Лауриновая С:12	0,1	Линолевая 18:2; 9, 12 ω 6	11,9
Миристиновая С:14	6,7	α-Линоленовая 18:3; 9, 12, 15 ω 3	1,9
Пальмитиновая С:16	22,2	γ-Линоленовая 18:3; 6, 9, 12 ω 6	1,5
Стеариновая С:18	4,2	Арахидоновая 20:4; 5, 8,11, 14 ω 6	1,6
Арахидиновая С:20	5,8	Эйкозопентаеновая 20:5; 5, 8, 11, 14, 17 ω 3	5,9
Мононенасыщенные, у т. ч.	21,6		
Пальмитолеиновая 16:1; 9	11,7	Докозопентаеновая 22:5; 7, 10, 13, 16, 19 ω 3	0,4
Олеиновая 18:1; 9	9,5		
Эруковая 22:1; 13	0,4	Докозогексаеновая 22:6; 4, 7, 10, 13, 16, 19 ω 3	4,7

В качестве одного из вариантов утилизации плотного остатка нами предложена следующая технологическая схема: замораживание остатка для частичного удаления свободной влаги после дефростации, грануляции и сушки в потоке горячего воздуха для достижения массовой доли влаги не более 12 %. Готовый кормовой продукт – мидийного крупка – содержит (46,38 ± 0,1) % протеина, общая энергетическая питательность – на уровне 1,17–1,19 к.е.

Эффективность мидийной крупки была подтверждена на опытных цыплятах с пятидневного возраста. Кормовая добавка вводилась в количестве 0,25 % от рациона, способствовала увеличению живой массы цыплят на 8,0 %, повышала сохранность на 5,0 %, при этом потери кормов снижались на 7,0 % [4].

Кроме плотного мидийного остатка отходами производства (до 66 %) в результате ферментативного гидролиза, как и при получении варено-мороженого мяса, являются мидийные створки.

Сухое вещество створок мидий состоит на 92,6 – 98,5 % из минеральных солей, на 1,5–7,4 % органических веществ, среди которых на долю азота общего приходится 0,15–0,50 %, липидов не более 0,05 %.

В элементарном составе сухих веществ створок 36,1 – 39,6 % приходится на кальций, 5,5 – 8,55 % – углерод, 0,01 – 0,39 % – магний, 0,01 – 0,09 % – фосфор; из микроэлементов обнаружены магний – 0,9 мг %, медь – 2,5 мг %, цинк – 0,75 мг %.

Одним из перспективных ингредиентов при изготовлении кормовых добавок может стать морская трава (зостера) – *Zostera marina* L., полисахариды которой имеют ряд полезных и целебных свойств. Установлено, что полисахарид зостерин в 2,0 – 2,5 раза увеличивает накопление в селезенке животных иммунных клеток, обладает выраженным антимикробным эффектом. Среди углеводов в зостере присутствуют редуцирующие сахара, альгиновые кислоты, пентозаны, метилпентозаны, клетчатка. Известно, что клетчатка (12,0 – 15,0 г/кг) создает благоприятные условия для нормального продвижения пищи вдоль желудочно-кишечного тракта, нормализует деятельность полезной микрофлоры, способствует выведению из организма холестерина. Кроме того, зостера богата различные макро- и микроэлементы, в т. ч. железом, селеном, йодом [11–14].

У опытных животных, получавших в течение одного месяца ежесуточно с рационом индикаторное количество стронция-85 и альгинат натрия, выделенный из морской травы, накопление радионуклида (по сравнению с контрольной группой) снижалось (таблица 4) [15–17].

Таким образом, непроферментированный плотный остаток после гидролиза мяса мидий, морская трава и мидийные створки представляют интерес в качестве ингредиентов для приготовления кормовых добавок.

В таблице 5 приведены сравнительные данные по химическому составу мяса мидии-сырца (ноябрь мес.), мидии-сырца дробленой и створок мидий (воздушно сухих).

Предложены соотношения мидийной массы: створок: зостеры в белково-минеральной добавке (БМД-М) – 15:4:1, мидийной массы: створок в БМД-М-1 – 4:1. Технологическая схема производства представлена на рисунке 1.

Таблица 4 Кратность накопления стронция-85 в животных [17]

Альгинат натрия из ВБР	Кратность накопления стронция-85	% снижения от контроля
Контроль	9,74 ± 0,36	-
Ламинария японская	2,59 ± 0,30	73,4
Цистозира	2,96 ± 0,30	69,6
Зостера	2,67 ± 0,41	72,6

Таблица 5 Химический состав исходного сырья, используемого при приготовлении кормовых добавок ($M \pm m_x$; n = 5)

Название объекта исследования	Содержание в % сырого вещества				
	СВ	протеин	жир	зола	углеводы
Створка мидий	98,9 ± 0,2	2,0 ± 0,3	-	94,2 ± 0,01	-
Мидийная масса	22,4 ± 0,2	13,5 ± 0,5	2,6 ± 0,3	3,5 ± 0,01	2,8 ± 0,1
Зостера	83,7 ± 0,4	4,8 ± 0,2	-	17,8 ± 0,01	61,1 ± 0,3

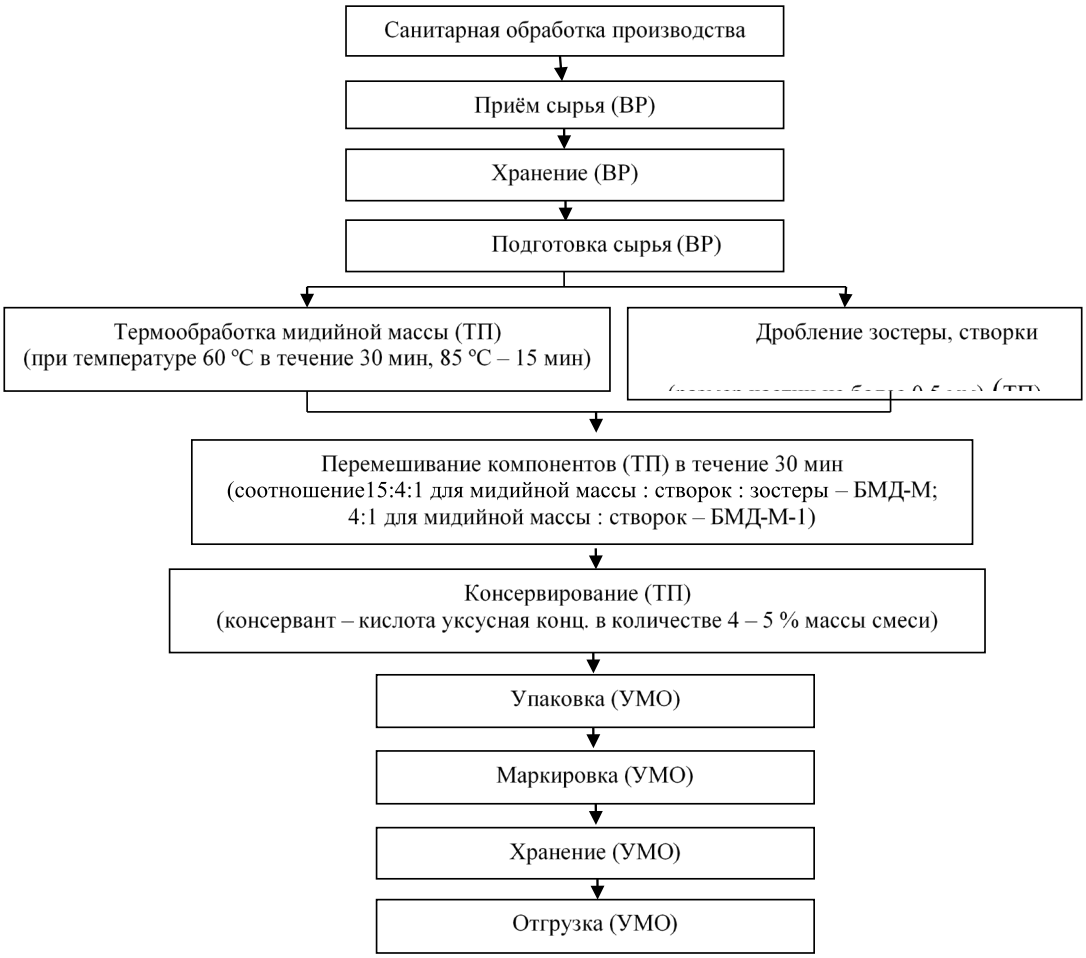


Рисунок 1 – Технологическая схема производства кормовых добавок (ВР – стадии вспомогательных работ; ТП – стадии основного технологического процесса; УМО – стадия упаковки, маркирования и отгрузки готовой продукции)

Протеин в кормовых добавках в среднем находился на уровне 105,0–110,0 г/кг (таблица 6). Из минеральных веществ преобладали макроэлементы, составляющие основу костной ткани животных: кальций (3,7–9,5 %) и фосфор (0,13–0,34 %). Липиды кормовых добавок содержат 19,0–19,5 % полиненасыщенных жирных кислот, в БМД-М преобладают арахидоновая, эйкозопентаеновая, докозопентаеновая жирные кислоты, в БМД-М-1 – линолевая и арахидоновая (таблица 7). Обменная энергия составляла 0,85 – 0,93 к. е.

Таблица 6 Химический состав кормовых добавок, ($M \pm m_x$; n = 5)

Наименование кормовых добавок	Массовая доля, г/кг				
	сырого протеина	жира	золы	в том числе	
				кальция	фосфора
БМД-М	105,0 ± 4,6	31,0 ± 2,7	250,0 ± 16,7	85,0 ± 3,6	1,2 ± 0,1
БМД-М-1	110,0 ± 3,5	44,0 ± 3,0	208,4 ± 3,3	93,0 ± 2,5	1,3 ± 0,1
Наименование кормовых добавок	Массовая доля, г/кг			ОЭ, к. е.	Активная кислотность (pH)
	углеводов	в т. ч. клетчатки			
БМД-М	45,0 ± 1,0	20,0 ± 1,3		0,87 ± 0,02	4,5
БМД-М-1	25,0 ± 1,0	-		0,95 ± 0,02	4,3

Таблиця 7 Жирнокислотный состав липидов кормовых добавок

Наименование кормовых добавок	Содержание ПНЖК, %					
	Всего	в том числе				
		С 18:2	С18:3	С 20:4	С 20:5 С 22:5	С 22:6
БМД-М	19,5	3,7	2,7	4,5	5,0	3,6
БМД-М-1	18,9	4,9	2,9	5,0	3,3	2,8
Наименование кормовых добавок	С 18:1	НЖК		Биологическая эффективность, ед./1 г жиру		
БМД-М	7,6	68,5		10,0		
БМД-М-1	12,5	64,2		12,0		

Кислотное число жира в кормовых добавках находилось на уровне 25,0 – 40,0 мг КОН, перекисное – 0,1 %I_2.

На основе органолептических (цвета, запаха, консистенции), химических и микробиологических показателей установлен срок хранения кормовых добавок при температуре окружающей среды – 4 мес.; лимитирующим показателем хранения явился рост кислотного числа.

Таким образом, предложенные белково-минеральные кормовые добавки содержат биологически активные вещества – аминокислоты, полиненасыщенные жирные кислоты, зостерин, минеральные вещества, что позволит сбалансировать рацион животных и снизить затраты комбикормов на единицу прироста живой массы.

Внедрение технологии белково-минеральных кормовых добавок позволит отнести основное производство мидийных концентратов к малоотходным.

ЛИТЕРАТУРА

1 Протеиновое питание сельскохозяйственных животных и пути решения проблемы протеина в животноводстве // Электр. дан. – Режим доступа URL: https://ptica-ru.ru/korm / 3092-proteinovoe-pitanie.html (дата обращения: 25.07.2019).

2 Пути развития кормовой базы и обеспечение животных полноценными кормами // Электр. дан. – Режим доступа URL: https://infopedia.su/7 x 8318.html (дата обращения: 25.07.2019).

3 Белково-минеральные добавки в рационах свиней / О.Е. Битютская, Л.П. Борисова, В.И. Скрепец и др. // Аграрна наука виробництву. – 2008. – № 2. – С. 15.

4 Борисова Л.П. Губанова А.Г., Битютская О.Е. Кормовая добавка из отходов переработки мидий // Рыбное хозяйство Украины. – 2001. – № 2. – С. 28–31.

5 Гидробионты и отходы из разделки как перспективное сырье для получения БАД к пище / М.В. Новикова // Морские прибрежные экосистемы: водоросли, беспозвоночные и продукты их переработки: материалы 1-ой Междунар. науч.-практ. конф., Москва-Голицыно, 26–28 авг. 2002 г. – М., 2002. – С. 161–164.

6 Новикова М.В. Разработка технологи получения биологически активных добавок из гидробионтов и отходов их разделки: автореф. дис… д-ра техн. наук. – М., 2003. – 49 с.

7 Щеглов Л.Н., Истомина Т.В., Виннов А.С. Белково-минеральные кормовые продукты на основе отходов переработки двустворчатых моллюсков Азово-Черноморского бассейна // Рыбное хозяйство Украины. – 2008. – № 6(59). – С. 64–68.

8 Murado M., Gonzalez M., Pastrana L. Mussel processing wastes as a fermentation substrate // Fisheries Processing: biotechnological applications. – 1994. – Ch. 13. – P. 311–343.

9 Битютская О.Е. Технология белково-углеводного концентрата из черноморских мидий: дис… канд. техн. наук. – Киев, 2011. – 195 с.

10 Технологические параметры получения белковых гидролизатов и характеристика их кормовой ценности / Ю.А. Бойко, А.Г. Мухленов, Т.К. Лебская, Ю.Н. Чайковская // Морские прибрежные экосистемы: водоросли, беспозвоночные и продукты их переработки: материалы 2-ой Междунар. науч.-практ. конф., Архангельск, 5–7 окт. 2005 г. – М., 2005. – С. 180–183.

11 Биологически активные полисахариды морских водорослей и морских цветковых растений / Ю.Н. Лоенко, Г.П. Лямкин, А.А. Артюков, Г.Б. Еляков // Раст. ресурсы. – 1991. – Т. 27. – № 3. – С. 150–160.

12 Зостерин: монография / Ю.Н. Лоенко, А.А. Артюков, Э.П. Козловская и др. / Владивосток: Дальнаука, 1997. – 212 с.

13 Артюков А.А. Разработка биотехнологических основ получения некоторых биологически активных веществ из океанического сырья: дис… д-ра биол. наук. – Владивосток, 2012. – 50 с.

14 Иммуномодулирующее действие пектина морских трав – зостерина / В.А. Мирошниченко, А.С. Шаронов, Т.Н. Суровенко и др. // Иммуномодуляторы природного происхождения (Владивосток, 9–10 окт. 1990 г.) : тез. докл. рабочего совещ. – Владивосток, 1990. – С. 36–37.

Корзун В.Н., Реус М.А. Использование черноморской зостеры как пищевой добавки лечебно-профилактического назначения // Громадське харчування і туристична індустрія у ринкових умовах: Сб. научн. работ. – 2001. – С. 126–130.

16 Корзун В.Н., Сагло В.И., Парац А.М. Питание в условиях широкомасштабной аварии и её последствий // Укр. мед. часопис. – 2002. – № 11–12. – С. 99–105.

17 Пищевые продукты из водорослей как способ минимизации действия радиации и эндемии / В.Н. Корзун, В.И. Сагло, А.М. Парац и др. // Проблемы питания. – 2004. – № 1(2). – С. 29–34.

УДК 636.033

УБОЙНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ БАРАНОВ РОМАНОВСКОЙ ПОРОДЫ ПРИ ВКЛЮЧЕНИИ В РАЦИОН СОРБЦИОННОЙ И ПРОБИОТИЧЕСКОЙ ДОБАВОК

С.Р. Зиянгирова, И.В. Миронова, Ю.Н. Чернышенко, А.А. Нигматьянов, Р.Р. Сайфуллин

Башкирский государственный аграрный университет, Уфа, Россия
Уфимский государственный нефтяной технический университет, Уфа
ФКУ НИИ ФСИН России, Москва

Одной из основных проблем биологии продуктивных животных является познание природы их высокой продуктивности путем раскрытия морфологических, биохимических и физиологических механизмов регулирующие их. Важным этапом исследований в этом направлении являются вопросы адекватного обеспечения организма животных всеми необходимыми веществами путем совершенствования систем питания [1, 2].

Актуальность и научно-практическое значение применения в кормлении баранчиков романовской породы сорбционных и пробиотических добавок связаны с возможностью усовершенствования существующих систем питания с целью более полной реализации их генетического потенциала.

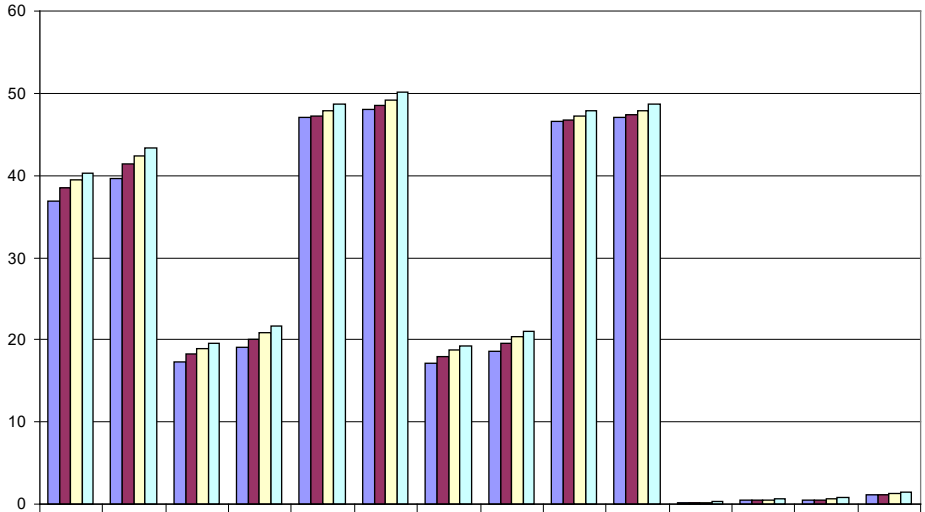
С этой целью на территории Республики Башкортостан в Ишимбайском районе в условиях ИП КФХ Турчин А.В. провели научно-хозяйственный опыт. Для этого сформировали 4 группы баранчиков романовской породы по 20 животных в каждой. В состав рациона молодняка I опытной группы вводили сорбционную минеральную добавку «Глауконит» в дозе 0,10 г./кг живой массы, II опытной группы – пробиотическую добавку «Биогумитель» в той же дозировке, III опытной группы – совместно добавки «Глауконит» и «Биогумитель».

Глауконит – это слоистый минерал, входящий в группу алюмосиликатов преимущественно неразбухающего глинистого типа. Биологический эффект минерала объясняется структурой кристаллической решетки. Он вызывает в пищеварительном тракте бактерицидный эффект в связи с выбросом свободных радикалов кислорода. Повышает активность ферментов желудочно-кишечного тракта, переваримость питательных веществ корма [3–5].

Пробиотический препарат «Биогумитель» содержит микробную массу живых спорообразующих бактерий штаммов *Bacillus subtilis 12B, Bacillus subtilis 11B и Bacillus subtilis lK*, сорбированных на частицах активированного угля с добавлением ростостимулятора природного происхождения Гумми-90. 1 г пробиотика «Биогумитель» содержит не менее 1×10^9 колониеобразующих единиц (КОЕ) бактерий каждого вида и 0,25 г. Гумми [6–8].

В связи с тем, что наиболее полную оценку мясной продуктивности и особенностей её формирования можно сделать лишь по количеству и качеству мясной продукции, получаемой после убоя животных, мы в возрасте 10 и 12 мес произвели убой трех животных из каждой группы.

При анализе данных по убою животных установлено повышение с возрастом основных показателей, характеризующих уровень мясной продуктивности (рис. 1).



	Предубойная масса, кг		Убойная масса, кг		Убойный выход, %		Масса туши, кг		Выход туши, %		Масса жира-сырца, кг		Выход жира, %	
	10	12	10	12	10	12	10	12	10	12	10	12	10	12
контрольная	36,91	39,60	17,35	19,05	47,00	48,10	17,16	18,61	46,50	47,00	0,18	0,44	0,50	1,10
опытная I	38,52	41,42	18,22	20,09	47,30	48,50	18,02	19,60	46,77	47,33	0,20	0,48	0,53	1,17
опытная II	39,54	42,45	18,94	20,89	47,90	49,20	18,70	20,34	47,30	47,91	0,24	0,55	0,60	1,30
опытная III	40,28	43,31	19,62	21,70	48,70	50,10	19,31	21,05	47,95	48,60	0,30	0,65	0,76	1,50

Рисунок 1 Мясная продуктивность баранчиков в возрасте 10 и 12 мес

Так, предубойная живая масса к 12-месячному возрасту увеличилась по сравнению с 10-месячным у баранчиков контрольной группы на 2,70 кг (7,31 %); I опытной группы – на 2,89 кг (7,51 %); II опытной группы – на 2,91 кг (7,37 %) и III опытной группы – на 3,03 кг (7,52 %).

Следует отметить, что баранчики опытных групп во все возрастные периоды лидировали над контрольными сверстниками. Так, в 10-месячном возрасте у молодняка I–III опытных групп предубойная живая масса была выше, чем в контроле на 1,62–3,37 кг (4,38–9,14 %; $P < 0,01–0,001$); в годовалом возрасте – на 1,81–3,71 кг (4,58–9,36 %; $P < 0,01–0,001$).

Наибольшей предубойной массой характеризовались баранчики, потребляющие совместно сорбционную и пробиотическую добавку. Они лидировали над сверстниками, потребляющими только сорбционную добавку в 10 мес на 1,76 кг (4,56 %); в 12 мес – на 1,89 кг (4,57 %) и сверстниками, потребляющими только пробиотическую добавку – на 0,74 кг (1,88 %) и 0,86 кг (2,03 %), соответственно.

Аналогичная закономерность установлена по массе и выходу парной туши. За весь период выращивания у животных контрольной группы величина первого изучаемого показателя увеличилась на 1,45 кг (8,47 %); второго – на 0,50 %; I опытной группы – на 1,59 кг (8,81 %) и 0,56 %); II опытной группы – на 1,64 кг (8,75 %) и 0,61 %; III опытной группы – на 1,74 кг (8,99 %) и 0,66 %.

Во все возрастные периоды лидерство баранчиков опытных групп сохранилось. Так, масса туши у животных I–III опытных групп в возрасте 10 мес была выше, чем у контрольных особей на 0,56–2,15 кг (4,99–12,54 %; P < 0,001), в 12 мес – на 0,99–2,44 кг (5,31–13,08 %; P < 0,001), а выход туши – на 0,27–1,45 % и 0,33–1,60 %, соответственно.

По убойной массе и убойному выходу установленная ранее тенденция сохранилась. Межгрупповая разница по величине первого показателя в 10-месячном возрасте составляла 0,88–2,27 кг (5,05–13,10 %; P < 0,001); второго – 0,30–1,70 %; в 12-месячном возрасте – 1,04–2,65 кг (5,45–13,90 %; P < 0,001) и 0,40–2,00 %. Во всех случаях лидировали особи III опытной группы. Они превосходили сверстников I опытной группы по убойной массе в 10 мес на 1,40 кг (7,66 %); в 12 мес – на 1,61 кг (8,01 %); II опытной группы – на 0,68 кг (3,59 %) и 0,81 кг (3,89 %), а по убойному выходу в 10 мес – на 1,40 % и 0,80 %, в 12 мес – на 1,60 % и 0,90 %, соответственно.

Увеличение изучаемых показателей к 12 месячному возрасту по сравнению с 10-месячным отмечается во всех группах. Так, у молодняка контрольной группы убойная масса за анализируемый промежуток времени стала выше на 1,70 кг (9,83 %); убойный выход – на 1,10 %; I опытной группы – на 1,87 кг (10,25 %) и 1,20 %; II опытной группы – на 1,95 кг (10,29 %) и 1,30 %; III опытной группы – на 2,08 кг (10,61 %) и 1,40 %, соответственно.

С возрастом увеличивалось содержание жира-сырца в организме молодняка. В 12 мес. масса внутреннего жира-сырца увеличилась у баранчиков контрольной группы на 0,25 кг; I опытной группы – на 0,28 кг; II опытной группы – на 0,31 кг и III опытной группы – на 0,34 кг по сравнению с 10 – месячным возрастом. По накоплению внутреннего жира-сырца в организме во все возрастные периоды отличались животные III опытной группы, минимальными показателями – молодняк контрольной группы, среднее положение занимали баранчики I и II опытных групп. По выходу внутреннего жира-сырца отмечена аналогичная закономерность.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о высоких убойных показателях баранчиков всех подопытных групп. При этом, во все возрастные периоды лидировали животные, потребляющие совместно добавки «Глауконит» и «Биогумитель».

ЛИТЕРАТУРА

Галиева З.А. Мясная продуктивность молодняка овец разных пород на Южном Урале // З.А. Галиева, С.Р. Зиянгирова, И.Р. Газеев, А.В. Турчин, Т.С. Кубатбеков // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2016. № 6. С. 174–176.

Галиева З.А., Зиянгирова С.Р., Кубатбеков Т.С. Шёрстная продуктивность овец разных генотипов // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2016. № 3 (59). С. 148–150.

Миронова, И.В. Эффективность использования глауконита в кормлении бычков бестужевской породы и его влияние на качество мяса / И.В. Миронова, С.Г. Канарейкина, А.А. Нигматьянов // Материалы региональной научно-практической конференции: Агроэкологические и социально-экономические проблемы и перспективы развития АПК Зауралья. Министерство образования и науки РФ, Зауральский филиал ФГОУ ВПО «Башкирский государственный аграрный университет». 2009. С. 101–105.

Латыпова, Г.Ф. Изучение и использование влияния цеолитов на физиологические состояние и продуктивность сельскохозяйственных животных / Г.Ф. Латыпова, А.Е. Андреева // В сборнике: Перспективы развития производства продовольственных ресурсов и рынка продуктов питания материалы международной научно-практической конференции (в рамках VIII международной специализированной выставки "ПродУрал-2002"). 2002. С. 182–184.

Миронова, И.В. Методические рекомендации по использованию пробиотических, энергетических, витаминных и минеральных добавок в кормлении сельскохозяйственных животных // И.В. Миронова, Х.Х. Тагиров, Г.М. Долженкова, Ф.Ф. Вагапов, Н.Г. Гатауллин, И.М. Зиналуллин, Р.С. Исхаков, Н.В. Гизатова, Е.Н. Черненков, О.В. Сенченко // Министерство сельского хозяйства Российской Федерации, Федеральное государственное образовательное учреждение высшего образования Башкирский государственный аграрный университет. – Уфа, 2016.

Косилов, В.И. Влияние пробиотической кормовой добавки Биогумитель 2Г на рост и развитие бычков симментальской породы / В.И. Косилов, Е.А. Никонова, Д.С. Вильвер, Н.М. Губайдуллин // АПК России. 2017. Т. 24. № 1. С. 197–205.

Косилов, В.И. Рост и развитие бычков симментальской породы при использовании пробиотической кормовой добавки Биогумитель 2 Г / В.И. Косилов, Ф.Ф. Вагапов, Д.Ц. Гармаев, Н.М. Губайдуллин, Т.С. Кубатбеков // Вестник Бурятской государственной сельскохозяйственной академии им. В.Р. Филиппова. 2017.№ 2 (47). С. 46–54.

Тагиров, Х.Х. Сыродельные свойства молока и состав сыра при скармливании коровам Биогумитель-Г, / Ф.Ф. Вагапов, Н.В. Гизатова // В сборнике: Мировые научно-технологические тенденции социально-экономического развития АПК и сельских территорий Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 75-летию окончания Сталинградской битвы. 2018. С. 27–32.

УДК 637.146

НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ПРОИЗВОДСТВУ НИЗКОЛАКТОЗНОГО МОРОЖЕНОГО

Е.И. Мельникова, Е.В. Богданова

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Сегодня российский рынок мороженого является довольно сформировавшимся. Однако он существенно уступает европейскому [1]. За рубежом производят безлактозные молочные продукты: питьевое молоко, йогурты и другие кисломолочные продукты. Также существуют технологии получения низколактозных замороженных десертов и мягкого мороженого с использованием ферментных препаратов β-галактозидазы, где предлагается проводить гидролиз лактозы до 50 %. В Российской Федерации низколактозные продукты выпускаются в ограниченном количестве, и их ассортимент не достаточен для удовлетворения потребностей населения, страдающего непереносимостью лактозы, в полном объеме [2–4].

Как ожидается, рынок мороженого в РФ в среднесрочной перспективе будет активно развиваться, объем потребления мороженого будет расти в среднем на 2,6–3 % и к 2025 году может составить около 453,3 тыс. т. Актуальные тенденции в этом сегменте связаны не только с ростом объемов продаж, но и с качественными изменениями ассортимента, появлением и развитием новых сегментов рынка. Новые тренды в расширении ассортимента – понижение массовой доли жира, обогащение пробиотиками, растительными ингредиентами, производство низколактозного мороженого [5–7].

В этой связи нами разработано рецептурно-компонентное решение низколактозного молочного мороженого, в котором часть обезжиренного молока заменена сухим пермеатом подсырной сыворотки (табл. 1). Пермеат подсырной сыворотки представляет собой быстрорастворимый легкосыпучий порошок, характеризующийся высокой гидрофильностью.

Таблица 1 – Подбор соотношения ингредиентов для низколактозного мороженого

Наименование компонента	Содержание для рецептуры, кг		
	№ 1	№ 2	№ 3
Молоко обезжиренное	824,0	741,6	659,2
Деминерализованный пермеат подсырной сыворотки	25,0	107,4	189,8
Сахар-песок	150,0	150,0	150,0
Агароид	1,0	1,0	1,0

Пермеат как сырье уже нашел довольно широкое применение в пищевой промышленности. Так, молочные пермеаты могут быть использованы для нормализации белковой составляющей молока при производстве питьевых продуктов и сухих смесей. Различные пермеаты применяют в технологии хлебобулочных изделий, мороженого, молочных консервов, как подсластитель кондитерских продуктов и напитков, в супах и соусах для придания текстуры, в колбасных изделиях в качестве заменителя солей-фиксаторов окраски. Производители получают непосредственную выгоду от использования пермеата в технологическом процессе, в частности, за счет возможности производить различные продукты на одной производственной линии.

Недостатком применения пермеата подсырной сыворотки в составе рецептуры мороженого является повышение массовой доли лактозы в готовом продукте. Поэтому нами предложено проводить гидролиз лактозы в нормализованной смеси с применением ферментного препарата β-галактозидазы с торговым названием «Nola Fit».

Изучен процесс гидролиза лактозы в нормализованных смесях, который проводился при 47 ºС в течение 5 часов, массовая доля фермента достигала 1 % от содержания лактозы в смеси (рисунок). Максимальная степень гидролиза лактозы составила 76 % для рецептуры № 2. Полученная смесь направлена на производство молочного мороженого. Изучен химический состав и свойства готового продукта (табл. 2).

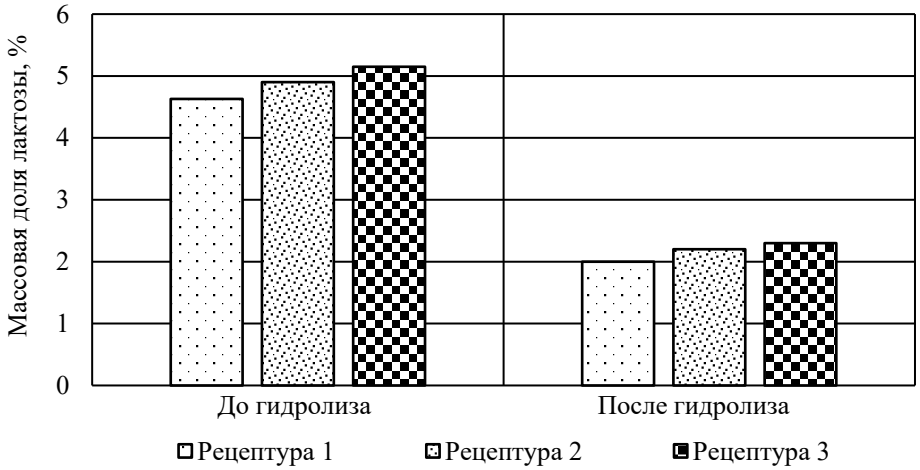


Рисунок – Массовая доля лактозы в опытных образцах

Таблица 2 – Химический состав и свойства низколактозного молочного мороженого

Наименование показателя	Содержание в образце № 2
Массовая доля сухих веществ, %	28,00
Массовая доля белка, %	2,03
Массовая доля жира, %	0,50
Массовая доля лактозы, %	2,20
Кислотность, ºТ	26
Степень взбитости, %	86,0

Технология производства низколактозного молочного мороженого предусматривает применение традиционных технологических операций и серийно выпускаемого оборудования, поэтому не усложняет процесс производства. Реализация данной технологической схемы позволит обеспечить рациональную переработку молочного сырья и расширить ассортимент продуктов функциональной направленности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Яшин, Г.А. Рынок мороженого в России [Текст] / Г.А. Яшин // Молочная промышленность, 2019. – № 5. – С. 30–32.

2. Голубева, Л.В. Новые технологии в производстве молока и молочных продуктов: монография [Текст] / Л.В. Голубева, А.Н. Пономарев, О.И. Долматова. – Воронеж, 2012. – 112 с.

3. Пономарева, Н.В. Биоконверсия молочных белков для снижения остаточной антигенности [Текст] / Н.В. Пономарева, Е.И. Мельникова, Е.В. Богданова // Биотехнология, 2015. – Т. 31. – № 1. – С. 70–74.

4. Golubeva, L.V. Research of dry mix quality indices based on vegetable components for soft ice cream production [Text] / L.V. Golubeva, E.A. Pozhidaeva, E.S. Popov // Indian Journal of Science and Technology, 2016. – Vol. 9. – No 42. – P. 104224.

5. Мельникова, Е.И. Исследование реологических характеристик смесей для низкокалорийного плодово-ягодного мороженого [Текст] / Е.И. Мельникова, А.А. Смирных, Е.В. Богданова // Хранение и переработка сельхозсырья, 2011. – № 1. – С. 56–57.

6. Пожидаева, Е.А. Теоретическое и экспериментальное обоснование процессов производства обогащенного мягкого мороженого: монография [Текст] / Е.А. Пожидаева, Л.В. Голубева, А.Н. Остриков. – Воронеж, 2015. – 208 с.

7. Функционально-технологические свойства низкокалорийного плодово-ягодного мороженого [Текст] / Е.И. Мельникова, С.А. Титов, Е.В. Богданова, О.А. Мурадова // Хранение и переработка сельхозсырья. 2012. – № 8. – С. 33–35.

УДК 664.5

ОЛИГОСАХАРИДЫ ИЗ ПЛОДОВ АБРИКОСА, ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОМ ВЭЖХ

М.Х. Рахмонов, А.С. Джомуродов, Икроми Х., З.К. Мухидинов

Институт химии им В.И. Никитина АН Республики Таджикистан

Абрикосы – это красивые фрукты оранжевого цвета, богатые бета-каротином и клетчаткой, которые являются одним из первых признаков лета. Хотя сушёные и консервированные абрикосы доступны круглый год, свежие абрикосы с обильным запасом витамина С растут в Таджикистане с мая по август месяцы. Помимо высокого содержания полезных сахаров абрикосы богаты многими растительными антиоксидантами. Другие полезные вещества этого фрукта являются пектины и олигосахариды, которые полезные для здоровья. Фрукты абрикоса считают отличной пищей, которая обеспечивает защитное действие антиоксидантов, добавляя при этом очень мало каллорий к ежедневному питанию.

Олигосахариды (ОС) в своём составе содержат остатки моносахаров (глюкозы, галактозы, фруктозы, ксилозы) и различаются длиной цепи, композицией моносахаров и степенью ветвления. Особую группу составляют «неусваиваемые» олигосахариды, которые не расщепляются в желудочном тракте (ЖКТ) человека, ввиду отсутствия ферментов, гидролизующих β-гликозидные связи, связывающие остатки моносахаров. Функциональные олигосахариды распространены в природе, например, мёде, фруктах, овощах и злаковых. Эти олигосахариды обладают физиологической активностью, низкой калорийностью, способностью стимулировать рост популяции микрофлоры кишечника, укреплять иммунную систему, снижать риск возникновения инфекций и рака кишечника, и т. д. Низкая степень сладости, водорастворимость, термостабильность, устойчивость в кислой среде, способность регулировать реакцию меланоидинообразования и сохранять влажность продукта, позволяют использовать олигосахариды в качестве функциональных пищевых ингредиентов, повышающих как биологическую активность, так и вкусовые показатели продуктов питания [1].

В данной работе ОС были получены последовательной обработкой выжимок абрикоса местного сорта «Махтоби» в процессе гидролиз-экстракции пектина. Раствор, полученный после обработки выжимок, и отделённый от остатков клетчатки (КС), разделяли на три фракции, различающиеся по структуре, молекулярной массе и физико-химическим параметрам и условно названные микрогель (МГ), пектиновые вещества в (ПВ) и олигосахариды (ОС). Образцы ОС были извлечены из соответствующих экстрактов по упрощённой схеме (далее Схема). Моносахаридный состав ОС был анализирован с помощью ВЭЖХ с использованием детектора рефрактометрического индекса (РИ).

Жидкостная хроматография (ЖХ) наиболее широко используется для разделения сахаров. Однако используемые традиционные колонки с обращённой фазой не могут быть использованы для исходных (непроизводных) сахаров [2], так как стационарная фаза не обеспечивает требуемого времени удержания, поэтому необходимы специальные колонки. Поскольку сахара в своей структуре не содержат хромофоры их обнаружение ставится затруднённым в ВЭЖХ приборах, имеющих УФ-видимую область света и других общедоступных детекторах. Для обнаружения сахаров используют такие датчики, как рассеяние света при испарении (СРИ-ELSD) [3], показатель преломления-рефрактометрический индекс (РИ) [4], масс-спектрометрия (МС) [5]. Причём, каждый детектор имеет свои ограничения.

Авторы [6, 7], использовали ВЭЖХ метод для разделения сахаров с использованием РИ детектора. Пределы обнаружения находились в одинаковых значениях, как и для предыдущих методов анализа, хотя для разделения использовались разные колонки. Одним из недостатков определения этого метода является чувствительность детектора к температуре, небольшие колебания температуры приводят к большим колебаниям. Обнаружение сахаров с РИ-детектором нельзя использовать в сочетании с градиентами несущей фазы, что ограничивает разработку метода.

Лопес и Гаспар [8], описали метод ВЭЖХ-RI с использованием хиральной колонки. Способ позволяет идентифицировать углеводы и определять абсолютную конфигурацию (d или l), а также одновременно определять конфигурацию аномерного центра (α или β) моносахарида. Они также изучили влияние температуры колонки на профиль разделения сахаров.

Для анализа моносахаридного состава ОС использовали ВЭЖХ метод с использованием детектора РИ на приборе Waters Breez (Wares, USA). Для разделения моносахаридов ОС образца, полученного из плодов абрикоса использовали колонку Varian MetaCarb 67C, с размерами 0,65 х 30 см, заполненный катионообменной смолой Varian в ионной форме Ca^{2+}. Удержание сахаров с использованием этого метода (так называемый катионный или лигандный обмен), в первую очередь, основано на образовании комплексов между гидроксильными группами сахаров и противоионами металлов. Следовательно, удерживание варьируется в зависимости от стабильности комплексов.

Данная колонка MetaCarb 67C специально разработана фирмой Varian (США) для разделения полисахаридов, моносахаридов и сахарных спиртов по одному хроматографическому профилю. В качестве подвижной фазы требуется только дистиллированная деионизированная вода. Рекомендуемая скорость потока для этой колонки составляет 0,5 мл/мин с использованием встроенного фильтра и защитной колонны. Концентрация образцов варьировалась в диапазоне 10–100 мг/л, объем инъекции составлял 20 мкл. Растворы фильтровали через мембрану 0,45 мкм и дегазировали перед использованием. Концентрацию сахаров определяли с помощью РИ детектора Waters 2414 с с чувствительностью 512 и температуры колонки 90 °С.

Для количественного анализа моно- и дисахаридов использовали ряд стандартных сахаров для построения калибровочной кривой. Сахара элюировали изократически с помощью деионизированной воды со скоростью потока 0,5 мл/мин. Концентрацию каждого углевода определяли после интеграции соответствующих пиков и их сравнения со стандартными кривыми, полученными для сахарозы, D-глюкозы, D-галактозы, L-арабинозы, L-рамнозы и сорбита (Sigma). Хроматограммы сахарных смесей представлены на рис. 1.

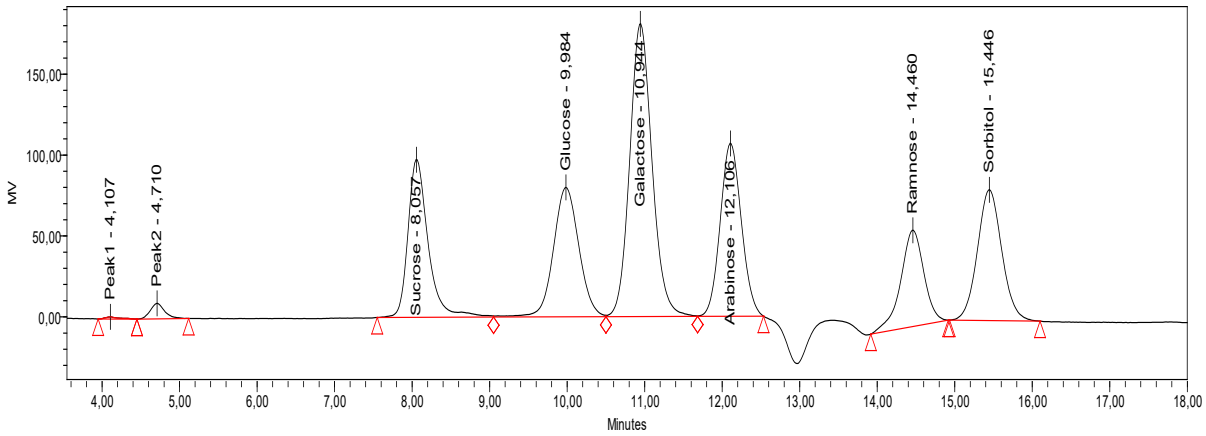


Рис. 1. Хроматограммы сахарных смесей: сахарозы, D-глюкозы, D-галактозы, L-арабинозы, L-рамнозы и сорбита (Sigma). Колонка Varian MetaCarb 67C, температура колонки 90° С, подвижная фаза – деионизированная дистиллированная вода, скорость потока 0,5 мл/мин, объем вводимого образца 20 мкл, чувствительность РИ 64. Концентрация образца 1000 мг / л

Для калибровки прибора использовали стандартные смеси сахаров с концентрацией 20,0, 40,0, 50,0, 60,0, 80,0, 100,0 мг/л. В качестве внутреннего стандарта использовали D-сорбитол с концентрацией 55,2 мг/л. Калибровочная кривая с использованием программного обеспечения Waters Breeze была создана для дальнейшего расчёта количества сахара в различных исследуемых образцов. Полученная зависимость показателя преломления от концентрации сахара очень хорошо согласуется с линией тренда уравнений регрессии с коэффициентом корреляции $R^2 = 0,99$ для всех сахаров, кроме арабинозы ($R^2 = 0,92$). Время удерживания, площадь, параметры пиков, количество сахаров в стандартной смеси, процент их восстановления в соответствии с РИ-детектором, даётся в таблице 1.

В табл. 2. представлен состав сахаров раствора пермеата пектинового гидролизата, полученного с помощью мембраны PS 100, обозначенной как FIB2 (Схема). Среди элюированных моно- и дисахаридов были обнаружены глюкоза, арабиноза, мальтоза (пик 2) и сахароза с весовым процентом 37,77 %, 24,67 %, 19,82 % и 15,25 % соответственно.

Моносахаридный состав ОС, определённый таким образом, для фракции F1B2B (Схема), которая представляет собой концентрированный (150 мл) раствор пермеата, полученного из предыдущего фильтрата на другой мембране PES 5, представлены в таблице 3. Видно, что моносахаридный состав данной фракции практически идентичны с вышеуказанной фракцией, и состоит из глюкозы (40,90 %), арабинозы (28, 69 %), мальтозы (21,12 %) и сахарозы (10,56 %) и следов галактозы.

Таблица 1. Время удерживания, площадь, параметры пиков, количество сахаров в исходной смеси, процент их восстановления в соответствии с РИ-детектором

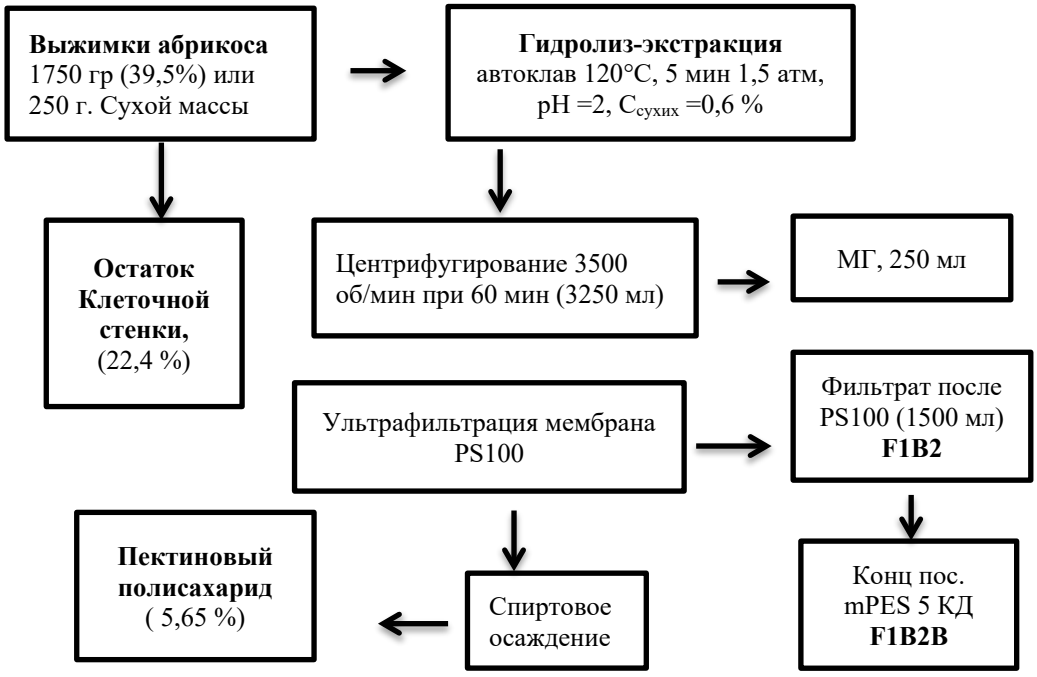
Назначение пика	Время удерживания, мин	Площадь Пика, мкм^2	Найденное количество, мг/л	Концентрация сахара в ст. растворе ст, мг/л	Выход, %
Peak1	4,107	16732			
Maltose	4,710	123071	56.54	55.5	98.1
Sucrose	8,057	1763764	64.45	64.3	99.4
Glucose	9,984	1823640	53.12	53.4	99.5
Galactose	10,944	3621038	54.31	55.2	98.4
Arabinose	12,106	2022201	62.62	64.2	97.5
Rhamnose	14,460	1237949	69.08	67.8	98.1
Sorbitol	15,446	1766661	52.16	55.2	94.5

Таблица 2. Время удерживания, площадь и параметры пиков, количество обнаруженных сахаров в мг/л и в процентах для фракции F1B2 (раствор пермеата от гидролизата пектина, полученный с помощью мембраны PS 100 KDA MWCO)

Назначение пика	Время удерживания, мин	Площадь Пика, мкм^2	Найденное количество, мг/л	Концентрация сахара в ст. растворе, мг/л
Peak1	4.075	14712	-	-
Maltose	4.744	381485	17.67	19.82
Sucrose	8.028	177854	13.60	15.25
Glucose	9.967	118503	33.69	37.77
Galactose	10.920	-	-	-
Arabinose	11.662	789067	22.00	24.67
Ramnose	14.150	-	-	-
Sorbitol	15.383	260832	2.20	2.47

Таблица 3. Время удерживания, площадь и параметр пиков, количество обнаруженных сахаров в мг/л и в процентах для фракции F1B2B (концентрат пермеата от гидролизата пектина, полученный с помощью мембраны PES 5)

Назначение пика	Время удерживания, мин	Площадь Пика, мкм^2	Найденное количество, мг/л	Концентрация сахара в ст. растворе, мг/л
Peak1	4,076	-	-	-
Maltose	4,785	367421	17.67	21.12
Sucrose	8,045	196306	5.49	10.56
Glucose	9,975	1185037	34.21	40.90
Galactose	10,703	-	-	-
Arabinose	11,671	786453	24	28.69
Peak7	13,333	-	-	-
Ramnose	14,167	-	-	-
Sorbitol	15,431	126491	2.28	2.73



Упрощённая схема выделения ОС из процесса получения пектина

Таким образом, используя калибровку, сохранённые в программе Breeze, был определен состав ОС и других образцов. Данный подход может быть применён для анализа сахаров из многих биологических объектов.

ЛИТЕРАТУРА

https://www.verywellfit.com/oligosaccharides-and-prebiotics-health-benefits-2242223

Glyad V.M., Determination of Monosaccharides, Disaccharides and Oligosaccharides in the Same Plant Sample by High-Performance Liquid Chromatography, Russian Journal of Plant Technology, 49–2, (2002), p. 277–282.

Karlsson G., Winge S. and Sandberg H., Separation of monosaccharides by hydrophilic interaction chromatography with evaporative light scattering detection, Journal of Chromatography A 1092, (2005), p. 246–249.

Hammad L.A., Saleh M.M., Novotny M.V. and Mechref Y. Multiple-Reaction Monitoring Liquid Chromatography Mass Spectrometry for Monosaccharides Compositional Analysis of Glycoproteins, J. Am. Soc. Mass Spectrom., 20, (2009), p. 1224–1234.

Barreira J.C.M., Pereira J.A., Beatriz M., Oliveira P.P. and Ferreira I.C.F.R. Sugars Profiles of Different Chestnut (Castanea sativa Mill.) and Almond (Prunus dulcis) Cultivars by HPLC-RI. Plants Foods Hum Nutr., 65, (2010), p. 38–43.

Castellari M., Versari A., Spinabelli U., Galassi S. and Amati A. An improved HPLC method for the analysis of organic acids, carbohydrates and alcohols in grape musts and wines, J. Liq. Chrom. & Rel. Technol. 23, (2000), p. 2047–2056.

Lopes J.F. and Gaspar E.M.S.M. Simultaneous chromatographic separation of enantiomers, anomers and structural isomers of some biologically relevant monosaccharides, Journal of Chromatography A, 1188 (2008) 34–43.

УДК 663,11:631.527

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДИПЛОИДИЗИРОВАННЫХ ГАПЛОИДНЫХ ЛИНИЙ В СЕЛЕКЦИИ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ В УСЛОВИЯХ ЦЕНТРАЛЬНОГО НЕЧЕРНОЗЕМЬЯ

А.О. Казаченко, Н.В. Давыдова, А.В. Грачева, Е.С. Романова, А.В. Широколава

ФИЦ «Немчиновка», Московская область, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Современный уровень сельскохозяйственного производства предъявляет особенно высокие требования к сортам зерновых культур. Необходимо ускорение создания новых сортов, обладающих наряду со стабильно высокой урожайностью и хорошим качеством зерна, устойчивостью к биотическим и абиотическим стрессорам.

МАТЕРИАЛЫ

Диплоидизированные гаплоидные линии полученные в ФИЦ «Немчиновка»

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С использованием метода биотехнологии в селекции яровой пшеницы стало создание 44 новых диплоидизированных полигаплоидных линий.

Лучшие гибриды, созданные с использованием выделившихся по комплексу лимитирующих признаков сортов, были вовлечены в биотехнологический процесс. На их базе были созданы диплоидизированные гаплоидные линии.

Так, большинство выделившихся по продуктивности ДГ-линий было создано на базе гибрида (Виза х Амир). В результате сравнительной оценки были отобраны 10 лучших линий. Полученные линии вовлечены в селекционный процесс. Лучшие из них были переданы для оценки в питомник конкурсного сортоиспытания.

Средняя урожайность ДГ-линий в конкурсном сортоиспытании за 5 лет составила 4,35 т/га, у стандартного сорта – 4,06 т/га. На основании проведенной оценки по комплексу лимитирующих признаков в условиях Центрального Нечерноземья выделена ДГ-линия S-21 [(Саратовская 68 х Виза) F_1 х (Тулайковская 10 х Тасос) F_1]F_1 с хорошими хлебопекарными качествами, а также ДГ-линии: Н00706/1 и Н00706/4, созданные на базе гибридной комбинации (Виза х Лада), уровень урожайности которых составил – 5,26 т/га и 5,27 т/га, масса зерна с колоса – 1,36 г. и 1,54 г., содержание белка в зерне – 16,45 % и 16,51 %, клейковины в муке – 37,2 % и 37,4 %; обладающие качеством клейковины ИДК – 75 ед. шк. и 77 ед. шк., уровнем седиментации – 11,0 мл и 10,4 мл. Сестринские ДГ-линии Н00706/1 и Н00706/4, полученные на базе сортов Виза и Лада, обладают эректоидной формой расположения листовой пластинки, что является косвенным признаком засухоустойчивости у яровой мягкой пшеницы.

Практическим результатом проведенной биотехнолого-селекционной работы, является создание на базе гибридной комбинации – **Линия 271 (Виза х Амир)** нового конкурентоспособного сорта яровой мягкой пшеницы Лиза (таблица 1).

Таблица 1 Характеристика нового сорта яровой мягкой пшеницы Лиза за 5 лет

Показатели	*Lim (max – min)*
Урожайность в конкурсном сортоиспытании, т/га	8,73–4,27
Прибавка к среднему стандарту, т/га	2,1–0,40
Устойчивость к полеганию, балл	9
Высота, см	75–53
Поражение пыльной головней (искусственный фон), %	1,2–0
Поражение твердой головней (искусственный фон), %	12,2–7,5
Поражение бурой ржавчиной, %	40–20
Содержание клейковины в муке, %	36,4–30,9
ИДК, ед. шк.	82–56
Сила муки, ед. а.	370–298
Объемный выход хлеба, $см^3$	1190–970
Масса 1000 зерен, г	44,2–36,2

Приём материалов статей по адресу: actbio@mail.ru

Линия 271 (сорт ЛИЗА) создан в ГНУ Московский НИИСХ «Немчиновка» методом гаплоидии из гибридной популяции (Виза х Амир). Разновидность лютесценс. Сорт среднеспелый, с потенциалом продуктивности до 8,0–8,5 т/га, имеет укороченную соломину (max. 80 см). Устойчив к полеганию. Значительно слабее стандартного сорта поражается твердой и пыльной головней как в естественных условиях, так и при искусственном заражении. Сравнительно устойчив к мучнистой росе и септориозу колоса. Устойчив к осыпанию. Обладает стабильно высоким качеством зерна. Объемный выход хлеба 970–1190 см 3, сила муки 298–370 е.а., содержание клейковины в муке 30–35 %. Зерно выровненное, с высоким выходом кондиционных семян. Рекомендуется для возделывания в **2,3** и **7** регионах.

На сорт получен патент **№ 7396 от 05.06.2014 г**.

ВЫВОДЫ

Практическим результатом проведенной биотехнолого-селекционной работы, основанной на моделировании гибридных генотипов *T. aestivum* с применением эколого-географического принципа подбора родительских пар (сортов), выделенных по комплексу лимитирующих признаков для условий Центра Нечерноземной зоны РФ, и применения оптимизированного метода гаплопродюсера *Z. mays*, является создание на базе гибридной комбинации – **Линия 271 (Виза х Амир)** нового конкурентоспособного сорта яровой мягкой пшеницы **Лиза**. В качестве основного методического приема повышения эффективности гаплопродукционных процессов у гибридных генотипов при их создании целесообразно применять эколого-географический принцип подбора родительских пар. При создании диплоидизированных гаплоидных линий *T. aestivum* следует использовать сорта Амир, Виза и Тасос, оказывающие значительное увеличение у гибридов степени отзывчивости к андроклинии и гаплопродюсированию в системах *in vitro* и обладающие высокой рекомбинационной способностью.

УДК 637.482

БИОФОРТИФИКАЦИЯ КУРИНЫХ ЯИЦ – БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ПОЛУЧЕНИЮ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПИЩЕВЫХ ИНГРЕДИЕНТОВ ПОВЫШЕННОЙ ПИЩЕВОЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЦЕННОСТИ.

А.Ш. Кавтарашвили, В.М. Коденцова, В.К. Мазо

Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» РАН, г. Сергиев Посад-11, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Ограниченный выбор отечественных специализированных пищевых продуктов (СПП) высокой биологической и пищевой ценности, эффективность которых для профилактики алиментарно-зависимых заболеваний была бы надежно подтверждена с позиций доказательной медицины, определяет необходимость разработки современных биотехнологических подходов, направленных на глубокую переработку сельскохозяйственного сырья. Одной из таких технологий является биофортификация (biofortification) – обогащение продукции животноводства, в первую очередь куриных яиц, путем добавления витаминов и минеральных веществ в корма кур-несушек.

Биотрансформация добавленных в корма синтетических витаминов в их естественные формы в организме кур является несомненным преимуществом, поскольку полностью лишает аргументов противников обогащения пищевой продукции синтетическими витаминами [1, 2]. Естественным способом повышения содержания витамина D в яйце является облучение кур ультрафиолетовым светом или их свободный выгул при естественном солнечном свете (bio-addition), что обеспечивает превращение эндогенного эргостерола или 7-дегидрохолестерина в витамин D_2. Аналогичным образом добавлением в корма микроэлементов (селен, цинк, йод) достигают их максимального содержания в курином яйце, причем в форме органических соединений, что улучшает их биодоступность для человека при одновременной безопасности [3, 4]. Введение в корма кур полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) семейства ω-3 обеспечивает повышение их концентрации в яйце [5]. Одновременное включение в рацион птиц перечисленных микронутриентов позволяет получить яйцепродукты, обогащенные несколькими эссенциальными микронутриентами, и одновременно предотвратить нежелательное повышение перекисного окисления липидов, вызванное добавлением полиненасыщенных жирных кислот.

Целью нашего исследования явилась разработка биотехнологического подхода к кормлению птицы, обеспечивающего обогащение яиц эссенциальными микронутриентами: селеном в органической безопасной форме, витамином Е, ω-3 – полиненасыщенными жирными кислотами и каротиноидами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Были разработаны различные рационы для кур-несушек с использованием комбикормов для производства пищевых яиц с повышенным содержанием селена, витамина Е и ω-3 ПНЖК [6]. Источником селена в рационах являлись препараты «Сел-Плекс», «Дафс-25» или селенит натрия. В качестве источников ω-3 ПНЖК были использованы 3 % льняное масло и 5 % жмых семени льна. Наряду с синтетическим витамином Е (DL-альфа-токоферол) применяли смесь натуральных токоферолов (препарат «Жирные кислоты»). Было установлено существенное снижение стоимости используемых комбикормов при частичной замене источника селена «Сел-Плекс» на «Дафс-25» и «Селенит натрия», а также синтетического витамина Е на препарат «Жирные кислоты». Результаты исследования показали, что за 60-суточный период содержания отхода птицы не было, сохранность поголовья во всех группах составила 100 %. Живая масса в 140-суточном возрасте, т. е. в начале исследования в группах кур-несушек практически была идентичной и составила (1372–1396 г.). Данные по яйценоскости кур, средней массы яиц, выходу яичной массы на несушку и конверсии корма подтвердили эффективность использованного биофортификационного подхода. В среднем за период исследования обогащенных комбикормов, содержание в яйце (в расчете на 100 г. съедобной части) ω-3 ПНЖК составило 655–960 мг, при соотношении ω-6 к ω-3 – (2,3 – 2,9) : 1; селена – 59,3–61,5 мкг и витамина Е – 6,16–8,82 мг.

Дальнейшим развитием этого направления должно явиться повышение пищевой и биологической ценности куриных яиц путем обогащения их каротиноидами: тетратерпеновыми пигментами, обладающими провитаминными и антиоксидантными свойствами и синтезируемыми рядом микроорганизмов и растений, а также некоторыми водорослями и грибками.

Усвоение и содержание каротиноидов в тканях и органах птицы, в том числе в желтках яиц зависит от ряда факторов: генотипа птицы и используемых источников каротиноидов, содержания в кормах липидов, уровня в рационе кальция (с увеличением содержания кальция в корме снижается пигментный эффект каротиноидов, поэтому содержание кальция должно соответствовать реальным потребностям в нем), витаминов (в частности витаминов А и Е), антибиотиков и лекарственных средств, токсичности кормов, различных кишечных инфекций и паразитов. Абсорбция и депонирование ксантофиллов в желтке усиливается липидами корма (так как каротиноиды растворимы в липидах и их абсорбция в кишечнике происходит параллельно со всасыванием липидов). Но, с другой стороны, окисление липидов корма приводит к высокому содержанию пероксидов, которые могут ослаблять окраску желтка из-за окисления ими каротиноидов как в корме, так и в организме кур. Это можно исключить включением в диету кур-несушек антиоксидантов и витамина Е, который в организме животных выступает в роли антиоксиданта и обладает выраженными защитными свойствами против окислительной деструкции каротиноидных пигментов. Витамин Е также способствует абсорбции каротиноидов и их накоплению в желтке яиц. Неизвестны факторы, угнетающие накопление каротиноидов в организме птицы, содержащиеся в мясных отходах, рыбной муке, тритикале, отрубях, сое, ячмене и рисе. Однако, главным фактором, влияющим на степень отложения каротиноидов в организме кур и яйцах, несомненно является их концентрация в кормах. В настоящее время нами реализуется биотехнологический подход, включающий комплексное одновременное обогащение куриных яиц каротиноидами, селеном, витамином Е и ω-3 – ПНЖК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования показали, что одновременное включение в рацион кур-несушек ω-3 полиненасыщенных жирных кислот, селена и витамина Е в испытанных дозировках значительно повышало содержание их в пищевых яйцах без негативного влияния на жизнеспособность

и продуктивность птицы, а также затрат корма. Определение рационального уровня ввода в комбикорм кур-несушек различных источников каротиноидов является следующим этапом биофортификационного подхода, направленного на повышение пищевой и биологической ценности куриного яйца.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда Грант 16–16–04047

ЛИТЕРАТУРА

1. Коденцова В.М., Рисник Д.В., Стефанова И.Л. Биофортификация куриного яйца микронутриентами. Птица и птицепродукты. 2019. (1) 27–29. doi: 10.30975/2073–4999–2019–21–1–27–29.

2. Кавтарашвили А.Ш., Мазо В.К., Коденцова В.М., Рисник Д.В., Стефанова И.Л. Биофортификация куриного яйца. Витамины и каротиноиды. Сельскохозяйственная биология, 2017, т. 52, 6 1094–1104. doi: 10.15389/agrobiology.2017.6.1094rus

3. Кавтарашвили А.Ш., Новоторов Е.Н., Стефанова И.Л., Свиткин В.С. Эффективный путь производства функциональных яиц. Птицеводство, 2017, № 2: 6–10.

4. Кавтарашвили А.Ш., Стефанова И.Л., Свиткин В.С., Новоторов Е.Н. Производство функциональных яиц. Сообщение II. Роль селена, цинка и йода. Сельскохозяйственная биология, 2017, 52(4) : 700–715. doi: 10.15389/agrobiology.2017.4.700rus.

5. Кавтарашвили А.Ш., Стефанова И.Л., Свиткин В.С., Новоторов Е.Н. Производство функциональных яиц. Сообщение I. Роль ω-3 полиненасыщенных жирных кислот (обзор). Сельскохозяйственная биология, 2017, № 2: 349–366. doi: 10.15389/agrobiology.2017.2.349rus.

6. Мазо В.К, Кавтарашвили А.Ш., Стефанова И.Л., Коденцова В.М., Багрянцева О.В., Свиткин В.С., Новоторов Е.Н., Рисник Д.В., Мокшанцева И.В., Сидорова Ю.С., Зорин С.Н., Клименкова А.Ю. Функциональныке яйцепродукты / Под ред. В.К. Мазо. – М.: Де'Либри, 2018. – 270 с. ISBN 978–5–4491–0175–4

УДК 637.146

БИОТЕХНОЛОГИЯ СУБЛИМИРОВАННЫХ БИОПРОДУКТОВ С МЕТАБИОТИКАМИ ДЛЯ СПОРТИВНОГО ПИТАНИЯ

С.И. Артюхова

Омский государственный технический университет, Омск, Россия

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время здоровый образ жизни является неотъемлемой частью современного человека, когда активные занятия спортом постепенно становятся нормой, а высокие физические нагрузки требуют правильного рациона и грамотного подбора различных пищевых добавок. На фоне стабильного роста популярности спортивного образа жизни отмечают стабильный рост популярности спортивных продуктов. Потребление различных добавок не просто не вредит здоровью человека, а наоборот, оказывает на него позитивное влияние. Восполнение естественного баланса полезных веществ при помощи спортивных продуктов помогает нормально функционировать всем процессам в человеческом теле, а это более чем позитивный эффект.

Спортивное питание – это особая группа пищевых продуктов, выпускающаяся преимущественно для людей, ведущих активный образ жизни, занимающихся спортом и фитнесом. Приём такого питания направлен, в первую очередь на улучшение спортивных результатов, повышение силы и выносливости, укрепление здоровья, нормализацию обмена веществ, увеличение объёма мышц, достижение оптимальной массы тела и в целом на увеличение качества и продолжительности жизни [1, 2].

В соответствии с рекомендациями Научного комитета по питанию Европейской комиссии (Scientific Committee on Food of European Commission), все продукты для спортивного питания условно разделены на 4 категории: A – богатые углеводами энергетические пищевые продукты; B – углеводно-электролитные растворы; C – белки и белковые компоненты; D – эссенциальные нутриенты и прочие компоненты пищи [3, 4].

Для решения конкретных задач используются разные виды добавок, например, для восполнения недостатка углеводов в организме принимаются продукты из категории А – это специальные пищевые продукты, которые богаты такими углеводами, как мальтодекстрин, сахароза, фруктоза, крахмал, левулоза и др. В эту категорию входят гейнеры, которые выпускаются в пластиковых банках и пакетах в виде порошка. Перед употреблением эта смесь взбивается с водой, молоком либо соком в шейкере. Основная масса представленных гейнеров на Российском рынке зарубежного производства – США, Германии и Голландии.

Источниками протеина (категория С) являются порошковые смеси, выпускаемые в трех формах: концентраты, изоляты и гидролизаты сывороточных, молочных, яичных, соевых белков [5].

Для восстановления потерь воды организмом спортсмена во время тренировок и соревнований производятся специализированные напитки (категория В), в состав которых традиционно входят углеводно-хлоридно-натриевые композиции. Категорию D представляют различные предтренировочные комплексы, витаминно-минеральные добавки, аминокислоты и др.

Приём спортивного питания направлен, в первую очередь, на улучшение спортивных результатов, повышение силы и выносливости, укрепление здоровья, увеличение объёма мышц, нормализацию обмена веществ, достижение оптимальной массы тела и в целом на увеличение качества и продолжительности жизни спортсменов.

Важное место в современной пищевой технологии принадлежит развитию спортивного питания, особенно предтренировочных комплексов, под которыми подразумевается использование таких продуктов питания, которые при систематическом употреблении спортсменами и любителями здорового образа жизни оказывают желаемое воздействие на организм в целом или на его определенные системы, при этом не нанося вред организму и не оказывая побочных явлений. Предтренировочные комплексы помогают людям, ведущим активный образ жизни усилить желание заниматься активной деятельностью, в том числе спортом и физкультурой, а спортсменов мотивируют и помогают им сосредоточиться на процессе тренировки. В настоящее время предтренировочные комплексы – это сравнительно новый вид специализированных пищевых продуктов для питания спортсменов, которые завоевали популярность среди спортсменов и любителей здорового образа жизни [6, 7]. Современное спортивное питание – это полноценный ответ плотному графику жизни, а концентрированные спортивные добавки являются комплексными элементами питания, способными полноценно удовлетворить потребности организма профессионального спортсмена или любителя [8, 9].

В настоящее время большая часть российского рынка спортивного питания представлена сухими белковыми моно- и многокомпонентными смесями американских и европейских производителей. Самый крупный рынок спортивного питания имеют США, в Европе рынок меньше, причем все основные бренды сосредоточены в Германии. Такие пищевые добавки для спортивного питания имеют сомнительный состав и очень высокую цену. Ситуация на Российском рынке спортивного питания сложно оценить, т. к. большая часть продукции покупается и продается нелегально. Однако, отечественный рынок спортивного питания обладает значительным потенциалом для развития и может увеличиться в ближайшие годы в несколько раз благодаря новым потребителям и увеличению доступности товаров. Согласно «Федеральной целевой программе развития спорта» к 2020 году в занятия спортом в России планируется вовлечь до 40 млн. человек.

Эффективным подходом в решении проблем импортозамещения является разработка отечественных сублимированных продуктов для спортивного питания на основе пробиотических микроорганизмов, пребиотических ингредиентов и метабиотиков, производство которых экономически выгодно и перспективно. Сублимированные продукты не требуют специальных условий для хранения, удобны в транспортировке, не изменяют показатели качества в течение длительного времени.

Метабиотики – это новая группа микроэкологических средств, направленных на сохранение и восстановление функций микробиома человека, это структурные компоненты пробиотических микроорганизмов, и / или их метаболитов, и / или сигнальных молекул с определенной (известной) химической структурой, которые способны улучшить специфичные для организма человека физиологические функции, метаболические, эпигенетические, информационные, регуляторные, транспортные и / или поведенческие реакции, связанные с деятельностью симбиотической микробиоты микрофлоры организма-хозяина, способны корректировать различные энергетические, психоэмоциональные и другие процессы в организме человека [10–13].

Поэтому целью исследования являлась разработка биотехнологии сублимированных биопродуктов на молочно-растительной основе с метабиотиками для спортивного питания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследований служил созданный микробный консорциум молочнокислых бактерий и бифидобактерий (Lactococcus lactis subsp. cremoris, Lactococcus lactis subsp. diacetilactis, Streptococcus salivarius thermophilus, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus delbrukii subsp. bulgaricus, Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium longum) с комплексом пробиотических и биотехнологически ценных свойств.

В качестве белково-углеводных, витаминно-минеральных и пребиотических ингредиентов использовались белково-углеводного препарата «Лактобел» пребиотической направленности, кедровый шрот и какао-порошок. В качестве метабиотиков использовалась биологически активная добавка к пище «Йодпропионикс» – концентрированная биомасса пропионовокислых бактерий, содержащая йод в органической форме, которая нормализует микробиоценоз кишечника человека и понижает негативное воздействие радиационного фона и мутагенных факторов на организм. Йодпропионикс содержит различные продукты метаболизма пропионовокислых бактерий, в том числе витамин В12. Технологическая схема производства сублимированных биопродуктов с метабиотиками для спортивного питания представлена на рисунке 1.

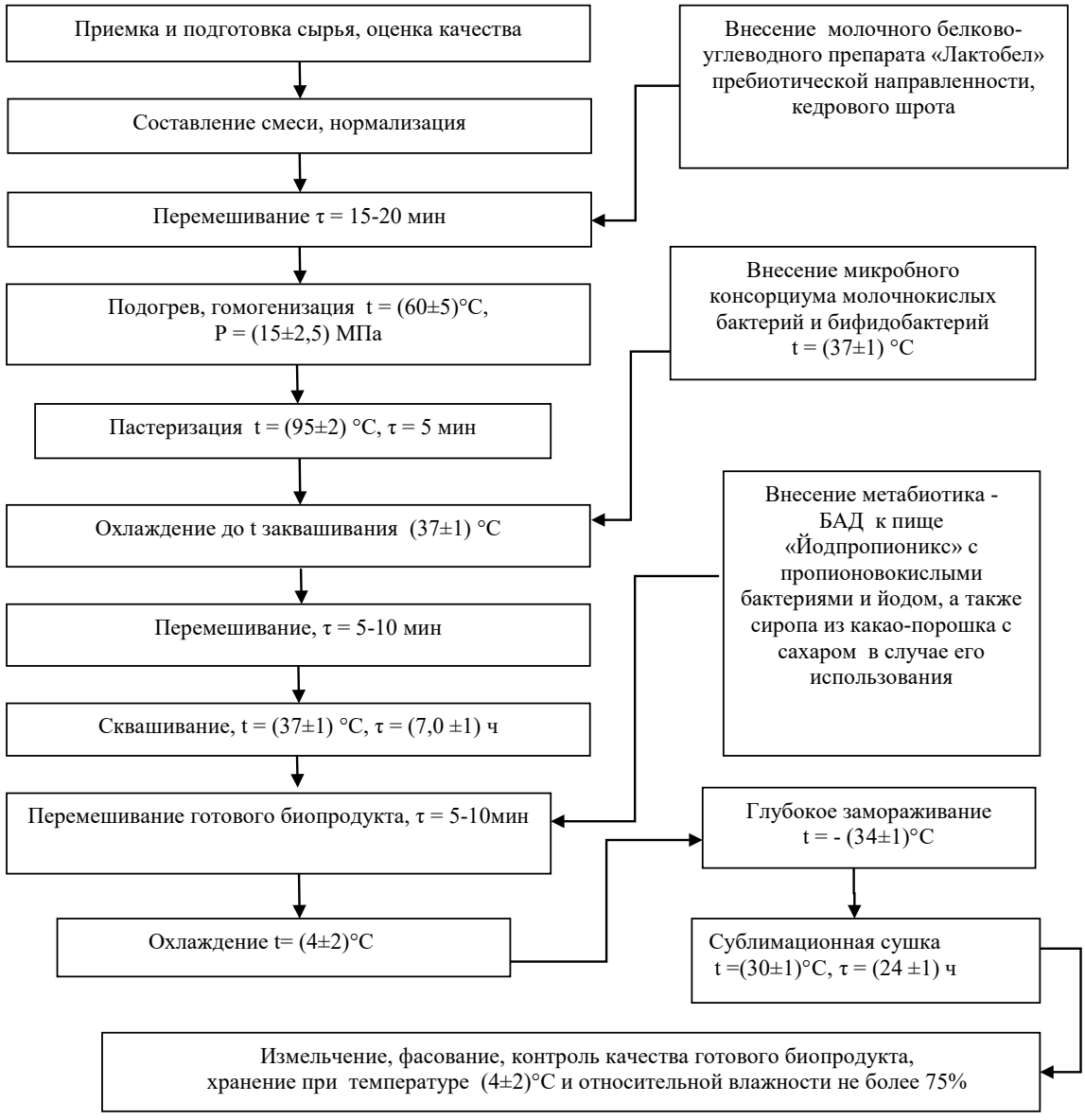


Рис. 1. Технологическая схема производства сублимированных биопродуктов для спортивного питания

Комбинация молочного сырья с растительными компонентами позволяет создать биопродукт сбалансированного состава с необходимыми функциональными свойствами, которые способны оказывать позитивное влияние на организм человека. Выбор молочного белково-углеводного препарата «Лактобел» пребиотической направленности российского производства обусловлен тем, что он содержит альбумин, казеинаты, лактозу, сывороточные белки и пребиотик – лактулозу, обладает пребиотическими и бифидогенными свойствами, и позволяет получить синбиотический биопродукт повышенной пищевой и биологической ценностью. Молочный белково-углеводный препарат «Лактобел» способен активизировать деятельность как микрофлоры заквасочной микрофлоры микробного консорциума биопродукта, так и полезной микрофлоры желудочно-кишечного тракта человека.

По внешнему виду «Лактобел» – это светло-желтый порошок с характерным сладковатым вкусом сухого молока, который хорошо растворяется в теплой воде и обезжиренном молоке, не образует осадка, при пастеризации не теряет своих технологических свойств (не выпадает в осадок, не коагулирует и не денатурирует).

Выбор кедрового шрота обусловлен тем, что он имеет богатый белковый, углеводный, витаминный и минеральный состав, содержит более 18 аминокислот, из них 70 % – незаменимых и условно незаменимых, что указывает на высокую биологическую ценность белков кедрового шрота, усвояемость которого составляет 95 %, что сопоставимо с усвояемостью белков куриного яйца. Липидный состав кедрового шрота представлен фосфолипидами, цереброзидами, сульфолипидами, олеиновой, линоленовой и гамма-линоленовой ненасыщенными жирными кислотами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Углеводный состав кедрового шрота представлен такими полисахаридами, как крахмал, клетчатка, пентозаны, декстрины и водорастворимыми сахарами – глюкозой, фруктозой, сахарозой и рафинозой. Кедровый шрот богат преимущественно жирорастворимыми витаминами (A, E, D, K, F), а также витаминами группы B и фолиевой кислотой. А по содержанию макро- и микроэлементов кедровый шрот является уникальным природным источником минеральных веществ, таких как медь, марганец, ванадий, калий, натрий, фосфор, кальций, молибден, никель, йод, бор, цинк, железо, фосфор, магний, кобальт, барий, титан, алюминий и серебро [14–17].

По внешнему виду кедровый шрот – это сыпучий порошок со вкусом кедрового ореха, он способен активизировать деятельность полезной микрофлоры желудочно-кишечного тракта, обладает бифидогенными и пребиотическими свойствами.

Выбор какао-порошка обусловлен тем, что напиток из какао позволяет быстро восстановить запасы белков и углеводов, быстрее восстанавливаются мышцы, улучшается работа сердечно-сосудистой системы за счет флавоноидов.

Какао-порошок очень полезный и нужный в рационе спортсмена продукт, т. к. содержит различные витамины (группы B, PP, K) и минеральные вещества (селен, калий, фосфор, магний, кальций, натрий, железо, марганец, цинк). По данным американских исследователей, какао для спортсменов оказывается даже эффективнее спортивного питания. В его состав также входит гормон-дофамин, поднимающий настроение и на долго дарящий заряд положительных эмоций, что очень важно уставшему человеку после интенсивной тренировки.

Биотехнология производства сублимированного продукта включает в себя общепринятые для получения жидких кисломолочных продуктов технологические операции. После окончания процесса сквашивания, готовый биопродукт охлаждается и направляется на сублимационную сушку.

Основные качественные показатели сублимированных биопродуктов с метабиотиками для спортивного питания представлены в таблице 1.

Для спортивного питания можно использовать сублимированные биопродукты как в виде хорошо растворимого в воде сухого порошка или в таблетированном виде или в виде биоконфет. После восстановления, биопродукты имеют однородную сметанообразную консистенцию, цвет от кремового до коричневого, равномерный по всей массе сгустка, обладает приятным чистым кисломолочным вкусом.

Таблица 1. Основные качественные показатели сублимированных биопродуктов с метабиотиками для спортивного питания

Наименование показателя	Характеристика сублимированных биопродуктов	
	с лактобелом и кедровым шротом	с лактобелом, кедровым шротом и какао-порошком
Массовая доля жира, %	32,0 ± 0,5	32,0 ± 0,5
Массовая доля белка, %	40,0 ± 0,4	40,5 ± 0,4
Массовая доля углеводов, %	45,5 ± 0,5	50,5 ± 0,5
Массовая доля влаги, %	4,0 ± 0,1	4,0 ± 0,1
Индекс растворимости, $см^3$	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01
Органолептические показатели		
– вкус и запах – консистенция – цвет	Чистый кисломолочный ореховый сыпучий порощок кремовый, равномерный по всей массе	Чистый кисломолочный орехово-шоколадный сыпучий порощок коричневый, равномерный по всей массе
Количество клеток на конец срока годности, не менее, КОЕ/г: молочнокислых бактерий бифидобактерий пропионовокислых бактерий	 10^9 10^9 10^9	 10^9 10^9 10^9
Срок хранения, сутки	180	180
Показатели безопасности	соответствуют требованиям ТР ТС 033/2013	

Новые сублимированные биопродукты не изменяют своей пищевой и биологической ценности, структуры, цвета, способности к быстрому восстановлению, при герметической упаковке эти биопродукты длительное время сохраняют качество при нерегулируемых температурных условиях. При низких температурах пробиотическая микрофлора сублимированных биопродуктов полностью сохраняется. На новые сублимированные биопродукты для спортивного питания разработана нормативно-техническая документация.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арансон, М.В. Питание для спортсменов / М.В. Арансон // М., 2001. – 224 с.

2. Азизбекян, Г.А. Основания к использованию спортсменами специализированных продуктов питания / Г.А. Азизбекян, Я.Д. Лешик, А.П. Поздняков и др. // Вопросы питания. – 2008. – Том 77. – № 6. – С. 58–61.

3. Schneider, M.B. Clinical report – sports drinks and energy drinks for children and adolescents: are they appropriate? // Pediatrics. – 2011. – Vol.127. – № 6. – P. 1182–1189.

4. Воробьева, В.М. Классификация и характеристика специализированных продуктов для питания спортсменов / В.М. Воробьева [и др.] // Вопросы питания. – 2010. – Т. 79. – № 6. – С. 64–68.

5. Борисова, О.О. Питание спортсменов: зарубежный опыт и практические рекомендации / О.О. Борисова // М., 2007. – 132 с.

6. Штерман, С.В. Предтренировочные комплексы в спортивном питании / С.В. Штерман, М.Ю. Сидоренко, В.С. Штерман, Ю.И. Сидоренко // Пищевая промышленность. – 2017. – № 10. – С. 54–57.

7. Специализированный спортивный предтренировочный напиток "КРЕА ПАМП" Штерман С.В., Сидоренко М.Ю., Штерман В.С. В сборнике:Инновации в товароведении, общественном питании и длительном хранении продовольственных товаров Сборник материалов VII Межведомственной научно-практической конференции. – 2015. – С. 104–106.

8. Штерман, С.В. Производство продуктов спортивного питания – одно из перспективных направлений в пищевой промышленности. Часть I. / С.В. Штерман, М.Ю. Сидоренко, В.С. Штерман, Ю.И. Сидоренко // Пищевая промышленность. – 2017. – № 3. – С. 22–24.

9. Штерман, С.В. Производство продуктов спортивного питания – одно из перспективных направлений в пищевой промышленности. Часть II. / С.В. Штерман, М.Ю. Сидоренко, В.С. Штерман, Ю.И. Сидоренко // Пищевая промышленность. – 2017. – № 4. – С. 49–52.

10. Ардатская, М.Д. Пробиотики, пребиотики и метабиотики в коррекции микроэкологических нарушений кишечника / М.Д. Ардатская // Медицинский совет. – 2015. – № 13. – С. 94–99.

11. Ардатская, М.Д. Метабиотики как естественное развитие пробиотической концепции / М.Д. Ардатская, Л.Г. Столярова, Е.В. Архипова, О.Ю. Филимонова // Трудный пациент. – 2017. – Т. 15. – № 6–7. – С. 35–39.

12. Шендеров, Б.А. Метабиотики – новая технология профилактики заболеваний, связанных с микроэкологическим дисбалансом человека / Б.А. Шендеров // Вестник восстановительной медицины. – 2017. – № 4. – С. 40–49.

13. Шендеров, Б.А. Метабиотики – новая технология профилактики и лечения заболеваний, связанных с микроэкологическими нарушениями в организме человека / Б.А. Шендеров, Е.И. Ткаченко, Л.Б. Лазебник, М.Д. Ардатская, А.В. Синица, М.М. Захарченко // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2018. – № 3 (151). – С. 83–92.

14. Ширеторова В.Г. Минеральный состав семян сосны сибирской и продуктов их переработки // Вестник ВСГУТУ. – 2014. – № 1(46). – С. 93–96.

15. Хантургаев, А.Г. Исследование процесса культивирования бифидобактерий в молоке при добавлении кедрового шрота / А.Г. Хантургаев // Вест-ник ВСГУТУ. – 2013. – № 6 (45). – С. 117–122.

16. Хантургаев, А.Г. Производство функциональных продуктов из семян сосны Сибирской: научные основы и практическая реализация: монография/ А.Г. Хантургаев, В.Г. Ширеторова, Т.И. Котова, В.А. Хантургаева. – Улан-Удэ: Изд-во ВСГУТУ, 2018. – 145 с.

17. Хантургаев, А.Г. Изучение качественных характеристик биопродуктов функционального питания с использованием вторичного сырья переработки кедрового ореха / А.Г. Хантургаев, И.С. Хамагаева, Т.И. Котова // Вестник ВСГУТУ. – 2019. – № 2 (73). – С. 20–28.

УДК 637.523.2

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ДОБАВКИ «ГЕЛЕОН-200М» ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ПОЛУКОПЧЕНОЙ КОЛБАСЫ

Е.П. Мирошникова, Ю.С. Кичко, М.В. Клычкова, М.Д. Романко

Оренбургский государственный университет, Оренбург, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Мясная промышленность находится на ведущих позициях отраслей агропромышленного комплекса России, а мясо и мясопродукты одни из главных продуктов в рационе человека. Мясопродукты содержат необходимые человеку питательные вещества: незаменимый источник полноценного белка, жиров, углеводов, витаминов, минеральных веществ, других жизненно важных нутриентов.

Полукопченые колбасы – один из самых популярных у покупателей видов колбасных изделий. Мясоперерабатывающие предприятия России выпускают их в большом объеме и в достаточно широком ассортименте. Из-за того, что цены на мясо и мясное сырьё резко возросли, это повлекло за собой увеличение себестоимости полукопченых колбас, их реализация значительно снизилась.

Чтобы решить эту проблему мясоперерабатывающие предприятия стали использовать более дешевое мясное сырьё и вкусоароматические добавки, а также различные виды белков растительного и животного происхождения. Но это привело к ухудшению качества колбасных изделий.

На фоне этого возникла необходимость разработать новые рецептуры и технологии, позволяющие вырабатывать полукопченые колбасы с относительно низкой себестоимостью из недорогого блочного мясного сырья, мяса с повышенным содержанием жировой и соединительной ткани, мяса механической обвалки, в том числе птицы, а также белков растительного и животного происхождения.

Цель работы – разработка рецептуры колбасы полукопченой «К завтраку студента» с использованием функциональной добавки «Гелеон – 200М» в сочетании с мясом птицы, а именно филе куриной грудки, на основе изучения их состава и свойств.

Актуальность заключается в обосновании возможности введения функциональной добавки «Гелеон – 200М» при производстве мясных продуктов, а также рентабельности ее использования.

Практическая значимость работы заключается в разработке нового биологически полноценного продукта колбасы полукопченой «К завтраку студента». К тому же данная разработка считается экономически выгодной. Ввиду того, что в ней находится филе куриной грудки – дешевое питательное мясное сырье и натуральная функциональная добавка «Гелеон – 200М», вследствие чего у продукта высокая пищевая и биологическая ценность, хорошие органолептические показатели с ярко выраженным вкусом.

Разработанный ассортимент комплексных пищевых добавок «Гелеон» предоставляет мясоперерабатывающим предприятиям гарантию выработки качественных мясных продуктов с заданными реологическими свойствами. Пищевые добавки разработаны российскими специалистами специально для применения в условиях отечественного производства, с учетом необходимости решения возникающих технологических задач.

Преимущества применения многофункциональных систем «Гелеон»:

1. Экономические: оптимальное соотношение цена / качество;

2. Снижение себестоимости происходит за счет: увеличения выходов готовой продукции; снижения потерь массы при термообработке; уменьшения риска выпуска нестандартной продукции.

3. Технологические:

– возможность регулирования реологических свойств фарша и, следовательно, уменьшение пористости при шприцевании колбасных изделий;

– стабилизация фаршевой системы за счет изменения вязкости;

– влияние на уменьшение показателя активности воды и, также, на сохранение свежести продукта в процессе хранения;

– возможность снизить потери массы при термообработке и хранении колбасных изделий;

– сохранение своих стабилизирующих свойств в процессе стерилизации продукции при производстве колбасы;

– сохранение заданного вкуса продукта при стерилизации;

– снижение риска образования бульонно-жировых отеков при термообработке, а также при случайном повышении температуры или увеличении экспозиции в процессе варки колбасных изделий;

– отсутствие посторонних вкуса и запаха;

– совместимость со всеми ингредиентами, применяемыми в колбасном производстве.

4. Маркетинговые:

– улучшение товарного вида колбасных изделий;

– обеспечение хорошей нарезаемости ветчин в оболочке, получение гладкого ровного среза;

– облегчение нарезки паштетообразных колбасных изделий (продукт не прилипает к ножу);

– снижение отсечения влаги при упаковке продукта под вакуумом.

В связи с большими заменами мясного сырья в рецептурах рубленных полуфабрикатов, варено-копченых, полукопченых, кровяных и ливерных колбас, паштетов, продуктов в желе, готовый продукт зачастую имеет светлый, «не мясной» цвет и рыхлую структуру. Такое снижение потребительских характеристик продукции негативно сказывается на покупательском спросе. Для решения данных проблем специалисты ГК «СОЮЗСНАБ» предлагают использовать уникальную разработку – функциональную смесь «Гелеон 200 М».

Добавка представляет собой смесь белков животного происхождения (гемоглобин, плазма, яичный, молочный белок). В ее состав также входит сухое обезжиренное молоко и пектин. Таким образом, функциональная смесь «Гелеон 200 М» является полноценным, легкоусвояемым, сбалансированным по аминокислотному составу продуктом. С ее помощью производители могут приготовить имитационное мясо «говядины», используя куриное, свиное или коллагенсодержащее мясное сырье. Благодаря наличию в составе белков гемоглобина, функциональная смесь «Гелеон 200 М» обеспечивает натуральный цвет, благодаря гемоглобину и плотную консистенцию готовому мясному изделию за счет яичных и молочных белков. Дополнительного внесения красителей не требуется.

Имитационное мясо готовится путем предпосола сырья с функциональной смесью на куттере, мешалке или в массажере. На 100 кг грудки куриной требуется 4 кг «Гелеона 200 М» и 5 – 8 л воды. На 100 кг свиной лопатки требуется 4 кг «Гелеона 200 М» и 10–14 л воды. Полученный имитационный продукт позволяет заменить дорогостоящее сырье в рецептурах широкого ассортимента полукопченых, варено-копченых, сырокопченых и сыровяленых колбас. При этом органолептические характеристики готовых изделий остаются высокими.

Добавка позволяет решить ряд технологических проблем при производстве кровяных или ливерных колбас:

– исключить долгий процесс подготовки сырья в виде натуральной крови;

– повысить микробиологические показатели готовой продукции;

– снизить трудозатраты и себестоимость колбасных изделий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования является колбаса полукопченая «К завтраку студента», изготовленной с использованием функциональной добавки «Гелеон 200 М».

В ходе работы были применены следующие методы исследования:

органолептические;

физико – химические;

безопасность продукта.

Таблица 1 – Используемое сырьё для производства колбасы полукопченой «К завтраку студента»

Наименование	НД
Мясо кур (грудки кур, цыплят, цыплят-бройлеров и их части)	ГОСТ 31962–2013
Шпик хребтовой	ГОСТ Р 55485–2013
Гелеон – 200М	-
Посолочная смесь (соль, фиксатор окраски Е250)	-
Комбимикс Московская	-
Древесное сырьё для копчения	ТУ 113 – 322 – 76
Вода питьевая	ГОСТ Р 51232–98
Черева	ГОСТ 33791–2016

Для производства колбасы полукопченой «К завтраку студента», в качестве сырья была использована куриная грудка.

Куриная грудка – идеальный диетический продукт в 100 г. куриной грудки содержится огромное количество легкоусвояемого белка (23,6 г.), минимум жира (1,9 г.), практически нет углеводов (0,4 г.). Калорийность составляет 113 ккал. (на 100 грамм продукта).

Работа выполнена на кафедре БЖСиА факультета прикладной биотехнологии и инженерии ОГУ в период прохождения преддипломной практики. Изготовление продукта произведено на мясоперерабатывающем предприятии ООО «Мясная Деревня».

В процессе работы по разработке и изготовлению колбасы полукопченой «К завтраку студента» с использованием функциональной добавки «Гелеон 200 М», были исследованы органолептические, физико-химические и микробиологические показатели.

Результаты физико-химических исследований представлены в таблице 2.

Микробиологические показатели представлены в таблице 3.

Содержание токсичных элементов представлено в таблице 4.

Органолептические, физико-химические и микробиологические показатели, представленные выше, легли в основу разработанного СТО.

Для сравнительной, оценки приведенных выше показателей, была взята колбаса варено-копченая «Московская» категории А ГОСТ Р 55455–2013.

Результаты физико-химических исследований представлены в таблице 5. Микробиологические показатели соответствуют нормативно-технической документации.

Таблица 2 – Физико-химические показатели колбасы полукопченой «К завтраку студента»

Физико-химические показатели	Ед. изм.	Значение характеристики		НДТ на методы исследования
		по НД не более	при испыт.	
Массовая доля влаги	%	60	54,7	ГОСТ 33319–2015
Массовая доля хлористого натрия (поваренной соли)	%	3,0	2,6	ГОСТ 9957–2015
Массовая доля жира	%	30	23,5	ГОСТ 23042–2015
Массовая доля белка	%	не менее 10,0	15,84	ГОСТ 25011–81
Массовая доля нитрита натрия	%	0,0075	0,0023	ГОСТ 8588.1–78

Таблица 3 – Микробиологические показатели колбасы полукопченой «К завтраку студента»

Микробиологические показатели	Ед. изм.	Значение Характеристики		НДТ на методы исследования
		по НД не более	при испыт.	
КМАФАнМ	КОЕ/г	не более 1×10^3	Не обн	ГОСТ 10444.15
БГКП (колиформы)	КОЕ/г	в 1,0 г не допуск.	Не обн	ГОСТ 31747–2012
Сальмонеллы	КОЕ/г	в 25 г. не допуск.	Не обн	ГОСТ 31659–2012
Листерии	КОЕ/г	в 25 г. не допуск.	Не обн	ГОСТ 32031
S. Aureus	КОЕ/г	в 1,0 г не допуск.	Не обн	ГОСТ 31746–2012
Сульфитредуцирующие клостридии	КОЕ/г	в 0,1 г не допуск.	Не обн	ГОСТ 29185–2014

Таблица 4 – Содержание токсичных элементов колбасы полукопченой «К завтраку студента»

Токсичные элементы	Ед. изм.	Значение Характеристики		НДТ на методы исследования
		по НД не более	при испыт.	
Свинец	Мг/кг	0,5	0,073	ГОСТ 30178–96
Мышьяк	Мг/кг	0,1	0,08	ГОСТ 26930–86
Кадмий	Мг/кг	0,05	0,005	ГОСТ 30178–96
Ртуть	Мг/кг	0,03	0,004	ГОСТ 26927–86

Таблица 5 – Физико-химические показатели колбасы варено-копченой «Московская»

Физико-химические показатели	Ед. изм.	Значение характеристики		НДТ на методы исследования
		по НД не более	при испыт.	
Массовая доля влаги	%	60	49	ГОСТ 33319–2015
Массовая доля хлористого натрия (поваренной соли)	%	3,0	4,0	ГОСТ 9957–2015
Массовая доля жира	%	30	39	ГОСТ 23042–2015
Массовая доля белка	%	не менее 10,0	17	ГОСТ 25011–81
Массовая доля нитрита натрия	%	0,0075	0,005	ГОСТ 8588.1–78

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

показали, что в разрабатываемой колбасе «К завтраку студента», по отношению к колбасе «Московской» содержание соли снизилось на 1,4 г / 100 г., за счет того, что при посоле говядина «берет» больше соли, чем куриная грудка, содержание жира снизилось на 15,5 г / 100г, белок увеличился на 2,16 г./100г, калорийность снизилась на 144 ккал / 100г, благодаря замене основного сырья.

Исследования показали, что при использовании функциональной добавки «Гелеон 200 М» значительно уменьшилось содержание нитрита натрия в готовом продукте, благодаря наличию в составе добавки белков гемоглобина, функциональная смесь обеспечивает натуральный цвет, а это значит применение дополнительных красителей не требуется.

Характеристика внешнего вида по органолептическим показателям: батон с чистой сухой поверхностью, без слипов и пятен; консистенция плотная; цвет темно-красный, с жировыми включениями, так как при производстве был добавлен в рецептуру шпик хребтовой; вкус и запах свойственен данному виду.

Содержание белка составляет 15,84 %, жира 23,5 %, влаги 54,7 %, крахмал отсутствует. Данные физико-химические показатели характеризует продукт, как полноценный и питательный.

В результате проведения опроса среди студентов, можно смело делать выводы, что колбаса полукопченая «К завтраку студента» с применением функциональной добавки «Гелеон 200М» по своим органолептическим свойствам ничем не хуже колбасы варено-копченой «Московской», а в чем-то даже и превосходит этот продукт.

Таким образом, представленный продукт – колбаса полукопченая «К завтраку студента», предназначена для непосредственного употребления в пищу и приготовления различных блюд и закусок, для реализации через розничную торговлю и сеть общественного питания. Мясной продукт вырабатывается с применением функциональной добавки «Гелеон 200М» с целью получения нового продукта питания, обладающего всеми функциональными свойствами для данного вида продукта.

Современные экономические показатели качества продукции обращают большое внимание на фактор конкурентоспособности предприятия. Безусловно, что при рыночных отношениях производитель стремится добиться стабильного качества своей продукции, использовать все технологии и инструменты, выработанные мировой и отечественной практикой. Важнейшим из них является система обеспечения качества.

Анализируя результаты собственных исследований и производственных испытаний, можно сделать следующие выводы:

– Выявлены особенности использования функциональной добавки «Гелеон 200М» в формировании структуры фарша и готовых изделий, в процессе производства, характеризуемая структурно-механическими свойствами, что позволило сформировать цель и задачи исследования.

– Установлено, что использование функциональной добавки «Гелеон 200М» благоприятно сказывается на органолептических свойствах продукта.

– Определено оптимальное соотношение сырья для производства мясного продукта – колбасы полукопченой «К завтраку студента», также разработана технология производства данного вида колбасы.

– По физико-химическим показателям мясной продукт находится в пределах нормы, использование филе куриной грудки, в качестве основного мясного сырья повышает питательную ценность продукта.

– Микробиологические показатели продукта находятся в пределах нормы.

– Разработан СТО на колбасу «К завтраку студента».

ВЫВОД

Колбаса полукопченая «К завтраку студента» соответствует всем показателям качества и безопасности. Так же себестоимость колбасы значительно ниже, чем у полукопченых колбас, основным сырьем которых является говядина.

ЛИТЕРАТУРА

Стадникова, С.В. Колбасное производство. Часть 2: учебное пособие / С.В. Стадникова, М.Д. Романко, Оренбург: ООО ИПК «Университет» 2014 – 134 с.

Стадникова, С.В. Общая технология колбасного производства. Часть 1. Сырье и материалы колбасного производства. / С.В. Стадникова, Н.Г. Догарева, А.И. Богатов // Учебное пособие – Оренбург: ОГУ. 2010–124 с.

Губер Н.Б. Биологическая ценность мясной продукции при использовании биологически активных веществ // Международный научно-исследовательский журнал. 2013. № 10–1(17). С. 96–97

Топурия, Г.М. Практикум по технологии мяса и мясопродуктов: учебное пособие / Г.М, Топурия, С.С. Жаймышева, Л.Ю. Топурия, О.В. Богатова, Е.П. Мирошникова – Оренбург: Издательский центр ОГАУ, 2013 – 204 с.

Кайшев, В.Г. Мясная индустрия России в 2013 году: состояние и тенденции / В.Г. Кайшев, В.В. Дойков // Мясная индустрия. – 2014. № 3. – С. 10–15.

Поздняковский, В.М. Экспертиза мяса и мясопродуктов: Учеб. – справ. пособие. – 2-е изд., стер. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во 2002. – 526 с.

Нестеренко, А.А. Посол мяса и мясопродуктов / А.А. Нестеренко, А.С. Каяцкая // Вестник НГИЭИ. – 2012. – № 8. – С. 46–54.

Топурия Г.М. Современное состояние рынка мяса и мясных продуктов // Вестник мясного производства. 2009. Вып. 62(4). С. 106–109.

УДК 664.66.022.39

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ РЕГУЛИРОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ПРОИЗВОДСТВА, ПОТРЕБИТЕЛЬСКИХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ХЛЕБОБУЛОЧНЫХ ИЗДЕЛИЙ

Н.Н. Корнен[1,2], С.А. Калманович[1], О.Л. Вершинина[1], Т.А. Шахрай[2]

[1] *Кубанский государственный технологический университет, Краснодар, Россия*
[2] *Краснодарский научно-исследовательский институт хранения и переработки сельскохозяйственной продукции – филиал ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия», Краснодар, Россия*

Одним из приоритетных направлений Стратегии научно-технологического развития РФ до 2030 года является «…эффективная переработка сельскохозяйственной продукции, создание безопасных и качественных, в том числе функциональных, продуктов питания» [1].

Следует отметить, что реализация указанного приоритетного направления может быть достигнута с применением биотехнологических методов, обеспечивающих целенаправленное регулирование технологических процессов переработки сельскохозяйственной продукции и производства продуктов питания заданных потребительских и функциональных свойств.

Наиболее эффективным биотехнологическим методом регулирования эффективности технологических процессов производства, достижения заданных потребительских и функциональных свойств продуктов питания является применение в технологиях их производства растительных пищевых добавок, проявляющих комплекс технологических и функциональных свойств.

Учеными Краснодарского научно-исследовательского института хранения и переработки сельскохозяйственной продукции и Кубанского государственного технологического университета разработаны технологии производства пищевых добавок из вторичных ресурсов, образующихся при переработке фруктового и овощного сырья, а именно, добавки «Яблочная», «Тыквенная» и «Томатная». Технологии производства пищевых добавок имеют «ноу-хау».

Разработанные пищевые добавки проявляют антиоксидантные, гепатопротекторные и гипохолестеринемические свойства, благодаря содержанию в их составе антиоксидантов (Р–активных веществ, витамина Е, витамина С, β–каротина, ликопина, витамина РР), а также пищевых волокон, в том числе пектиновых веществ, что экспериментально подтверждено, в том числе в опытах in vivo) [2–4].

Учитывая, что продуктами питания, пользующимися постоянным и ежедневным спросом, являются хлебобулочные изделия, нами были проведены исследования по влиянию указанных добавок на эффективность технологических процессов производства хлебобулочных изделий, а также на формирование их потребительских и функциональных свойств.

Известно, что одним из технологических процессов производства хлебобулочных изделий является процесс активации хлебопекарных прессованных дрожжей, позволяющий интенсифицировать последующие процессы брожения теста, а также обеспечить высокое качество готового продукта [5].

Учитывая это, исследовали влияние пищевых добавок на эффективность процесса активации хлебопекарных прессованных дрожжей.

Установлено, что внесение пищевых добавок на стадии активации хлебопекарных прессованных дрожжей в количестве 1,5 % к массе пшеничной муки позволяет повысить подъемную силу дрожжей в 1,8–2,5 раза, при этом, чем ниже подъемная сила дрожжей, тем выше эффективность влияния пищевых добавок на их подъемную силу.

Повышение подъемной силы дрожжей при внесении пищевых добавок объясняется высоким содержанием в их составе сахаров и, прежде всего, моносахаридов (фруктозы и глюкозы), а также высоким содержанием минеральных веществ, являющихся благоприятной питательной средой для жизнедеятельности и размножения дрожжевых клеток.

По степени эффективности влияния пищевых добавок на подъемную силу хлебопекарных прессованных дрожжей добавки можно расположить в ряд (по убыванию): «Яблочная» → «Томатная» → «Тыквенная».

При исследовании влияния пищевых добавок на продолжительность процесса активации хлебопекарных прессованных дрожжей установлено, что внесение добавок в количестве 1,5 % к массе пшеничной муки позволяет сократить продолжительность активации: при внесении добавки «Яблочная» – на 1 час, а при внесении добавок «Томатная» и «Тыквенная» – на 30 минут, т. е. интенсифицировать процесс.

Наряду с технологическим процессом активации хлебопекарных прессованных дрожжей, особое значение при производстве хлебобулочных изделий имеет процесс брожения теста, учитывая это, исследовали влияние пищевых добавок на эффективность этого процесса, которую оценивали по продолжительности брожения теста, обеспечивающей достижение требуемого значения кислотности теста [5].

Установлено, что внесение пищевых добавок в тесто из пшеничной муки в количестве 6–8 % к массе муки позволяет сократить продолжительность процесса брожения теста на 30 – 40 минут, а также повысить физико-химические показатели качества изделия, выпеченного из приготовленного теста, такие, как пористость, общая деформация и удельный объем мякиша на 10–12 %, 20–25 % и 10–12 % соответственно.

Таким образом, применение разработанных пищевых добавок в производстве хлебобулочных изделий из пшеничной муки позволяет повысить эффективность технологических процессов, а также качество хлебобулочных изделий.

Установлено, что потребление в сутки 250 г. хлебобулочных изделий с применением разработанных пищевых добавок позволяет удовлетворить потребности в ряде функциональных пищевых ингредиентов (Р-активные вещества, пищевые волокна, пектин, калий, фосфор, медь, марганец) более, чем на 15 % от адекватной нормы, рекомендуемой в работе [6], т. е. хлебобулочные изделия, обогащенные пищевыми добавками, можно позиционировать как функциональные.

Кроме этого, экспериментально, в том числе в опытах in vivo, установлено, что хлебобулочные изделия, обогащенные разработанными пищевыми добавками, проявляют антиоксидантные свойства.

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод о том, что применение разработанных пищевых добавок, полученных из вторичных ресурсов переработки фруктов и овощей, проявляющих комплекс технологических и физиологических свойств, в технологии производства хлебобулочных изделий является эффективным биотехнологическим методом, обеспечивающим интенсификацию процессов производства и достижение высоких потребительских и функциональных свойств готового продукта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Стратегия научно-технологического развития РФ до 2030 года. – утв.
2. Корнен Н.Н., Лукьяненко М.В., Шахрай Т.А. Антиоксидантная активность пищевых добавок, полученных из вторичных растительных ресурсов // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2017. – № 02 (126). – С. 109–118.
3. Исследование антиоксидантных свойств пищевых добавок, полученных из вторичных растительных ресурсов, в опытах на лабораторных животных / Н.Н. Корнен [и др.] // Новые технологии. – 2017. – № 1. – С. 24–31.
4. Исследование гипохолестеринемических свойств пищевых добавок из вторичных растительных ресурсов, в опытах на лабораторных животных/Н.Н. Корнен [и др.] // Технология и товароведение инновационных пищевых продуктов. – 2017. – № 6. – С. 31–36.
5. Ауэрман Л.Я. Технология хлебопекарного производства: [учеб. для вузов] / Изд. 9-е, перераб. и доп. – СПб.: Профессия, 2009. – 416 с.
6. Методические рекомендации МР 2.3.1.2432–08 "Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации" (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 18 декабря 2008 г.) – 41 с.

УДК 664.921

РАЗРАБОТКА РЕЖИМОВ ПОСОЛА КУРИНЫХ СНЭКОВ

Н.Н. Галатюк, А.С. Насирова

Санкт-Петербургский политехнический Университет Петра Великого, Высшая школа биотехнологий и пищевых производств, Санкт-Петербург, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Сушеное мясо является одним из самых старых консервированных продуктов, известных человечеству. До появления исторических записей, воины и путешественники, пересекающие торговый путь вдоль Средиземного моря, обменивали или покупали вяленые мясные продукты, которые были питательными и удобными [1].

Мясные закуски массово распространены в Америке, Азии, Австралии, Европе, где их с давних времен производят и потребляют [2]. К ним относятся джерки (общенациональный американский продукт), билтонг (южноафриканская разновидность вяленого мяса), роган (китайское изделие из сушеного мяса), турецкая пастирма, «Бюнднер фляйш» (Швейцария), никку, пеммикан, соган, тасайо.

К представленным на российском рынке мясным закусочным продуктам относятся чипсы, строганина, мясные ломтики, карпаччо и другие [2]. Производство снэков из мяса сохраняет свою актуальность для массового потребителя как ввиду экономии времени на прием пищи, так и ввиду получения полноценного по пищевому составу продукта [3].

Бактериальные культуры используются в мясной промышленности для увеличения сроков годности. Улучшение санитарно-гигиенического состояния сырья достигается за счет ингибирования роста санитарно-показательной микрофлоры. Кроме того, использование бактериальных культур, разрешенных к использованию в пищевой промышленности, позволяет дополнительно обогатить пищевые субстраты питательными веществами (незаменимыми аминокислотами, витаминами, жирными кислотами) и улучшить органолептические показатели продуктов [5].

Первым этапом в приготовлении мясных снэков является посол. Современная технология посола мяса и мясных продуктов включает следующие способы внесения соли в продукт: сухой, мокрый и смешанный посол, посол, путем инъекции в толщу продукта (способ Линьяка) [4]. Посол – сложный процесс, включающий диффузионный перенос соли в ткани, диффузионно-осмотический перенос воды из тканей в тузлук или из тузлука в ткани, в зависимости от концентрации соли в посольной смеси. Динамику просаливания сырья можно изучать различными способами.

Цель работы: разработка режимов посола мяса для производства куриных снэков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для производства снэков использовали охлажденное филе куриной грудки. Посол осуществляли мокрым способом. В состав посольной смеси входила соль «Экстра» (2,2 % к массе мясного сырья) и сахар (1 %). В предварительно обработанный методом стерилизации ящик помещали куриное филе.

Затем мясное сырье заливали заранее подготовленным посольным раствором в количестве 25 % от массы мяса. Посол осуществляли при 4–6 °С в течение 6 часов.

В процессе посола определяли содержание сухих веществ в рассоле рефрактометрическим методом и активность воды в мясе с использованием прибора Decagon PawKit water activity meter («Decagon Devices, Inc», США) с периодичностью 0,5 ч.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что содержание сухих веществ тузлуков в процессе посола изменялось незначительно. Зависимость изменения активности воды в мясе при посоле приведено на рис. 1. Известно, что активность воды определяет соотношение связанной и свободной влаги в пищевом продукте. Существует три формы водных связей в пищевых продуктах: физико-механическая, химическая, физико-химическая. Связанная вода делится на химическую, адсорбционную, макрокапиллярную, микро капиллярную, осмотическую, иммобилизационную. Значительную роль играет связь воды с неводными компонентами продукта. На основании анализа содержания активной воды в мясе можно сделать заключение об окончании процесса просаливания.

Как видно из рис. 1 активность воды снижается в течение 6 ч, после чего наступает диффузионное равновесие, означающее выравнивание осмотического давления в рассоле и продукте, свидетельствующее о том, что дальнейшее выдерживание мяса в тузлуке нецелесообразно.

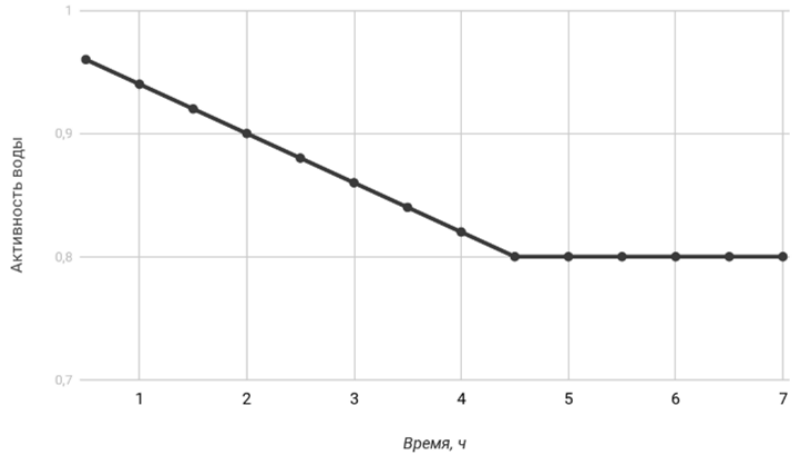


Рисунок 1 – Зависимость активности воды от времени посола мяса

Производитель снэков из мяса птицы рекомендует осуществлять посол в течение 9 ч [6]. На основании полученных результатов установлено, что продолжительность посола мясного сырья приведенным выше способом можно сократить до 6 часов. Это в свою очередь позволяет сократить затраты на электроэнергию, паровую энергию (при некоторых конструктивных особенностях конвективных сушильных печей), а также оптимизировать весь производственный цикл.

ЛИТЕРАТУРА

Timothy J. Bowser, R. Scott Frazier, Paul R. Weckler and Stacey J. Kowalski. Optimizing Jerky Drying Time with Minimal Product Impact [Электронный ресурс] // The Open Food Science Journal. – 2009. – С. 79 – 83 – Режим доступа: https://benthamopen.com

Акчурина, А.Р., Степанова Н.Ю. Разработка технологии производства мясных чипсов [Электронный ресурс] // Сборник научных трудов «Научное обеспечение развития АПК в условиях импортозамещения» – 2018. – С. 169 – 171 – Режим доступа: https://elibrary.ru

Зотова, Л.В. Инновационные технологические решения в производстве снековой продукции [Электронный ресурс] // Научные труды кубанского государственного технологического университета. – 2017. – С. 224 – 233 – Режим доступа: https://elibrary.ru

Нестеренко А.А., Каяцкая А.С. Посол мяса и мясопродуктов [Электронный ресурс] // «Вестник НГИЭИ» – 2012. – Режим доступа: https://cyberleninka.ru

Галатюк Н.Н., Базарнова Ю.Г. Применение биозащитных культур в технологии мясных снеков [Электронный ресурс] // Неделя науки СПБПУ. – 2018. – Режим доступа: http://elib.spbstu.ru

УДК 637

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ НАЦИОНАЛЬНОГО КАЛЬЦИЙСОДЕРЖАЩЕГО КИСЛОМОЛОЧНОГО ПРОДУКТА КОРОТ (КОРТ, КУРТ, КУРУТ) ДЛЯ НОРМАЛИЗАЦИИ КАЛЬЦИЕВОГО ОБМЕНА

Ж.К. Шоманова, З.М. Хасанова, Л.А. Хасанова, Т.К. Шоманова, А.С. Муканова, А.К. Шарипова, Р.Р. Хафизова

Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы,Уфа, Россия

Обладая высокой биологической активностью кальций участвует в формировании костной ткани, регуляции мышечных и, в частности, сердечных сокращений, проводимости нервных волокон, проницаемости клеточных мембран, свёртывании крови, метаболизме гликогена, активации широкого спектра ферментов и поддержании гомеостаза организма человека, проявляя при этом высокие антиоксидантные, противовоспалительные и противоаллергические свойства.

Кальциевый обмен осуществляется путём взаимодействия околощитовидных желез, почек, скелета и кишечника. Кости являются основным депо кальция (до 99 %). Экзогенный кальций попадает в кровь через слизистую кишечника путём активного транспорта. Концентрация кальция в плазме крови составляет 2,1–3,0 ммоль/л. Физиологически активным является ионизированный кальций, в крови его содержится 1,05–1,50 ммоль/л.

Суточный пищевой рацион взрослого человека должен содержать 0,8–1,0 г кальция. У беременных и кормящих женщин потребность в кальции возрастает до 2 г в сутки. Нарушение кальциевого обмена занимает одно из ведущих мест наряду с сахарным диабетом и заболеваниями щитовидной железы [5].

Обеспеченность организма кальцием падает при поражении кишечника (понижение всасываемости кальция), нарушении функции почек (изменение реабсорбция и фильтрация кальция) [7]. Коррекция дисбаланса кальция – один из важнейших факторов укрепления здоровья и профилактики целого ряда хронических заболеваний [4; 9; 11].

Значительное количество кальция попадает в организм человека с молочными продуктами такими, как сливки, молоко, сыр, творог [8]. Корот (синонимы: корт, курт, курут) – традиционный сухой кальцийсодержащий кисломолочный продукт кочевых народов Центральной Азии, а в настоящее время востребованный и популярный продукт в национальных кухнях многих народов мира, особенно тюркских и монгольских (азербайджанской, башкирской, бурятской, казахской, калмыкской, киргизской, татарской, турецкой, узбекской и др.) [12]. Корот является молодым сыром, который вырабатывают из коровьего, овечьего или козьего молока сквашиванием чистыми культурами молочнокислых стрептококков с последующим отделением сыворотки от сгустка и сушкой [3; 6; 10].

Корот отличается прекрасными вкусовыми качествами и высокой пищевой ценностью, поскольку содержит большое количество жира и белка (14–18 %), характеризуется сбалансированным аминокислотным составом (богат незаменимыми аминокислотами: триптофаном, метионином и лизином), значительным содержанием минеральных элементов, таких как кальций, фосфор, железо, магний, и витаминов [1–2].

В настоящей работе был исследован кальциевый состав образцов башкирского и казахского корота посредством рентгенофлуоресцентного энергодисперсионного анализатора БРА-18, осуществляющего определение содержания химических элементов в твердых, порошкообразных и жидких средах.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в образцах корота из двух традиционных регионов выработки данного продукта (Башкортостан и Казахстан) достаточно высокое содержание кальция: в пределах от 1,27 до 1,46 %.

Как башкирский, так и казахский корот, может быть прекрасной основой для разработки и производства кальцийсодержащей биологически активной добавки, способной обеспечить восстановление и нормализацию кальциевого обмена в организме человека.

ЛИТЕРАТУРА

Беляева М.А., Безотосова О.К. Компьютерная система расчета изменения температуры, влажности и массовых долей белков, жиров, витаминов в мясных полуфабрикатах при инфракрасном нагреве // Свидетельство регистрации программ для ЭВМ; № 2017610214.

Беляева М.А., Малази С.А. Оптимизация и аппаратурное оформление инфракрасной сушки национального кисломолочного продукта (курта) // Хранение и переработка сельхозсырья, 2017. – № 10. – С. 41–45.

Голубева Л.В., Долматова О.И., Кучменко Т.А., Саламатова А.К., Оскенбай А.О. Инновационные технологии в производстве курта // Пищевая промышленность, 2018. – № 5. – С. 30–31.

Лобанова Ю.Н. Особенности элементного статуса детей различных регионов России: автореф. дис… канд. биол. наук. – М., 2007. – 18 с.

Лукьянчиков В.С. Кальций: физиология. Онтогенетический и клинический аспект // Новые исследования, 2012. – № 2 (31). – С. 5–13.

Мырзаханов Н.М., Садикова А.К. Курт – продукт традиционный и современный – Вестник КарГУ, 2010. – 117 с.

Никонова Л.В. Гипопаратиреоз // Журнал ГрГМУ, 2003 – № 1 (1). – С. 3–8.

Скальный А.В., Рудаков И.А. Биоэлементы в медицине. – М.: Издательский дом «ОНИКС 21 век»: Мир, 2004. – 272 с.

Скальный А.В., Скальная М.Г., Решетник Л.А., Тармаева И.Ю. / Питание и элементный статус детского населения Восточной Сибири. – М.; Иркутск, 2008. – 293 с.

Смольникова Ф.Х., Асенова Б.К., Нургазезова А.Н., Нурымхан Г.Н. Национальный молочный продукт – курт // Научное обеспечение инновационных технологий производства и хранения сельскохозяйственной и пищевой продукции: конф. – Краснодар, 2016. – С. 397–401.

Цыренжапова Н.А., Тармаева И.Ю. Анализ элементного состава пищевых продуктов, поступающих в дошкольные организации // Acta Biomedica Scientifica, 2012. – № 4–2 (86). – С. 206–209.

Шоманова Ж.К., Муканова А.С., Хасанова З.М., Хасанова Л.А. Перспективность разработки кальцийсодержащей пищевой продукции на основе национального кисломолочного продукта корот (корт, курт, курут) // Пищевые технологии и биотехнологии. XVI Всероссийская конференция молодых ученых, аспирантов и студентов с международнм участием, посвященная 150-летию Периодической таблицы химических элементов (16 – 19 апреля 2019 г.): материалы конференции в 3-х частях. – Казань: Изд-во КНИТУ, 2019. – Ч. 2. – С. 425–428.

УДК 574 / 504.062.2

ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТЬ ХОЗЯЙСТВЕННОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СОРНЫХ РАСТЕНИЙ

Н.Е. Тарасовская[1,2], Б.Ж. Баймурзина[1,2], Л.А. Хасанова[2], З.М. Хасанова[2]

[1] Павлодарский государственный педагогический университет, Павлодар, Казахстан
[2] Башкирский государственный педагогический университет имени. М. Акмуллы, Уфа, Россия

Сопутствуя человеку повсюду сорные растения наносят значительный материальный урон и экономический ущерб в процессе ведения хозяйства. На борьбу с сорняками уходят огромные средства, что заставляет задуматься об извлечении выгоды из данных растений. Ниже приведены примеры хозяйственного использования двух видов злостных сорняков, таких как *Вьюнок полевой* (*Convolvulus arvensis* L.) и *Звездчатка средняя* (*Stellaria media* L.), на основании анализа литературных данных и собственных научных исследований [1–5].

Вьюнок полевой (*Convolvulus arvensis* L.) – [синонимы : березка, берестень, березка-вьюнок, вьюн, вьюнчик, горлянка, колокольчики, повилика, повитель, повитуха, тянучка] – наиболее злостный корневищный сорняк, которому культивация и механическая прополка чаще всего помогают распространяться. Однако *Вьюнок полевой* может использоваться как:

– средство для лечения ран, в том числе гнойных и длительно не заживающих, обладающее местным обезболивающим действием [4];

– слабительное средство для животных, что могло бы существенно сократить расход других ветеринарных лаксативных лекарственных препаратов [2];

– средство против ржавчины (млечный сок и кашица зеленых частей растения), хорошо предохраняющее металлические предметы и лезвия инструментов от ржавчины. Ранее в этом качестве из растительного сырья был рекомендован лишь млечный сок чистотела [2]. С химической точки зрения очевидно, что любой млечный сок (латекс растений), содержащий изопреноиды с кратными связями, способен депонировать (присоединяя по месту кратных связей) кислород, за счет чего пленка млечного сока не допускает к поверхности металла кислород воздуха, который вместе с влагой способен привести к коррозии металла [3];

– декоративное и беседочное вьющееся растение, неприхотливое в уходе;

– основа для закрепления барханов, дюн, засаживания шахтных терриконов и золоотвалов, поскольку растение успешно растет на щебне, песке, золе и в других неблагоприятных условиях.

Звездчатка средняя (*Stellaria media* L.) – [синонимы : мокрица, канареечная трава, мокричник, грыжник, сердечная трава, мокрец], досаждающая человеку повсеместно, может быть использована как:

– сырье для получения стойкой синей краски с целью окрашивания тканей, особенно шерстяных (в этом качестве растение нашло применение в текстильной промышленности) [2];

– средство для увеличения молока у кормящих матерей, а также дойных коров и коз [2];

– средство для откорма сельскохозяйственных животных и увеличения веса у истощенного молодняка, поскольку, как и все гвоздичные, растение богато сапонинами, увеличивающими проницаемость эпителия кишечника и за счет этого улучшающими всасывание пищи, а также витаминов и лекарственных препаратов. Наряду с тем, что многие звездчатки (например, *Звездчатка злачная* и *Звездчатка жестколистная*) достаточно токсичны для человека и животных, *Звездчатка средняя* – безвредный для человека и животных вид растения [5];

– средство для мытья жирной посуды и уничтожения неприятных запахов пищи и жира на на поверхности посуды и другой кухонной утвари (содержащиеся в растении тритерпеновые сапонины способствуют эмульгации жиров и их удалению, а также связыванию неприятно пахнущих продуктов белкового обмена) [3];

– средство для очищения лица и тела, в том числе для профилактики гнойничковых заболеваний и угревой сыпи, которое также основано на содержании в растении сапонинов и их свойстве эмульгировать жиры и связывать продукты азотистого обмена и жизнедеятельности микроорганизмов;

– средство для улучшения переваривания жирной пищи для больных с удаленным желчным пузырем (растительные сапонины за счет способности эмульгировать жиры функционально могут заменять желчь, способствуя перевариванию жиров липазой панкреатического сока и усвоению жирорастворимых витаминов);

– пища (в сыром виде, как компонент салатов в сочетании с молодыми листьями одуванчика, редиской, кресс-салатом и жерухой) [2].

ЛИТЕРАТУРА

1. Ильина Т.А. Большая иллюстрированная энциклопедия лекарственных растений. – М.: издательство «Э», 2017. – 304 с.

2. Пастушенков Л.В., Пастушенков А.Л., Пастушенков В.Л. Лекарственные растения: Использование в народной медицине и быту. – Л.: Лениздат, 1990. – 384 с.

3. Петров А.А., Бальян Х.В., Трощенко А.Т. Органическая химия. Учебник для вузов. – М.: Высшая школа, 1981. – 592с.

4. Рябоконь А.А. Новейший справочник лекарственных растений. – Ростов-на-Дону: Феникс, 2009. – 397 с.

5. Скрябин К.И. Ветеринарная энциклопедия. – М.: Советская энциклопедия, 1975. – Т.5. – 1088 с.

УДК 637.3 : 579

БИОТЕХНОЛОГИЯ КИСЛОМОЛОЧНОГО ПЛАВЛЕНОГО СЫРА С МЕТАБИОТИКАМИ

О.В. Козлова[1], С.И. Артюхова[2]

[1] Кемеровский государственный университет, Кемерово, Россия
[2] Омский государственный технический университет», Омск, Россия

Плавленый сыр весьма распространён в России благодаря доступной для всех слоёв населения, дешевизне, мелкой фасовке, простоте производства и широкому ассортименту. Сыр плавленый обладает высокой биологической и пищевой ценностью, это своеобразный концентрат молочного белка и жиров с высокой усвояемостью, практически не содержит холестерина (что очень важно для страдающих сердечно-сосудистыми заболеваниями и пожилых людей), это хороший источник витаминов А, B_2, Е, фолиевой кислоты, незаменимый источник кальция, недостаток потребления которого наблюдается у значительной части населения.

Кальций в плавленом сыре находится в оптимальном соотношении с фосфором и магнием, что повышает его усвояемость, а сочетание этих минеральных веществ и витаминов с полноценными белками и жирами способствует наилучшему усвоению всех питательных веществ, содержащихся в сырах. Однако особого внимания заслуживает кисломолочный плавленый сыр, который содержит в своем составе молочнокислые бактерии, способствующие оздоровлению нормальной микрофлоры кишечника человека.

Нормальная микрофлора кишечника человека имеет важнейшее значение для поддержки иммунитета, регулирования обмена веществ в организме человека и напрямую влияет на высшую нервную систему человека. Если ранее считалось, что преждевременное старение организма человека и многие хронические заболевания обусловлены дефектами эндокринной, нейронной и нейроэндокринной коммуникаций на уровне только собственных эукариотических клеток млекопитающих, то, в последние годы исследованиями различных ученых убедительно продемонстрировано, что многие низкомолекулярные участники этой коммуникации имеют не только организменное, но и пищевое и микробное происхождения. Следовательно, несбалансированность питания и дисбаланс симбиотической микробиоты, в настоящее время рассматриваются в качестве ведущих средовых факторов, вызывающих нарушения клеточного метагенома и метаэпигенома человека, риск дисстрессов и нейродегенеративных, метаболических, психических и других заболеваний человека.

По данным многочисленных исследований ученых установлено, что яды, выделяемые гнилостными бактериями кишечной микрофлоры могут вызывать такие заболевания, как болезнь Альцгеймера, Паркинсона, сахарный диабет 2-го типа, рассеянный склероз, подагра, поведенческие и психические заболевания (аутизм, шизофрения, синдром хронической усталости), заболевания опорно-двигательного аппарата (гипертрофия, атрофия скелетной мускулатуры), преждевременное старение и даже рак. Если у человека существует проблема в кишечнике, следовательно, имеются и неврологические расстройства, и все соматические болезни, как результат дисбиозов.

Взаимоотношения человека с его микрофлорой в конкретных условиях среды обитания является одним из основных факторов, определяющих рост, развитие, здоровье и среднюю продолжительность жизни человека.

С каждым десятилетием в важнейших процессах жизнедеятельности организма человека появляются всё больше различных нарушений, микробная экология человека подвергается активному разрушению в результате воздействия многочисленных природных, техногенных, социально-бытовых и других неблагоприятных факторов и агентов. К факторам и агентам, вызывающим дисбаланс микробной экологии человека относятся различные индустриальные загрязнители окружающей среды, пестициды, соли тяжелых металлов, радиация, повышенное потребление алкоголя, возраст старше 60–75 лет, технологические пищевые добавки, голодание или различные диеты с низким содержанием пищевых волокон или с повышенным содержанием жиров, сахаров, приём антигистаминных и противоопухолевых лекарственных препаратов, антибиотиков, антидепрессантов, стрессовые ситуации (инфекции, операционные вмешательства, длительная изоляция) и другие факторы [1, 2, 3].

Для поддержания и восстановления микробной экологии человека используют различные микроэкологические лекарственные препараты, биологические пищевые добавки и функциональные продукты питания, позволяющие целенаправленно конструировать пищевые рационы с учетом этнической принадлежности потребителей, их возраста, профессии, экологических и географических особенностей регионов их проживания.

На протяжении многих десятилетий микрофлору кишечника корректировали пробиотическими средствами. Однако, в настоящее время происходит концептуальный пересмотр представлений о пробиотиках, и на смену пробиотикам, пребиотикам, синбиотикам пришли метабиотики. Метабиотики – это продукты жизнедеятельности пробиотических бактерий, которые способствуют росту полезной микрофлоры, подавляют вредную микрофлору, и нормализуют бактериально-эпителиальные взаимодействия микрофлоры кишечника с элементами его слизистой оболочки. Метабиотики являются структурными компонентами пробиотических микроорганизмов, и / или их метаболитов, и / или сигнальных молекул с определенной (известной) химической структурой, которые способны улучшить специфичные для организма человека физиологические функции, метаболические, эпигенетические, информационные, регуляторные, транспортные и / или поведенческие реакции, связанные с деятельностью симбиотической микробиоты микрофлоры организма-хозяина. Исследованиями различных учёных установлено, что только через микрофлору и её метаболиты можем активно проводить профилактику и вмешиваться в лечение различных патологий [2, 4–6].

При конструировании метабиотиков целевого назначения особый интерес представляют энерго-метабиотики – модуляторы энергетического обмена в митохондриях и кишечной микробиоте для создания которых необходимы витамины (B_1, B_2, B_3, B_5, B_6, B_7, B_9, B_{12}, C, K_1 и K_2); минеральные вещества (Ca, Cu, Fe^{2+}, Fe^{3+}, Mg, Mn, Mo, Ni, Se, Zn); аминокислоты (лизин, аргинин, метионин, цистеин, β-аланин, серин, треонин, триптофан, гистидин, карнитин, аспарагиновая кислота); органические кислоты, некоторые нуклеотиды и различные комбинации перечисленных низкомолекулярных микробных и растительных соединений [6].

Эффективным подходом в решении проблем улучшения здоровья населения является разработка биопродуктов на молочной основе с использованием метабиотиков. Следует также отметить, что селендефицитные состояния по-прежнему остаются актуальной и во многих отношениях не решённой проблемой медицины. Недостаток селена в организме человека приводит ко многим негативным последствиям. В условиях дефицита селена кислород воздуха через свои активные формы разрушает в организме человека большинство витаминов, нарушает деятельность систем детоксикации и деятельность иммунной системы. Кроме того, в условиях дефицита селена иммунная система человека теряет свою агрессивность по отношению к болезнетворным микроорганизмам и раковым клеткам, которые могут находиться в организме каждого человека [7].

Поэтому целью нашего исследования являлась разработки биотехнологии кисломолочного плавленого сыра с использованием метабиотиков. В качестве метабиотиков использовался созданный нами микробный консорциум на молочной основе с использованием отечественных пробиотических молочнокислых, пропионовокислых бактерий и селена.

Из молочнокислых бактерий использовались отечественные заквасочные культуры *Streptococcus salivarius thermophilus, Lactobacillus delbrukii subsp. bulgaricus*, синтезирующие ферменты, витамины, органические кислоты, вещества и сдерживающие рост болезнетворных бактерий. Для получения микробного консорциума также была использована биологически активная добавка к пище «Селенпропионикс» (МИП «Бифивит», г. Улан-Удэ), которая состоит из концентрированной биомассы пропионовокислых бактерий *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* и селен в биодоступной органической форме. Известно, что пропионовокислые бактерии приживаются в желудочно-кишечном тракте человека и восстанавливают его нормальную микрофлору, обладают антимутагенными свойствами, синтезируют антиоксидантные ферменты, такие как пероксидаза, каталаза, супероксиддисмутаза, которые усиливают профилактические действия биологически активной добавки, синтезируют высокое количество витамина B_{12}. Пропионовокислые бактерии также синтезируют высокое количество серосодержащих аминокислот: метионин и цистеин, с которыми селен связывается и переходит в органическую биодоступную форму. По данным производителя, БАД к пище «Селенпропионикс» укрепляет иммунную систему, улучшает работу желудочно-кишечного

тракта, устраняет дисбактериоз, защищает организм человека от сердечно-сосудистых заболеваний, обладает противовоспалительными свойствами, помогает при артрите, замедляет процесс старения организма, выводит из организма ионы тяжелых металлов, способствует предупреждению роста аномальных клеток, предохраняет от возникновения онкологических заболеваний, поддерживает нормальную работу поджелудочной и щитовидной железы, печени и репродуктивную функцию, разрушает вредные для организма вещества и др. [7, 8].

Оптимальные соотношения и оптимальные температурные режимы получения метабиотика – микробного консорциума на молочной основе с использованием молочнокислых бактерий и биологически активной добавки к пище «Селенпропионикс» с пропионовокислыми бактериями были установлены в ходе экспериментальных исследований. На основании результатов исследований была разработана новая биотехнология кисломолочного плавленого сыра «Сибирский» с метабиотиками, технологическая схема производства кисломолочного плавленого сыра «Сибирский» представлена на рисунке 1. Особенностью данной биотехнологии является внесение в соответствии с рецептурой созданного микробного консорциума – метабиотика в расплавленную сырную массу при $t = (85 \pm 1)$°С и механическая вработка в сырную массу без подогрева.

Приемка, подбор и оценка качества сырья для плавления
↓
Предварительная обработка и дробление сырья
↓
Подбор и приготовление солей – плавителей
↓
Составление смеси
↓
Плавление при t = (85 ± 1)°С, Р = 0,08–0,09 МПа
↓
Внесение метабиотиков в расплавленную сырную массу при t = (85 ± 1)°С и их механическая вработка без подогрева
↓
Фасование, охлаждение, упаковка, маркировка
↓
Хранение при t = (4 ± 2)° С

Рис. 1. Технологическая схема производства кисломолочного плавленого сыра «Сибирский» с метабиотиками

Основные качественные показатели кисломолочного плавленого сыра «Сибирский» с метабиотиками представлены в таблице 1.

Таблица 1. Основные качественные показатели кисломолочного плавленого сыра «Сибирский»

Наименование показателя	Характеристика	Наименование показателя	Характеристика
Массовая доля жира, %	45,0 ± 0,1	Органолептические показатели: – вкус и запах – консистенция	Хорошо выраженный вкус и аромат хорошая
Массовая доля влаги, %	54,0 ± 0,1		
Массовая доля сухих веществ, %	45,0 ± 0,1		
Массовая доля соли, %	2,0 ± 0,1		
pH	5,53 ± 0,10	Количество клеток на конец срока годности не менее, КОЕ на г: – молочнокислых бактерий – пропионовокислых бактерий	10^8 10^8
Срок хранения, сутки	40		
Показатели безопасности	соответствуют требованиям ТР ТС 033/2013		

Изученные качественные показатели как свежевыработанного, так и в процессе хранения при температуре (4 ± 2) °С кисломолочного плавленого сыра, свидетельствуют о том, что кисломолочный плавленый сыр «Сибирский» обладает хорошими органолептическими показателями, а также содержит высокое количество жизнеспособных клеток молочнокислых и пропионовокислых бактерий. Отмечена высокая стабильность и выживаемость клеток молочнокислых бактерий и пропионовокислых бактерий (10^8 КОЕ/г) в плавленом сыре в процессе длительного хранения.

При изучении атакуемости белков пищеварительными ферментами «in vitro» (табл. 2) установлена более высокая скорость переваривания белков кисломолочного плавленого сыра с использованием метабиотиков.

Таблица 2. Перевариваемость белка плавленых сыров пищеварительными ферментами «in vitro»

Исследуемый образец	Перевариваемость белков, мг тирозина на г белка		
	пепсином	трипсином	суммарная
контроль	7,2 ± 0,1	7,4 ± 0,1	14,6 ± 0,1
опытный кисломолочный плавленый сыр «Сибирский»	8,6 ± 0,1	9,1 ± 0,1	17,7 ± 0,1

В качестве контрольного образца использовали кисломолочный плавленый сыр, выработанный по традиционной технологии с использованием закваски молочнокислых бактерий.

На основании проведенных исследований разработана и утверждена нормативная документация ТУ 10.51.40–262–02068309–2019 на новый кисломолочный плавленый сыр «Сибирский». Новая биотехнология производства кисломолочного плавленого сыра может быть использована как на мини-заводах, так и на предприятиях большой сменной мощности при выработке плавленых сыров.

Внедрение нового кисломолочного плавленого сыра «Сибирский» с метабиотиками в производство позволит расширить ассортимент продуктов функционального назначения, улучшить структуру питания населения России, будет способствовать профилактике различных заболеваний, в том числе желудочно-кишечного тракта путем стимулирования естественных механизмов защиты организма человека от воздействия неблагоприятных факторов среды различной природы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шендеров, Б.А. Микробная экология человека и ее роль в поддержании здоровья. Метаморфозы. – 2014. – № 5. – С. 72–80.

2. Ардатская, М.Д. Пробиотики, пребиотики и метабиотики в коррекции микроэкологических нарушений кишечника / М.Д. Ардатская // Медицинский совет. – 2015. – № 13. – С. 94–99.

3. Шендеров, Б.А. Микроэкологическая эпигенетика стресса, заболеваний, здоровья и долголетия. – 2016. – № 1. – С. 21–28.

4. Шендеров, Б.А. Метабиотики – новая технология профилактики заболеваний, связанных с микроэкологическим дисбалансом человека / Б.А. Шендеров // Вестник восстановительной медицины. – 2017. – № 4. – С. 40–49.

5. Ардатская, М.Д. Метабиотики как естественное развитие пробиотической концепции / М.Д. Ардатская, Л.Г. Столярова, Е.В. Архипова, О.Ю. Филимонова // Трудный пациент. – 2017. – Т. 15. – № 6–7. – С. 35–39.

6. Шендеров, Б.А. Метабиотики – новая технология профилактики и лечения заболеваний, связанных с микроэкологическими нарушениями в организме человека / Б.А. Шендеров, Е.И. Ткаченко, Л.Б. Лазебник, М.Д. Ардатская, А.В. Синица, М.М. Захарченко // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2018. – № 3 (151). – С. 83–92.

7. Хамаганова, И.В. Технологические аспекты применения биологически активной добавки «Селенпропионикс» в мясной промышлености / И.В. Хамаганова, И.С. Хамагаева, Н.Н. Слепцова // Вестник ВСГУТУ. – 2011. – № 3 (34). – С. 99–104.

8. Патент № 2333655 РФ. Способ получения селенсодержащей биологически активной добавки / И.С. Хамагаева, О.С. Кузнецова. Патентообладатели ГОУ ВПО «Восточно-Сибирский государственный технологический университет», Хамагаева И.С. (RU). 2006127216/13; Заявл. 26.07.2006; Опубл. 20.09.2008.

УДК 577.152

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА КОЛБАСНЫХ ИЗДЕЛИЙ

И.С. Косенко

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Ферментные препараты позволяют ускорять технологические процессы, увеличивать выход готовой продукции, повышать ее качество, экономить сырье и улучшать его возможности в получении пищи, обеспечить природоохранные мероприятия и биологическую безопасность производств.

Опыт ряда зарубежных стран показывает высокую эффективность применения протеолитических ферментных препаратов, однако отечественное производство на сегодняшний день не достаточно развито.

Компания «Завод эндокринных ферментов» образована в феврале 1996 года на базе опытно-экспериментального производства Российской академии сельскохозяйственных наук в поселке Ржавки, Солнечногорского района, Московской области. В связи с расширением ассортимента выпускаемой продукции в 2002 году был организован филиал компании, расположенный в поселке Зеленогорский, Вышневолоцкого района, Тверской области.

Свою производственную и коммерческую деятельность «Завод эндокринных ферментов» осуществляет как в Российской Федерации, так и на территории стран СНГ. В настоящее время компания работает в двух основных направлениях, а именно:

производство ферментов животной природы для мясной и молочной промышленности;

производство экстрактов из лекарственных растений для косметической промышленности.

Завод производит ферментные препараты Протепсин и Коллагеназа

Протепсин – энзимный препарат животной природы, содержащий комплекс кислых протеиназ, предназначен для применения в мясной промышленности для обработки мясного сырья. Препарат характеризуется протеолитической активностью 50, 100, 150 ед./г, pH-и температурный оптимум действия в диапазоне pH = 5–6,5 и t = 20–45 °C.

ООО «Биопрогресс» является одним из российских производителей биопрепаратов, пищевых, кормовых добавок и других биологически активных веществ из морепродуктов, а также сырья растительного и животного происхождения. Предприятие организовано в 1991 году на базе Всероссийского научно-исследовательского и технологического института биологической промышленности РАСХН, расположенного в пос. Биокомбинат Щелковского района Московской области

Коллагеназа – протеолитический фермент, разрушающий пептидные связи в природном коллагене. Препарат ингибирует синтез металлопротеаз (эластазы, коллагеназы), предотвращая разрушение протеогликанов и коллагена хрящевой ткани. Протеолитическая активность данного препарата 100 ед./г, pH – оптимум действия 6,0–9,0, температурный оптимум -37–45 °C.

Препараты положительно проявили себя в технологиях производства различных колбасных изделий, позволили интенсифицировать технологический процесс и использовать низкосортное сырье в производстве высококачественных колбасных изделий.

Нами были разработаны модифицированные рецептуры копченых колбасных изделий с применением ферментных препаратов Коллагеназа и протепсин. На стадии посола сырья были определены оптимальные дозировки внесения препаратов. Было установлено, что оптимальная концентрация Коллагеназы составляет 1000 мг на 1 кг сырья, для Протепсина 100 мг на 1 кг сырья, а оптимальное время ферментативной обработки составляет 4 часа.

Анализ органолептических, физико-химических показателей продукции позволяет сделать вывод о высоком качестве полученных колбасных изделий.

Таким образом, применение ферментных препаратов способствует созданию малоотходных технологий, позволяет интенсифицировать технологические процессы, улучшить качество полуфабрикатов и готовой продукции, уменьшить расход сырья.

УДК 634.7

СОПОСТАВИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПЛОДОВ *СМОРОДИНЫ ЧЁРНОЙ* РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ С ВЫСОКОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Л.А. Хасанова[1], Г.Ш. Казыханова[1,2], И.В. Такиуллина[1], И.З. Галикеева[1], Д.В. Гарифуллина[2], Р.С. Кираев[2], З.М. Хасанова[1]

[1]Башкирский государственный педагогический университет имени М. Акмуллы, Уфа, Россия
[2] Филиал ФГБУ «Россельхозцентр» по Республике Башкортостан, Уфа, Россия

В настоящее время на фоне мирового тренда на здоровый образ жизни и соответственно динамично развивающегося рынка здорового питания спрос на продукты функционального назначения чрезвычайно возрос. К числу основных функций таких продуктов питания, согласно классификации Международного института наук о жизни (International Life Sciences Institute), относится защита организма человека от окислительного стресса, т. е. систематическое употребление в составе пищевых рационов функциональных продуктов питания с выраженными антиоксидантными свойствами способно нивелировать негативное воздействие окислительного стресса [2].

Значительное содержание витаминов С и Е при низкой концентрации окислительных ферментов наряду с существенным содержанием биофлавоноидов, в частности, антоцианов обеспечивает высокие антиоксидантные свойства продуктам на основе плодов *Смородины черной*. Более того, большая часть сахаров плодов *Смородины черной* представлена легкоусвояемыми моносахарами глюкозой и фруктозой, которые в сочетании с витаминами и органическими кислотами определяют их специфический вкус и соответствующие диетические и лечебно-профилактические свойства, органические же кислоты, способствуя инверсии сахарозы, в сочетании с пектинами плодов *Смородины черной* дают великолепный желирующий эффект, который также имеет важное значение при прозводстве продуктов функционального назначения [1; 3].

В связи с этим был осуществлён сопоставительный анализ плодов *Смородины чёрной* местных сортов, произрастающих на территории Республики Башкортостан, с целью подбора оптимального сырья для производства функциональных продуктов питания с высокой антиоксидантной активностью.

Исследовались плоды *Смородины чёрной* урожая 2019 г. следующих сортов: «Бобровая», «Валовая» и «Караидель» (Кушнаренковский плодопитомник Республики Башкортостан), «Черный жемчуг» и «Оджебин» (Чишминский плодопитомник Республики Башкортостан). Результаты физико-химического анализа плодов *Смородины чёрной* показали наибольшее содержание витамина С и антоцианов в плодах сорта «Валовая» (221,78 мг % и 912 мг % соответственно), наименьшее содержание витамина С в плодах сорта «Чёрный жемчуг» (163,48 мг %), а наименьшее содержание антоцианов в плодах сорта «Бобровая» (733 мг %). Максимальное количество сахаров было представлено в плодах сорта «Караидель» (6,69 %), а минимальное – в плодах сорта «Оджебин» (5,40 %). Максимальная массовая доля сухих веществ выявлена у плодов сорта «Караидель» (17,55 %), минимальная – у плодов сорта «Черный жемчуг» (14,83 %). Показатели титруемой кислотности в пересчёте на яблочную кислоту были наибольшими у плодов сорта «Бобровая» (2,30 %), наименьшими у плодов сорта «Чёрный жемчуг» (1,65 %).

Таким образом, разработка продуктов функционального назначения на основе местного плодово-ягодного сырья предполагает исследование наиболее доступных и ценных в физиологическом плане для организма человека культур, к которым, несомненно, относится широко распространенная в Российской Федерации и чрезвычайно популярная у населения *Смородина черная* (*Ribes nigrum* L.). Сопоставительный анализ сортов *Смородины черной*, произрастающей на территории Республики Башкортостан, показал, что плоды *Смородины чёрной* сорта «Валовая» являются наиболее оптимальным сырьём для производства функциональных продуктов питания с высокой антиоксидантной активностью, поскольку содержат максимальное количество витамина С и антоцианов относительно других изученных плодов местных сортов *Смородины чёрной*, таких как «Бобровая», «Караидель», «Черный жемчуг» и «Оджебин».

ЛИТЕРАТУРА

Галикеева И.З. Хасанова З.М. Хасанова Л.А. Диетические и лечебно-профилактические свойства *Смородины черной (Ribes nigrum L.)* // Вестник «БГПУ им. М. Акмуллы». – Уфа: изд-во БГПУ, 2018. – С. 30–35.

Кунакова Р.В., Зайнуллин Р.А., Хуснутдинова Э.К., Ялаев Б.И. Здоровое питание XXI века: функциональные продукты питания и нутригеномика // Вестник Академии наук РБ, 2016. – Т.21. – № 3 (83). – С. 5–14.

Мясищева, Н.В. Пищевая ценность желе из ягод черной смородины новых сортов // Новое в технологии и технике функциональных продуктов питания на основе медико-биологических воззрений: материалы IV Межд. научно-техн. конференции, Воронеж, 5–6 ноября 2014 г.: сб. статей. – Воронеж: ВГУИТ, 2014. – С. 280–282.

УДК 637.5.03:53.043

СТИМУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ СВЧ ИЗЛУЧЕНИЯ В ПРОЦЕССАХ БИОТРАНСФОРМАЦИИ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТЧАТКИ

Т.Н. Данильчук, И.Г. Кончаков

Московский государственный университет пищевых производств, Москва, Россия

Важным направлением в мясной промышленности является разработка новых видов продуктов, обладающих функциональной направленностью, имеющих улучшенные функционально-технологические характеристики и потребительские свойства. Одним из подходов для создания таких продуктов может служить внесение в рецептуру дополнительных компонентов и наполнителей, придающих готовому продукту улучшенные свойства, нехарактерные для традиционных аналогов. В последнее время в практике отечественных мясных производств все шире в качестве наполнителей применяют пищевые растительные волокна (клетчатки). Это связано их распространенностью и относительно невысокой ценой. Кроме того, согласно концепции здорового питания, пищевые волокна относятся к группе физиологически функциональных ингредиентов [1, 2]. Использование клетчаток в качестве наполнителей оказывает стабилизирующее воздействие на свойства мясных эмульсий, повышает жиро- и водоудерживающую способность, выход готового продукта, улучшает его вкусовые свойства и структуру [3–5].

В тоже время, несмотря на все полезные свойства пищевых волокон, их использование в качестве добавок в рецептуру ограничено тем фактом, что внесение чрезмерного количества клетчатки ухудшает структуру и консистенцию, негативно сказывается на вкусо-ароматических свойствах готового продукта, может вызвать расстройство желудочно-кишечного тракта при употреблении. Хотя разные авторы и производители указывают различные данные по эффективным нормам внесения пищевых волокон в мясопродукты, они сходятся на том, что оптимальное их количество должно составлять 1–2 % от массы сырья [4–7].

Значительно улучшить свойства пищевых волокон по сравнению с их нативной формой и более эффективно использовать наполнитель, не превышая при этом рекомендуемые нормы внесения, позволяет ферментативная модификация в сочетании с физическими методами воздействия [8]. В данном случае важным фактором является доза воздействия. Исследования, проведенные нами ранее, показали эффективность использования низкоинтенсивных физических воздействий в условиях, когда тепловые эффекты практически отсутствуют [8, 9].

Интересным с научной и практической точки зрения является изучение крайне низких доз теплового воздействия для модификации процессов биотрансформации пищевого сырья, в частности воздействия электромагнитного поля сверхвысокочастотного (СВЧ) диапазона.

Нагрев пищевой среды посредством воздействия на него электромагнитным полем (диэлектрический нагрев) СВЧ диапазона является одним из наиболее перспективных для мясной промышленности способов электрофизической обработки. Диэлектрический нагрев СВЧ электромагнитным полем ключевым образом отличается от нагрева объекта конвекцией или при помощи теплопроводности: элементы среды, не участвуют в переносе теплоты, а тепловой поток не является непрерывным, энергия переносится в виде электромагнитных колебаний. Теплота возникает в самих объектах нагрева при их взаимодействии с электромагнитным полем.

Цель настоящей работы: изучить возможность модификации свойств растительной клетчатки совместным действием гидролитического фермента и низких доз СВЧ излучения.

Исследовали свойства трех препаратов растительных волокон: пшеничные волокна «ВитацельWF-200», соевая клетчатка «Могуцель» и бамбуковые волокна «Уницель BF 500». Данные препараты представляют собой порошок микрокристаллической целлюлозы (МКЦ) и состоят из частиц, являющихся агрегатами микрокристаллитов целлюлозы и, в меньшей степени, гемицеллюлоз, деструктированных до «предельной» степени полимеризации. Степень очистки препаратов составляла 85–97 %. Эти препараты имеют нейтральные вкус, цвет и аромат, уникальные функционально-технологические свойства, что позволяет использовать их в технологии широкого ассортимента мясных продуктов [10].

Ферментативный гидролиз проводили в растворах препарата «Целлюлаза Ультра». Навеску волокон гидратировали в соотношении 1:7 и выдерживали в течение 30 минут. В ранее проведенных экспериментах было установлено, что использование фермента концентрацией 0,05 % является оптимальным, т. к. дает максимальное увеличение показателей влагосвязывающей (ВВС) и влагоудерживающей (ВУС) способностей, а также степени гидратации [11].

Активность целлюлазы оценивали рефрактометрически путем определения остаточных редуцирующих веществ.

Массовую долю влаги в растительной клетчатке определяли высушиванием навески при 150 ºС до постоянного веса с использованием анализатора влажности MF -50.

Водосвязывающую способность (ВСС) определяли по методу Грау (в модификации ВНИИМП), основанному на определении количества свободной и слабосвязанной влаги, выделяющейся из образца при легком его прессовании.

Влагоудерживающую способность (ВУС) растительной клетчатки устанавливали по количеству выделившейся после центрифугирования влаги при факторе разделения 1000. ВУС оценивали по количеству миллиметров сыворотки, полученной из 10 $см^3$ сгустка.

Анализ содержания жира проводили путем многократной экстракции жира на аппарате Сокслета растворителем из подсушенной навески образца с последующим удалением растворителя и высушиванием жира до постоянной массы.

Степень набухания клетчатки определяли по относительному количеству воды поглощенной за фиксированное время навеской образца.

Для проведения ферментативного гидролиза растительную клетчатку выдерживали в растворе ферментного препарата в течение 1 ч. После выдержки проводили инактивацию фермента путем нагрева колбы с клетчаткой на водяной бане при температуре 60 °С в течение 10 минут. Результаты экспериментов по биотрансформации клетчаток различного происхождения приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Функционально-технологические свойства растительных волокон до и после ферментативного гидролиза

Образец	Массовая доля влаги, %	Массовая доля минеральных веществ, %	ВУС, г/г	ЖУС, г/г	pH	Степень набухания, %
«ВитацельWF-200» (контроль)	89,90	0,003	7,6	4,6	5,4	572
ферментированная «ВитацельWF-200» (с = 0,05 %)	86,02	0,002	8,8	4,9	5,1	633
«Могуцель» (контроль)	90,70	0,002	6,2	2,8	5,7	587
ферментированная «Могуцель» (с = 0,05 %)	90,07	0,003	7,9	3,0	6,2	640
«Уницель BF 500» (контроль)	95,61	0,003	7,9	5,0	6,2	665
ферментированная «Уницель BF 500» (с = 0,05 %)	94,02	0,003	9,4	5,3	6,6	815

Таблица 2 – Функционально-технологические свойства растительных волокон до и после комплексной обработки (совместное действие фермента при с = 0,05 % и СВЧ излучения)

Образец	Массовая доля влаги, %	Массовая доля минеральных веществ, %	ВУС, г/г	ЖУС г/г	pH	Степень набухания, %
«ВитацельWF-200» (контроль)	89,90	0,003	7,6	4,6	5,4	572
«ВитацельWF-200» после комплексной обработки	71,02	0,004	10,9	5,5	5,0	742
«Могуцель» (контроль)	90,70	0,002	6,2	2,8	5,7	587
«Могуцель» после комплексной обработки	89,22	0,002	8,6	3,4	5,8	737
«Уницель BF 500» (контроль)	95,61	0,003	7,9	5,0	6,2	665
«Уницель BF 500» после комплексной обработки	90,02	0,005	11,2	6,2	6,5	885

Из таблицы 1 видно, что в нативном виде наилучшими функционально-технологическими свойствами обладают бамбуковые волокна «Уницель BF 500». Биотрансформация с использованием препарата «Целлюлаза Ультра» приводит к улучшению всех технологических показателей клетчаток: ВУС повышается в среднем на 21 %, ЖУС – на 7 %, степень набухания – на 14 %.

Для интенсификации процесса биотрансформации использовали микроволновую обработку при частоте f = 2375 МГц, мощности СВЧ воздействия 100 Вт и продолжительности 20 секунд, когда фермент имел наиболее высокую активность [11]. После этого образцы помещали в стеклянную колбу и выдерживали 1 час для гидролиза клетчатки. Далее проводили инактивацию фермента путем нагрева колбы с клетчаткой на водяной бане при температуре 60°С в течение 10 минут. Результаты исследования комплексной обработки приведены в таблице 2.

Анализ данных таблиц 1 и 2 показывает, что модификация процесса биотрансформации воздействием низких доз СВЧ излучения оказывает серьезное воздействие на функционально-технологические свойства клетчаток и приводит к повышению ВУС в среднем на 41 %, ЖУС – на 22 %, степени набухания – на 30 % относительно контроля. Относительно ферментативного гидролиза увеличение этих показателей составляет для клетчатки ВитацельWF-200 27 %, 12 %, 22 %; для клетчатки Могуцель – 14 %, 14 %, 18 %; для клетчатки Уницель BF 500 – 19 %, 15 %, 10 % соответственно.

Установить закономерность влияния модификации на водородный показатель препаратов пищевых волокон не удалось, ввиду незначительных изменений показателя в образцах до и после обработки – показатель колеблется в пределах 0,1–0,5.

Модифицированные комплексным воздействием растительные клетчатки использовали в технологии изготовления мясных полуфабрикатов. За основу была взята рецептура «Бифштекса рубленного» [12]. Замена мясного сырья на наполнитель из пищевых волокон в рубленых полуфабрикатах составляла 1,5 % при степени гидратации 1:3. Результаты физико-химических исследований «Бифштекса рубленного» с внесенным в рецептуру наполнителей из модифицированных комплексной обработкой растительных волокон свидетельствовали об увеличении ВСС фарша в среднем на 10–11 %. Результаты дегустации продукта «Бифштекс рубленый» показали, что включение в рецептуру модифицированных комплексной обработкой наполнителей оказывает минимальное влияние на такие показатели как вкус, аромат и внешний вид продукта, что можно рассматривать как преимущество этой группы добавок. В то же время, происходит заметное улучшение консистенции продукта, более равномерное распределение влаги и жира внутри продукта, что способствует уплотнению структуры фарша, повышению сочности и нежности продукта. Наилучшие результаты показывают образцы с наполнителями из модифицированных волокон «Витацель WF-200» и «Уницель BF 500».

Тема использования пищевых волокон в качестве наполнителя для мясных продуктов уже неоднократно рассматривалась в профессиональном сообществе, однако данная работа предлагает взглянуть на эту тему под другим углом: акцент делается не на сам факт внесения волокон в рецептуру продукта, а на модификацию добавки из растительных волокон новым методом, включающим в себя комбинирование гидролитического действия фермента в совокупности с низкоинтенсивным тепловым воздействием. Мясопродукты, обогащенные пищевыми волокнами, не только выполняют энергетическую и пластическую функции, но и содействуют улучшению состояния здоровья благодаря позитивному физиологическому влиянию на функционирование желудочно-кишечного тракта [2].

ЛИТЕРАТУРА

Уголев, А.М. Теория адекватного питания и трофология: учебник / А.М. Уголев. – М.: Наука, 1991. – 271 с.

Дудкин, М.С. Пищевые волокна / М.С. Дудкин, Н.К. Черно, И.С. Казанская. – К.: Урожай, 1988. – 152 с.

Бобренева, И.В. Подходы к созданию функциональных продуктов питания: Монография / И.В. Бобренева. – СПб.: ИЦ Интермедия, 2012. – 465 с.

Донова, А.К. Исследование свойств и применение препаратов клетчаток в технологии мясных продуктов: автореф. дис. на соиск. уч. степ. канд. техн. наук / А.К. Донова. – Воронеж, 2003. – 20 с.

Прянишников, В.В. Пищевые волокна и белки в мясных технологиях / В.В. Прянишников, А.В. Ильтяков, Г.И. Касьянов. – Краснодар: Экоинвест, 2012. – 200 с.

Прянишников, В.В. Пищевые волокна «Витацель» в технологии полуфабрикатов / В.В. Прянишников, В.Д. Колыхалова, Т.М. Гиро и д.р. // Современные наукоемкие технологии. – 2014. – № 11. – С. 29–30.

Зимняков, В.М. Экономико-технологические аспекты производства и переработки продукции животноводства: монография / В.М. Зимняков, И.В. Гаврюшина. – Пенза: РИО ПГСХА, 2016. – 178 с.

Данильчук, Т.Н. Модификация свойств пшеничной клетчатки совместным действием ферментации и электрического тока / Т.Н. Данильчук, Г.Г. Абдрашитова, И.А. Рогов // Пищевая промышленность. – 2015. – № 8. – С. 8–11.

Данильчук, Т.Н. Инновационные технологии переработки мясного сырья с использованием низкоинтенсивного акустического воздействия / Т.Н. Данильчук, И.А. Рогов, Г.Г. Абдрашитова // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2017. – № 7. – С. 15–17.

Аутлов, С.А. Микрокристаллическая целлюлоза: структура, свойства и области применения (обзор) / С.А. Аутов, Ю.Г. Базарнова, Е.Ю. Кушнир // Химия растительного сырья. – 2013. – № 3 – С. 33–41.

Данильчук, Т.Н. Влияние наполнителя из растительных волокон, модифицированных совместным действием целлюлазы и электромагнитного поля СВЧ диапазона, на свойства фарша в производстве мясных продуктов / Т.Н. Данильчук, Г.Г. Абдрашитова, И.Г. Кончаков // Сборник материалов участников XIII международного биотехнологического форума-выставки «Росбиотех-2019». – М.: МГУПП, 2019 – с. 57–66.

Юхневич, К.П. Сборник рецептур мясных изделий и колбас / К.П. Юхневич, А.В. Галянский. – СПб.: Наука, 1998. – 323 с.

УДК 664/663.88

ОЦЕНКА РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ИЗ *КИПРЕЯ УЗКОЛИСТНОГО* ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ЧАЕВ, ЧАЙНЫХ НАПИТКОВ И НАПИТКОВ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО НАЗНАЧЕНИЯ НА ЕГО ОСНОВЕ

Р.И. Якупова[1], Л.А. Хасанова[1], Г.Ш. Казыханова[1,2], Д.В. Гарифуллина[2], Р.С. Кираев[2], З.М. Хасанова[2]

[1] Башкирский государственный педагогический университет имени М. Акмуллы, Уфа, Россия
[2] Филиал ФГБУ «Россельхозцентр» по Республике Башкортостан, Уфа, Россия

Растительное сырье, как важный источник физиологически значимых для организма человека биологически активных веществ, широко применяется в пищевой и фармацевтической промышленности. Чрезвычайно актуально исследование доступного отечественного растительного сырья как основы для создания продуктов, в частности, чаёв, чайных напитков и напитков функционального назначения, рекомендуемых для употребления в системе здорового питания. Существенный интерес представляет заготовка *Кипрея узколистного* (*Chamerion angustifolium)* [*синонимы: Chamaenerion angustifolium* L., *Epilobium angustifolium*, Иван-чай, копорский чай, капорский чай, хаменериум узколистный] в качестве функционального ингредиента для чаёв, чайных напитков и напитков функционального назначения. Данное растение, содержащее в своём составе значительное количество биологически активных веществ, в том числе витамины, макро- и микроэлементы, широко представлено на территории Республики Башкортостан. При этом для республики весьма насущна разработка технологий круглогодичного производства чаёв, чайных напитков и напитков функционального назначения с использованием заготовленного в короткий летний период растительного сырья из *Кипрея узколистного*, что предполагает оценку данного сырья на соответствие государственным стандартам качества, в частности, по показателям влажности и экстрактивности [1–4]. В связи с чем, была осуществлена оценка качества растительного сырья из *Кипрея узколистного*, заготовленного на территории Республики Башкортостан в 2019 г., согласно ГОСТ 24027.2–80 и ГОСТ 28551–90.

Показатель влажности, который согласно ГОСТ 24027.2–80 не должен превышать 14 %, является одним из главных при оценке качества любого растительного сырья, а, в особенности, пищевого и лекарственного, используемого для производства растительных сборов, чаёв, чайных напитков и напитков функционального назначения. Определение влажности образцов листьев *Кипрея узколистного*, заготовленных на территории Учалинского и Белорецкого районов Республики Башкортостан в 2019 г., показал соответствие собранного растительного сырья ГОСТ 24027.2–80, при этом средний показатель влажности в Учалинском районе составил 6,7 %, тогда как в Белорецком районе – 10 %.

Определение водорастворимых экстрактивных веществ согласно ГОСТ 28551–90 в чаях из листьев *Кипрея узколистного*, разработанных по оригинальным технологиям в лаборатории производства и оценки качества биотехнологической продукции БГПУ им. М. Акмуллы, показало, что в чаях из листьев *Кипрея узколистного*, собранного в Учалинском районе Республики Башкортостан, содержание водорастворимых экстрактивных веществ составило 35,8 %, а в чаях из листьев *Кипрея узколистного*, собранного в Белорецком районе Республики Башкортостан, – 36,2 %, что соответствует государственным стандартам качества, согласно которым содержание водорастворимых экстрактивных веществ должно быть не менее 28–35 %.

Таким образом, растительное сырье из *Кипрея узколистного*, собранного на территории Учалинского и Белорецкого районов Республики Башкортостан в 2019 г. соответствует нормативным документам и может быть успешно использовано в производстве чаёв, чайных и функциональных напитков, равно как и для других пищевых продуктов и продуктов функционального назначения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кучеров Е.В. Дикорастущие пищевые растения и их использование. – Уфа: РИО Госкомиздата БССР, 1990. – 160 с.

2. Кучеров Е.В., Лазарева Д.Н. Целебные растения и их применение. – Уфа: Уфимский полиграфкомбинат, 1993. – 287 с.

3. Турова А.Д., Сапожникова Э.Н. Лекарственные растения СССР и их применение. – М.: Медицина, 1984. – 304 с.

4. Колесниченко В.В., Хасанова Л.А., Хасанова З.М. Биотехнологические особенности производства копорского чая на территории Республики Башкортостан / Материалы Молодежной научно-практической конференции «Современные биотехнологии» 24 января 2014 г. – Уфа: Фонд поддержки и развития науки Республики Башкортостан, 2014. – С. 33–36.

УДК 664:577.11

ПЕРЕРАБОТКА ОТХОДОВ ВОДНЫХ БИОРЕСУРСОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ БИОТЕХНОЛОГИИ

Н.Г. Строкова, Н.Ю. Зарубин, О.В. Бредихина

Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии, Москва, Россия

Одним из основных направлений деятельности рыбной отрасли России является рациональное использование сырья водного происхождения, в том числе решение проблем снижения отходов и потерь при его переработке. При существующих технологиях переработки водных биоресурсов на пищевую продукцию количество отходов от разделки составляет до 80 % или ~ 1,6 млн. т от массы среднегодового российского улова.

В настоящее время рыбные отходы в основном (до 90 %) являются сырьем для производства кормовой муки, а также рыбного жира из отходов от разделки лососевых видов рыб, трески и минтая. Использование отходов от переработки ракообразных (креветки, крабы, криль и др.) крайне ограничено и не превышает 1,0 %. Однако известно, что кожа, хрящевая ткань, кости рыб и панцирьсодержащие отходы являются высокоценным технологическим сырьем для получения биологически активных компонентов (коллаген, хондроитинсульфат, хитин и др.) и продуктов на их основе. Для выделения этих БАВ целесообразно использовать биотехнологические методы обработки сырья, позволяющие разрушить связи между белками и углеводами, и при этом сохранить нативную структуру и свойства компонентов [1–4].

Ранее в ФГБНУ «ВНИРО» разработана технология хондроитинсульфат-белкового комплекса (ХНБК) путем ферментативного гидролиза хрящесодержащих отходов от разделки акулы катран (*Squalus acanthias*) [14, 15]. Полученный по данному способу ХНБК многокомпонентен и содержит такие биологически активные вещества как гексозамины (4,30 %), хондроитинсульфаты (5,37 %), коллаген (13,90 %), неколлагеновые белки (42,40 %), минеральные вещества (4,43 %), а также свободные аминокислоты (13,10 %). Ферментативный гидролизат по составу может быть использован в качестве источника аминосахаров, коллагена, аминокислот и др. в форме биологически активной добавки к пище, а также в составе многокомпонентных пищевых систем для устранения недостатка в рационе биологически активных веществ.

Учитывая, что наиболее массовыми объектами переработки на пищевую продукцию являются промысловые виды рыб семейства тресковых и лососевых (~ 550, 17 тыс. кг / год), нами разработан биотехнологический способ переработки коллагенсодержащих отходов (кожа с чешуей, плавники, кости, хрящи, плавательные пузыри), образующихся в процессе разделки в количестве от 38,0 до 58,0 % [5, 6, 10, 11].

С целью получения коллагенсодержащих гидролизатов отходы подвергали трехкратной обработке 10 %-ным водным раствором лимонной кислоты в течение 60 мин. при постоянном перешивании. Соотношение коллагенсодержащей массы к раствору кислоты = 1 : 1. После промывания полученную массу подмораживали при температуре минус 25 °С в течение 2 ч и измельчали на волчке с диаметром отверстий решетки 2–3 мм. Гидролиз измельченной массы проводили с использованием комплекса ферментных препаратов «Коллагеназа пищевая» и «Протепсин». Эффективность гидролиза коллагенсодержащих отходов оценивали по накоплению свободного аминного азота в гидролизатах. В работе были установлены и обоснованы рациональные параметры ферментативного гидролиза предобработанных коллагенсодержащих отходов: концентрация ферментных препаратов – по 0,1 % к массе сырья; гидромодуль 1:2; продолжительность гидролиза – 5,5 ч при температуре 35 °С и постоянном перемешивании. Инактивировали комплекс ферментных препаратов при температуре 70 °С в течение 15 мин.

Полученный гидролизат концентрировали на ультрафильтрационной установке через двухслойные металлокерамические мембраны с размерами пор 0,1–0,5 мкм под давлением не менее 0,22 МПа. В результате ультрафильтрации получали два продукта: фильтрат (прозрачная жидкость с желтоватым оттенком) и концентрат гидролизата (непрозрачная масса с сероватым оттенком), который затем отправляли на лиофильную сушку, измельчали на шаровой мельнице [7, 8, 9, 13] и получали сухой коллагенсодержащий гидролизат. Выход сухого продукта составил 12 %.

Были проведены исследования по изучению показателей качества коллагенсодержащих гидролизатов (таблица 1).

Таблица 1 Показатели качества сухого коллагенсодержащего гидролизата, полученного из отходов от разделки рыб семейства тресковых (минтай, треска) и лососевых (нерка, кета, семга)

Растворимость в воде		полная
Внешний вид раствора		незначительная замутненность
pH 10 %-ного водного раствора		5,5 – 5,8
Просеивание порошка		очень быстрое
Цвет порошка		светло-серый
Запах и вкус		свойственные данному вида продукта
Энзиматическая активность порошка		отсутствует
Степень гидратации, г коллагенсодержащего гидролизата / г воды		1:4
Содержание, %	воды	4,0–6,0
	белка	73,2–75,6
	коллагена*	64,3–74,1
	жира	0,2–0,9
	золы	1,5–2,9

* – % от общего белка

В результате исследований установлено, что сухой гидролизат содержит значительное количество коллагена – до 74,1 % от общей массы белка, в связи с чем его можно рекомендовать к использованию как самостоятельную пищевую добавку (источник коллагена, аминосахаров, аминокислот), а также в качестве структурообразователя.

Для обоснования целесообразности использования полученного коллагенсодержащего гидролизата в технологиях продуктов питания, в том числе на фаршевой основе, были проведены исследования по изучению его функционально-технологических и реологических свойств (таблица 2) в гидратированном виде.

Таблица 2 – Функционально-технологические и реологические свойства гидратированных коллагенсодержащих гидролизатов из отходов от разделки рыб семейства тресковых (минтай, треска) и лососевых (нерка, кета, семга)

Показатель	Значение
ВСС, % к общей влаге	89,76 ± 3,05
ВУС, % к сух. веществу	221,49 ± 5,43
ЖУС, % к сух. веществу	292,01 ± 9,15
Пластичность, 10^{-2} см^2/г	1,11 ± 0,06
Предельное напряжение сдвига, Па	327,11 ± 5,68
Эффективная вязкость, Па·с	435,29 ± 10,66

Из данных таблицы 2 видно, что коллагенсодержащий гидролизат обладает высокими значениями влагосвязывающей (ВСС) и водоудерживающей (ВУС) способности, что является положительным фактором для его включения при формировании консистенции и структуры готового продукта. Значение предельного напряжения сдвига (ПНС) гидролизата находилось на уровне 327,11 Па. Следует отметить, что значение ПНС смеси измельченных рыбных отходов до обработки – 1534,23 Па. Эффективная вязкость гидролизата составила 434,29 Па·с и значительно снизилась по сравнению с данным показателем (2418,21 Па·с) для необработанных отходов. Снижение значений ПНС и эффективной вязкости у коллагенсодержащих гидролизатов связано с деструкцией структуры белковых компонентов и уменьшением их молекулярной массы в процессе предобработки сырья органической кислотой и ферментативного гидролиза.

Таким образом, на основании проведенных исследований можно сделать вывод, что коллагенсодержащий гидролизат, полученный из отходов от разделки рыб семейства тресковых и лососевых, обладает хорошей структурообразующей способностью, позволяющей обеспечить высокие функционально-технологические свойства многокомпонентным пищевым системам.

Следует отметить, что были проведены исследования по усовершенствованию процесса ферментативного гидролиза панцирьсодержащих отходов (ПСО) ракообразных. Белковый гидролизат получали из предварительно обезвоженных и обезжиренных согласно [12] ПСО креветок тигровых (*Penaeus monodon*) методом ферментативного гидролиза протеиназами различной природы (растительного, животного и бактериального происхождения).

Гидролиз обезжиренных ПСО проводили с помощью промышленных ферментативных препаратов протосубтилина Г20Х (активность 150 ед./мг; pH 7,0–7,5; температура оптимум 52 ºС), 2 %-ного водного раствора папаина (активность 800–900 ед./мг при pH 6,0–7,0; температура 50 ºС) и Maxazyme nnp (активность 180000,0 РС/г, pH 6,5–7,0; температура 51 ºС). Папаин является протеолитическим растительным ферментом, гидролизующим белки, пептиды, амиды и сложные эфиры основных аминокислот. Maxazyme nnp – ферментный препарат, содержащий бактериальную протеазу, полученную из отборного штамма *Bacillus Subtilis*, и используемый в пищевой промышленности.

Установленные рациональные параметры ферментативного гидролиза ПСО креветки протеиназами различной природы представлены в таблице 3. Из данных таблицы о содержании сухого вещества в гидролизате и сырого протеина в нем (44,5 % и 84,0 %, соответственно) видно, что наилучший результат получен при обработке сырья папаином.

После инактивации ферментных препаратов гидролизаты фильтровали и сушили при температуре минус 35 °С, давлении 0,250 атм. Из осадка, содержащего хитин, рекомендуется получать биополимер хитозан по традиционной технологии.

Ферментолизаты, полученные из панцирьсодержащих отходов креветок протеиназами различной природы на 80,01–83,66 % состоят из белка, содержат 10,20–14,74 % минеральных веществ и небольшое количество жира ~ 0,1 %.

Таблица 3 – Рациональные параметры ферментативного гидролиза панцирьсодержащих отходов креветки тигровой (*Penaeus monodon*) протеиназами различной природы

Показатель	Ферментный препарат		
	протосубтилин	папаин	Maxazyme nnp
Соотношение ПСО: вода	1:11		
Концентрация ферментного препарата, %	0,5	0,4	0,4
Температура, ˚С	52	50	51
Продолжительность гидролиза, ч	4	4	2
pH среды	7,5	7,0–7,5	7,0–7,5
Инактивация ферментных препаратов	90 ºС в течение 15 мин.		
Содержание сухих веществ в жидком гидролизате, % от массы ПСО	42,02	44,53	40,30
Содержание сырого протеина $N_{общ.}$ х 6,25, % на сухое вещество	80,01	83,66	80,57

Проведенные исследования аминокислотного состава гидролизатов из ПСО креветок, полученных с использованием протосубтилина и папаина, показали отсутствие принципиальных различий по содержанию заменимых и незаменимых аминокислот. Сумма незаменимых аминокислот в гидролизате из панцирьсодержащих отходов креветок, полученных с помощью протосубтилина составляет – 34,83 г./100г белка, с помощью папаина – 32,67 г./100г белка. Для определения биологической ценности исследуемых ферментолизатов проводили расчет аминокислотного скора, который показал, что в гидролизате из ПСО креветок с протосубтилином превалирует содержание изолейцина, треонина и фенилаланина + тирозина, а лимитирующими аминокислотами являются метионин + цистин и валин. В гидролизате из ПСО креветок с папаином превалируют фенилаланин + тирозин и треонин, тогда как остальные незаменимые аминокислоты являются лимитирующими по отношению к шкале ФАО/ВОЗ.

Таким образом, усовершенствованный способ получения ферментативных гидролизатов из панцирьсодержащих отходов креветок с использованием нового для данного вида сырья ферментного препарата папаина (2 %-ный раствор) позволяет получить ферментолизаты, предназначенные для кормовой и пищевой промышленности, а также микробиологии при приготовлении питательных сред, используемых для идентификации микроорганизмов.

В результате проведенных исследований обоснована возможность решения проблем переработки отходов от разделки рыб и ракообразных с применением биотехнологических методов, что позволяет получить биологически активные продукты – ферментативные гидролизаты, характеризующиеся высоким содержанием белка (до 80,0 %), состав которого представлен полным набором незаменимых и заменимых аминокислот, а также коллагеном.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андрусенко, П.И. Малоотходная и безотходная технология при обработке рыбы / Андрусенко П.И. – М.: Агропромиздат, 1988. – 112 с.

2. Антипова, Л.В. Биотехнология коллагеновых пищевых ингредиентов / Л.В. Антипова, С.А. Сторублевцев // Мясная индустрия. – 2010. – № 6. – С. 16–18.

3. Антипова, Л.В. Коллаген рыбного происхождения: свойства и перспективы применения в косметологии и медицине / Л.В. Антипова, С.Б. Болгова // Материалы 19-ой Международной Пущинской школы – конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино, 2015. – С. 5.

4. Антипова, Л.В. Коллагены: источники, свойства, применение / Л.В. Антипова, С.А. Сторублевцев. – Воронеж: ВГУИТ, 2014. – 512 с.

5. Бредихина, О.В. Научные основы производства рыбопродуктов / О.В. Бредихина, С.А. Бредихин, М.В. Новикова. – М.: КолоС, 2009. – 152 с.

6. Байдалинова, Л.С. Биотехнология морепродуктов / Л.С. Байдалинова, А.С. Лысова, О.Я. Мезенова и др. – М.: Мир, 2006. – 560 с.

7. Зарубин, Н.Ю. Получение сухих высококачественных рыбных гидролизатов с использованием вакуумной сублимационной сушки / Н.Ю. Зарубин, О.В. Бредихина, Г.В. Семёнов, И.С. Краснова // Вестник АГТУ: серия рыбное хозяйство. – 2016. – № 3. – С. 138–144.

8. Зарубин, Н.Ю. Новые данные об использовании коллагеновых гидролизатов в технологии рыбных полуфабрикатов / Н.Ю. Зарубин, Е.В. Литвинова, Ю.В. Фролова, О.В. Бредихина // Пищевая промышленность. – 2016. – № 12. – С. 21–24.

9. Зарубин, Н.Ю. К вопросу переработки жилованных отходов мясного сырья и моллюсков для получения высококачественных белковых ферментолизатов / Н.Ю. Зарубин, О.В. Бредихина, М.И. Бабурина, А.Н. Иванкин // Все о мясе. – 2019. – № 2. – С. 44–48.

10. Кильмаев, Р.Г. Исследования ферментативного гидролиза малоценного рыбного сырья в технологии получения белковых продуктов / А.А. Кильмаев, Р.Г. Разумовская // Вестник АГТУ. Сер: Рыбное хозяйство – 2007. – № 3. – 2007. – С. 120–125.

11. Лагуткина, Л.Ю. Аквакультура: приоритеты, ресурсы, технологии / Л.Ю. Лагуткина, О.Ю. Лагуткин // Рыболовство и рыбное хозяйство. – 2011 – № 3. – С. 49–56.

12. Подкорытова А.В., Строкова Н.Г., Семикова Н.В. Комплексная переработка культивируемых креветок // Тезисы докладов на Международную научно-практическую конференцию «Мировые тенденции развития аквакультуры и современные методы переработки водных биоресурсов». – М.: МВЦ «Крокус-сити ЭКСПО», 2010. – С. 72.

13. Семенов, Г.В. Вакуумная сублимационная сушка / Г.В. Семенов. – М.: ДеЛи плюс, 2013. – 264 с.

14. Сорокоумов И.М., Строкова Н.Г., Немцев С.В. и др. Хондроитинсульфат-белковый комплекс из хрящевой ткани ранозаживляющие покрытия на его основе // РЫБПРОМ. – 2010. – № 1. – С. 72.

15. Сорокоумов И.М., Ежова Е.А., Быкова В.М. и др. Хондроитинсульфат из хрящей рыб // РЫБПРОМ. – 2007. – № 3. – С. 18.

УДК 631.871

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭКСТРАКТОВ ХВОИ *PICEA ABIES* НА РАННИЕ ЭТАПЫ ОНТОГЕНЕЗА РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ *LINUM USITATISSIMUM*

Е.В. Ожимкова[1], А.И. Сидоров[1], Е.М. Короткова[2]

[1] Тверской государственный технический университет, Тверь, Россия
[2] Университет Åbo Akademi, Турку, Финляндия

Современная сельскохозяйственная биотехнология имеет ряд приоритетных направлений развития, среди которых особое место занимает производство биопрепаратов для нужд растениеводства, в частности стимуляторов роста растений. Одной из задач современного сельского хозяйства является поддержание и повышение урожайности культур для устойчивого производства востребованной плодоовощной продукции высокого качества. К сожалению, использование агрессивных минеральных удобрений, гербицидов и пестицидов приводит к существенному загрязнению почв и, как следствие, к резкому снижению их плодородия. Кроме того, загрязненные почвы представляет собой серьезную экологическую проблему и угрозу для здоровья человека. Одним из перспективных методов снижения уровня загрязнённости и восстановления почвы является фиторемедиация, эффективность которой может быть повышена, в том числе, за счет использования регуляторов роста растений. В настоящее время активно ведутся поиски новых препаратов, действие которых в малых концентрациях приводило бы к стимуляции важнейших физиолого-биохимических процессов в растительном организме. Приоритетом в этой области обладают экологически безопасные, нетоксичные фиторегуляторы и индукторы устойчивости растений [1–2]. Растительные экстракты успешно используются в современном сельском хозяйстве и в качестве регуляторов роста растений, и как эффективные биогербициды [3].

Одним из экономически обоснованных источников экологически безопасных стимуляторов растений может служить хвоя растений семейства *Pinacea*. Отходы лесозаготовки, в том числе хвоя и древесная зелень, к сожалению, в настоящее время утилизируются недостаточно эффективно, в то время они являются ценным возобновляемым сырьем для получения биопрепаратов [4].

В представленной работе исследовано влияния экстрактов хвои ели европейской на ранние этапы онтогенеза льна-долгунца (сорта «Восход», «Дипломат», «Пересвет») и льна масличного (сорта «Исток», «Norlin», «ЛМ 98»). Для проведения экспериментальной части работы семена льна были предоставлены ФГБНУ «Федеральный научный центр лубяных культур».

Все образцы хвои для экспериментов были собраны в осенний период в экологически чистой зоне Калининского района Тверской области. Для получения ростостимулирующих экстрактов из хвои ели были исследованы одно- и многокомпонентные растворители (вода и водно-этанольные смеси), также варьировались такие параметры как гидромодуль, температура и продолжительность экстракции. При анализе предварительных результатов поисковых экспериментов, а также с учетом экономических критериев и экологических требований к промышленным производствам, где использование больших объемов органических растворителей зачастую является невыгодным, для получения экстрактов из древесной зелени была выбрана вода как наиболее доступный, безопасный и довольно эффективный экстрагент. Все полученные экстракты хвои анализировались методами ВЭЖХ и хроматомасс-спектрометрии. Полученные результаты указывают на сложный характер химического состава полученных экстрактов, которые содержат органические кислоты, эфирные масла, токоферолы, полипренолы и фенольные соединения, сахара и т. д. Экспериментально установлено, что проведение экстракции растительного сырья при температуре 23 ± 0,5 °С и при гидромодуле 1:20 в темноте обеспечивает максимальный выход в раствор компонентов хвои, обеспечивающих ростостимулирующий эффект хвойного экстракта.

Для изучения влияния полученных экстрактов хвои на ранние этапы онтогенеза льна использовали различные концентрации многократного разбавленных водой экстрактов: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000. В качестве контрольных экспериментов использовали проращивание с поливом водой. Семена проращивали на фильтровальной бумаге в чашках Петри и в песчаной культуре в климатостате при температуре 22 ± 1 °С в течение 7 суток. В каждой из трех повторностей всех вариантов опыта использовали по 50 штук семян. Критериями эффективности воздействия хвойных экстрактов на развитие льна в опытах служили энергия прорастания и всхожесть семян, общая длина и сырая биомасса проростков.

Результатом проведенных экспериментов является доказательство стимулирующего действия разбавленных экстрактов хвои ели на прорастание семян и развитие побегов как льна масличного, так и льна-долгунца. Наибольший стимулирующий эффект достигается при использовании экстрактов хвои ели с разведением 1:1000 и 1:10000. В опытах с использованием экстрактов хвои ели с разведениями 1:1000 и 1:10000 отмечено увеличение всхожести семян льна на 15–18 % (по отношению к контрольным образцам), прироста средней длины ростков на 28–30 %, прироста биомассы до 25 % (по отношению к контролю).

ЛИТЕРАТУРА

1. Фатеева, Е.В. Использование новых регуляторов роста для микроразмножения растений/ Е.В. Фатеева, Г.В. Андрюшечкина // Вестник Мордовского университета. – 2013. – № 3–4. – С. 138–140

2. Effect of herbal extracts and plant growthr on photosyntheticp of soybean under waterlogged condition / P. Reshma, S. Reshma D.K Gaikwad J. Snehal // Indian Journal of Applied Research. – 2016. – Vol 6, № 1. – p. 32–33

3. Bioherbicides: Current knowledge on weed control mechanism / R. Radhakrishnana, A. Abdulaziz, A. Elsayed, F.A. Allahb //Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2018 – Vol 158 – p. 131–138

4. Оценка объемов и возможные пути использования отходов лесозаготовок на примере Красноярского края / В.И. Дитрих, А.А. Андрияс, А.И. Пережилин [и др.] // Хвойные бореальной зоны. – 2010. – № 10. – с. 346–351.

УДК 632.937.14:582.794.1

ВЛИЯНИЕ АДЬЮВАНТОВ НА ПАТОГЕННОСТЬ CALOPHOMA COMPLANATA ДЛЯ БОРЩЕВИКА СОСНОВСКОГО

Е.Л. Гасич, Л.Б. Хлопунова, А.О. Берестецкий

Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Россия

На территории ряда регионов России, прежде всего северо-западного и центрального, отмечается сильная засоренность антропогенных и естественных местообитаний борщевиком Сосновского (*Heracleum sosnowskyi* Manden). Растение содержит фуранокумарины, повышающие чувствительность кожи к ультрафиолету, что может являться причиной фотохимических ожогов. Биологические особенности этого адвентивного растения, в том числе высокая семенная продуктивность и скорость роста, наличие аллелопатических веществ, способствуют расширению ареала его произрастания и вытеснению естественно обитающих растений.

Борьба с борщевиком Сосновского в основном включает механическое удаление растений и применение химических гербицидов (The Giant Hogweed Best Practice Manual…, 2005; Якимович и др., 2018).

Одним из альтернативных способов борьбы с сорными растениями является биологический метод контроля сорняков при помощи фитопатогенных грибов. Исследований, посвященных изучению микогербицидного потенциала микромицетов довольно много, но количество коммерчески успешно применяемых микогербицидов не велико. Чаще всего это связано с недостаточной эффективностью препаратов в полевых условиях (Gressel, 2010). На эффективность микогербицидов в полевых условиях и продолжительность их хранения существенно влияет препаративная форма. В состав препаративных форм включают влагоудерживающие добавки, УФ-протекторы, прилипатели, питательные и поверхностно-активные вещества и др.

В результате изучения микобиоты борщевика Сосновского на территории Ленинградской области было идентифицировано 27 видов микромицетов, среди которых определенный микогербицидный потенциал был выявлен у *Calophoma complanata* (Tode) Q. Chen & L. Cai (Гасич и др., 2013; Гасич и др., патент РФ № 2439141). Данный вид является узкоспециализированным патогеном растений семейства *Apiaceae*. В контролируемых условиях при обработке растений борщевика мицелиальной суспензией гриба отмечалось 75 % поражение растений, в полевых условиях эффективность была значительно ниже (около 40 %). Для разработки экологически безопасного и эффективного в полевых условиях препарата в частности требуется оценка влияния различных адьювантов на патогенность инокулюма. В тоже время необходимо учитывать совместимость добавок и инфекционного материала.

Адьюванты способствуют лучшему нанесению и удержанию препарата на растениях и помогают выживанию гриба после применения. Например, сурфактанты Tween 40 и Tween 80 защищали конидии видов *Colletotrichum* от самоингибирования при высоких концентрациях инокулюма и стимулировали прорастание конидий, аналогичный эффект был выявлен у желатина в отношении изолятов *Phoma* (Zang et al., 2003). Silwet L-77 стимулировал прорастание конидий и образование апрессориев у *Coletotrichum truncatum* (Schwein.) Andrus & W.D. Moore и *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., значительно снижая продолжительность росяного периода, необходимого для заражения растений сесбании высокой и сенны туполистной в полевых условиях (Boyette et al., 2006, 2007). Полиоксиэтилен-тридециловый эфир и некоторые коммерческие адьюванты разрушали кутикулу, способствуя сильному поражению ряда сорных растений *Myrothecium verrucaria* (Alb. & Schwein.) Ditmar (= *Albifimbria verrucaria* (Alb. & Schwein.) L. Lombard & Crous (Weaver et al., 2009). Иногда адьюванты, входящие в состав коммерческих форм гербицидов, могут быть более токсичными для гриба, чем чистые гербицидные агенты, это выявлено, например, для некоторых глифосат-содержащих продуктов в отношении *Microsphaeropsis amaranthi* (Ellis & Barthol.) Heiny & Mintz и *Myrothecium verrucaria* (Smith & Hallett, 2006). Установлено, что адьюванты Score®, Agral® 90, Merge® значительно снижали прорастание конидий *Pyricularia setariae* Y. Nisik. (Peng & Byer, 2005).

Эффективность микогербицидов в сильной степени зависит от продолжительности росяного периода, в течение которого происходит прорастание конидий и инфицирование растений. Использование влагоудерживающих добавок, в том числе глицерина и растительных масел, увеличивает время сохранения инфекционной капли на листе, что способствует лучшему прорастанию инфекционных пропагул. Выявлено, что добавление 0.05 % ксантана и 0.2 % глицерина значительно увеличивало патогенность мицелия *Stagonospora cirsii* Davis для бодяка полевого (Сокорнова, 2011).

Растительные масла часто используют для создания препаратов из пропагул грибов в виде эмульсий. Например, показана высокая эффективность использования растительных масел при применении конидий *Colletotrichum orbiculare* Damm, P.F. Cannon & Crous для контроля дурнишника колючего (Auld, 1993), *C. truncatum* для сесбании высокой (Boyette, 1994), *Stagonospora* sp. для вьюнка полевого, трех видов *Alternaria* для подавления водного гиацинта (Shabana, 1997; Pfirter, Defago, 1998; El-Morsy, 2004; Dagno et al., 2011).

Нами изучено влияние 7 адьювантов (в том числе 4-х поверхностно-активных веществ (ПАВ)) на рост в чистой культуре, на прорастание конидий, а также патогенность конидий и мицелия для борщевика Сосновского штамма 32.121 *Calophoma complanata*.

Влияние ПАВ на рост штамма 32.121 *Calophoma complanata* изучали на картофельно-сахарозной агаризованной (КСА) среде с различными концентрациями испытываемых веществ. Чашки инкубировали в термостате при 24 °С в темноте. Диаметр колоний измеряли на 4, 7 и 10 сут. Для изучения влияние адьювантов на патогенность конидий и мицелия приготовляли серии разведений испытываемых веществ, к которым добавляли равные объемы конидиальной или мицелиальной суспензий, чтобы итоговая концентрация конидий составила 2 х 10^6 спор/мл, мицелия – 50 мг/мл. Для получения конидиальной суспензии штамм культивировали в течение 10 суток на перловой крупе при переменном освещении эритемными лампами, для получения мицелия – на жидкой соевой среде на роторной качалке в течение 4 суток. Высечки из листьев борщевика Сосновского выкладывали рядами в чашки Петри на увлажненную водой фильтровальную бумагу нижней стороной вверх. В центр листового диска при помощи автоматической пипетки помещали каплю чистых растворов испытуемых веществ или их комбинаций с конидиями или мицелием. Чашки инкубировали в термостате при температуре 21 °С при переменном освещении 12/12. Диаметр некрозов измеряли на 2 и 3 сут. Влияние адьювантов на прорастание конидий оценивали путем проращивания конидий в разведениях испытываемых веществ. По 5 капель разведений испытываемых веществ с конидиями наносили на предметные стекла, которые помещали в чашки Петри на увлажненную водой фильтровальную бумагу, чашки инкубировали при приведенных выше условиях. Предметные стекла просматривали под микроскопом через 20 часов и фотографировали конидии в 5 полях зрения, подсчитывали долю проросших конидий, в каждом поле зрения учитывали 20 конидий. Для определения средней длины ростковых трубок у проросших конидий в каждом поле зрения делали промеры ростковых трубок у не менее 10 конидий. Во всех опытах использовали следующие концентрации (в таблицах указаны цифрами 1, 2, 3, 4, 5) адьювантов: Тренд 90 (0.2, 0.1, 0.05, 0.025. 0.0125 %), Сильвет Голд (0.1, 0.05, 0.025, 0.0125, 0.00625 %), Био Пауэр (0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125 %), Амиго Стар (0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025 %), кукурузная мука, глицерин, нерафинированное подсолнечное масло (20, 10, 5, 2.5, 1.25 %).

Замедление роста колоний штамма 32.121 *Calophoma complanata* отмечалось при всех концентрациях ПАВ. Наибольшее замедление роста колоний выявлено в варианте с Амиго Стар, при наименьшей используемой концентрации диаметр колоний на 7 сутки достигал около 50 % от контроля. При добавлении Тренд 90 и Сильвет Голд в концентрации ≤ 0.025 % размер колоний превышал 85 % от контроля, а Био Пауэр в концентрации 0.03125–0.0625 % – 95 % (таблица 1).

Количество проросших конидий по отношению к контролю снижалось при всех концентрациях ПАВ. Сравнительно высокий процент проросших конидий (более 70 %) отмечался в вариантах со следующими концентрациями: Тренд 90 – 0.0125–0.025 %, Био Пауэр – 0.03125 %, Амиго Стар – 0.025–0.1 %, Сильвет Голд – 0.00625–0.1 %. Добавление глицерина, кукурузной муки и растительного масла в изученных концентрациях не приводило к снижению количества проросших конидий по сравнению с контролем (таблица 2).

Все ПАВ (кроме 0.025 % Амиго Стар) уменьшали длину ростковых трубок конидий. При всех испытанных концентрациях глицерина и растительного масла длина ростковых трубок конидий была сравнима с контролем. Добавление кукурузной муки в несколько раз увеличивало длину ростковых трубок, наибольшее увеличение длины (в 3 раза) отмечено при концентрации 1.25–5 % (таблица 3).

Таблица 1. Влияние ПАВ на рост колоний штамма 32.121 *Calophoma complanata*.

ПАВ	Диаметр колоний (мм) на КСА с различными концентрациями ПАВ на 7 сут (% от контроля). В контроле – 81.0 ± 0.6 мм.				
	1	2	3	4	5
Тренд 90	14.1 ± 0.3* (17.4)	22.3 ± 0.8 (27.5)	51.0 ± 1.2 (63)	68.7 ± 1.0 (84.8)	68.6 ± 1.0 (84.7)
Сильвет Голд	34.7 ± 2.0 (42.8)	43.7 ± 0.4 (53.9)	68.7 ± 0.6 (84.8)	75.0 ± 1.1 (92.6)	75.3 ± 0.7 (93)
Био Пауэр	15.0 (18.52)	24.4 ± 0.2 (30.2)	49.1 ± 1.2 (60.6)	78.2 ± 0.7 (96.5)	77.3 ± 1.4 (95.5)
Амиго Стар	29.2 ± 0.8 (36.0)	28.2 ± 0.4 (34.8)	28.7 ± 0.6 (35.4)	32.8 ± 0.9 (40.4)	40.8 ± 0.8 (50.4)

* – ошибка средней

Таблица 2. Влияние различных концентраций адьювантов на прорастание конидий штамма 32.121 *Calophoma complanata*.

Адьювант	Количество проросших конидий (%) при различных концентрациях адьювантов. В контроле – 97.0 ± 2.1 %.				
	1	2	3	4	5
Тренд 90	2.0 ± 1.3	20.0 ± 6.8	49.0 ± 6.6	68.0 ± 5.7	74.0 ± 3.4
Сильвет Голд	81.0 ± 2.3	80.0 ± 3.0	79.0 ± 3.5	79.0 ± 3.5	78.0 ± 4.2
Био Пауэр	9.0 ± 4.6	7.0 ± 2.6	19.0 ± 3.5	56.2 ± 10.7	79.0 ± 4.8
Амиго Стар	10.0 ± 5.4	49.0 ± 5.7	88.0 ± 3.3	83.0 ± 3.4	87.0 ± 3.3
Кукурузная мука	98.6 ± 1.4	99.0 ± 1.0	99.0 ± 1.0	99.0 ± 1.0	100
Глицерин	89.0 ± 3.5	85.0 ± 2.2	93.0 ± 3.0	82.0 ± 4.9	89.0 ± 3.1
Растительное масло	97.0 ± 1.5	98.0 ± 1.3	93.0 ± 2.6	96.0 ± 2.2	93.0 ± 1.5

В большинстве вариантов не выявлено существенного влияния ПАВ, глицерина, растительного масла на патогенность *Calophoma complanata*. Уменьшение размеров некрозов отмечено в вариантах с добавлением 0.2 % Тренд 90 и 0.25–0.5 % Био Пауэр. Обнаружено стимулирующее действие кукурузной муки на патогенность конидий, диаметр некроза на 3 сут достигал – 4.4–7.6 мм, в зависимости от концентрации (в контроле – <1).

В состав препаративных форм на основе конидий штамма 32.121 *Calophoma complanata* могут включаться: Амиго Стар (≤ 0.025 %), растительное масло, глицерин, кукурузная мука; данные вещества не снижают прорастание конидий. Обнаружено стимулирующее действие кукурузной муки на патогенность конидий, оптимальная концентрация составила 5 %.

В состав препаративных форм на основе мицелия могут входить: Тренд 90 и Сильвет Голд (≤ 0.025 %), Био Пауэр (≤ 0.03125 %); данные вещества в указанных концентрациях не снижают рост и патогенность мицелия.

Таблица 3. Влияние различных концентраций адьювантов на длину ростковых трубок конидий штамма 32.121 *Calophoma complanata*.

Адьювант	Средняя длина ростковых трубок конидий (мкм) при различных концентрациях адьювантов. В контроле – 31.3 ± 4.6 мкм.				
	1	2	3	4	5
Тренд 90	0	10.6 ± 1.3	9.0 ± 0.5	18.7 ± 7.5	15.6 ± 0.9
Сильвет Голд	12.0 ± 0.7	20.3 ± 2.7	16.8 ± 1.8	20.2 ± 1.9	16.6 ± 1.5
Био Пауэр	8.3 ± 0.6	6.6 ± 0.5	6.2 ± 0.4	9.2 ± 0.4	16.0 ± 1.0
Амиго Стар	15.0 ± 0.7	13.5 ± 0.7	22.1 ± 0.8	18.0 ± 0.8	56.4 ± 2.9
Кукурузная мука	71.9 ± 3.8	78.9 ± 4.2	94.9 ± 4.1	86.0 ± 3.5	98.3 ± 4.3
Глицерин	26.7 ± 2.3	34.8 ± 2.7	32.5 ± 3.0	25.6 ± 3.1	33.8 ± 4.0
Растительное масло	39.9 ± 3.3	38.9 ± 3.5	20.7 ± 1.3	25.1 ± 2.0	31.3 ± 3.4

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 16–16–00085.

ЛИТЕРАТУРА

Гасич Е.Л., Берестецкий А.О., Хлопунова Л.Б. Микобиота видов Heracleum на территории северо-западного региона Российской федерации и микромицеты, перспективные для контроля Heracleum sosnowskyi // Микология и фитопатология 2013. 47 (5): 333–342.

Гасич Е.Л., Хлопунова Л.Б., Берестецкий А.О., Сокорнова С.В. Штамм гриба Phoma complanata (Tode) Desm. 1.40 (ВИЗР), обладающий микогербицидной активностью против борщевика Сосновского / Пат. 2439141 Российская Федерация, МПК C 12 № 1/14, A 01 № 63; ФГБНУ ВИЗР, заявл. 06.10.10; опубл. 10.01.12.

Сокорнова С.В. Биологическое обоснование создания микогербицида на основе фитопатогенного гриба Stagonospora cirsii. Автореф. канд. диссертации. 2011.

Якимович Е.А., Шкляревская О.А., Пекутько С.А., Ницевич С.А. Гербициды против борщевика Сосновского // Наше сельское хозяйство. 2018. Октябрь. 2–19.

Auld B.A. Vegetable oil suspension emulsions reduce dew dependence of a mycoherbicide //Crop Protection. 1993. 12(6): 477–479.

The Giant Hogweed Best Practice Manual. Guidelines for the management and control of an invasive weed in Europe / C. Nielsen, H.P. Ravn, W. Nentwig, M. Wade //Forest and Landscape Denmark, Hoersholm. 2005. 44 p.

Boyette C.D. Unrefined corn oil improves the mycoherbicidal activity of Colletotrichum truncatum for hemp sesbania (Sesbania exaltata) control //Weed Technology. 1994. 8: 126–129.

Boyette C.D., Reddy K.N., Hoagland R.E. Glyphosate and bioherbicide interaction for controlling kudzu (Pueraria lobata), redvine (Brunnichia ovata) and trumpetcreeper (Campsis radicans) //Biocontrol Science and Technology. 2006. 16: 1067–1077.

Boyette C.D., Hoagland R.E., Weaver M.A. Biocontrol efficacy of Colletotrichum truncatum for hemp sesbania (Sesbania exaltata) is enhanced with unrefined corn oil and surfactant //Weed Biology and Management. 2007. 7: 70–76.

Dagno K., Lahlali R., Diourté M. & Jijakli M.H. Production and oil-emulsion formulation of Cadophora malorum and Alternaria jacinthicola, two biocontrol agents against water hyacinth (Eichhornia crassipes) //Afr. J. Microbiol. Res. 2011. 5: 924–929.

El-Morsy E.M. Evaluation of microfungi for the biological control of water hyacinth in Egypt //Fungal Diversity. 2004. 16: 35–51.

Peng G., Byer K.N. Interactions of Pyricularia setariae with herbicides for control of green foxtail (Setaria viridis) //Weed Technology. 2005. 19: 589–598.

Pfirter H.A., Defago G. The potential of Stagonospora sp. as a mycoherbicide for field bindweed //Biocontrol Science and Technology. 1998. 8: 93–101.

Shabana Y.M., 1997. Formulation of Alternaria eichhorniae, a mycoherbicide for water hyacinth, in invert emulsions averts dew dependence //J. Plant Dis. Prot. 104: 231 – 238.

Smith D.A., Hallet S.G. Interactions between chemical herbicides and the candidate bioherbicide Microsphaeropsis amaranthi // Weed Science. 2006. 54: 532–537.

Weaver M.A., Jin X., Hoagland R.E., Boyette C.D. Improved bioherbicidal efficacy by Myrothecium verrucaria via spray adjuvants or herbicide mixtures //Biological Control. 2009. 50: 150–156.

Zhang W., Wolf T.M. Bailey K.L., Mortensen K., Boyetchko S.M. Screening of adjuvants for bioherbicide formulations with Colletotrichum spp. and Phoma spp. //Biological Control. 2003. 26:95–108.

УДК 663.531

КАЧЕСТВЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЗЕРНОВЫХ ЗАТОРОВ, ОСАХАРЕННЫХ ФЕРМЕНТАМИ ГЛУБИННОЙ КУЛЬТУРЫ И СОЛОДА

М.Б. Хоконова, О.К. Цагоева

Кабардино-Балкарский государственный аграрный университет им. В.М. Кокова, Нальчик, Россия

Ферменты плесневых грибов и бактерий в ближайшее время находят широкое применение на спиртовых заводах, перерабатывающих крахмалистое сырье [4].

По характеру технологического процесса спиртовое производство является биохимическим, так как основано на действии ферментов солода, катализирующих гидролиз крахмала с образованием простых сахаров, которые посредством дрожжей превращаются в этиловый спирт. Ранее считалось, что ферментами являются дрожжи, вызывающие брожение [2].

Осахаривание крахмала экстрактами из проросшего зерна можно считать началом сознательного применения ферментов.

В связи с этим целью данной работы являлось изучение качественных показателей полученных заторов с использованием различных ферментов и солода в спиртовом производстве.

По мере повышения температуры реакционная способность ферментов сначала увеличивается, а затем, пройдя определенный уровень, начинает быстро снижаться [3].

Температурный оптимум ферментов амилолитического комплекса приведен в таблице 1.

Таблица 1 – Оптимальные условия жизнедеятельности ферментов

Ферменты	Оптимальные	
	pH	температура, °С
Амилаза	4,5–5,5	50
Мальтоза	4,5–4,7	58–62
Декстриназа	4,5–6,5	58–62
Суммарное действие по степени осахаривания	4,7–5,1	58–61

По полученным данным видно, что мальтоза и декстриназа относительно наиболее стабильны.

В процессе осахаривания крахмалистого сырья ферментами гриба гидролиз крахмала не заканчивается в осахаривателе, а проходит в основном во время брожения. Поэтому полнота осахаривания крахмала в осахаривателе для последующего сбраживания и выхода спирта не имеет принципиального значения.

В таблице 2 приведена активность ферментов в культурах плесневых грибов рода Aspergillus.

Таблица 2 – Активность ферментов в культурах плесневых грибов рода Aspergillus при поверхностном методе выращивания

Виды грибов	Состав среды	Активность ферментов сухой среды		
		амилазная	декстри-назная	мальтазная
Aspergillus oryzae	Пшеничные отруби	37,1	240	22
	Барда-дробина	5,1	120	3,4
Aspergillus oryzae		45	240	26
Aspergillus niger	Пшеничные отруби	1,2	300	78
Aspergillus oryzae И-475		124	665	-
Aspergillus awamori		16	400	57
Aspergillus oryzae (средние данные)	Картофельная мезга, отруби, ростки	26	283	-
Aspergillus oryzae К.С.	Пшеничные отруби	44	250	-
Aspergillus awamori		11	625	103
Aspergillus oryzae 153		43	326	33

Оптимальная (50 °С) температура осахаривания крахмалистых заторов ферментами гриба обеспечивает длительное сохранение активности амилазы и декстриназы. Дополнительная проверка показала, что повышение температуры осахаривания до 58 и даже 62 °С не ухудшает ни одного показателя брожения, но с точки зрения стерильности заторов эти температуры неравнозначны. Низкие температуры (от 50 до 55 °С) способствуют развитию инфекций и слабо влияют на процесс клейстеризации нерастворимого крахмала сырья; выше 58 °С – могут вызвать инактивацию ферментов. Поэтому принята температура осахаривания 57–58 °С, длительность брожения при этом составляет около 62 час.

Следует применять культуру с такой активностью ферментов, которая могла бы обеспечить гидролиз крахмала основного затора на 70–80 %. Некоторые авторы считают, что в производстве необходимо получить амилазу, обеспечивающую превращение не ниже 20 % растворимого крахмала в продукты гидролиза [6]. Практически установлено, что на 1 г зерна достаточно прибавлять 50 кг культуры с активностью 20 ед./г АС, а на 1 г крахмала вносится 2000 ед./кг АС и 10 ед./кг ДС, которые обеспечивают полное осахаривание крахмала сырья. Однако в производственных условиях расход поверхностной культуры фактически составлял около 7 %, по весу зерна. В зависимости от активности расход грибной культуры может колебаться в определенных пределах [1].

Состав среды играет важную роль в защите многих ферментов от инактивации, вызываемой температурой. Например, установлено, что причиной инактивации при нагревании солодовых вытяжек является коагуляция белка. Если в среде находятся сахара или пептон, то они препятствуют коагуляции и этим защищают амилазу от инактивации [5]. Но даже в течение часа и при температуре 55 °С степень осахаривания крахмала не превышает 51 % и может изменяться от концентрации вносимых ферментов. В таблице 3 дана характеристика затора, осахаренного глубинной культурой Aspergillus niger S-4 в течение 5 минут при 55 °С.

Таблица 3 – Характеристика затора, осахаренного глубинной культурой Aspergillus niger

Объем грибной культуры, %	pH	Концентрация сухих веществ, %	Мальтозы, г / 100 мл	Редуцирующих веществ, г / 100 мл	% осахари-вания
5	5,9	15,0	5,02	12,88	41
10	5,9	14,6	5,48	12,57	46
15	5,8	14,0	6,60	12,26	61

Дальнейший процесс гидролиза происходит при брожении. Следовательно, продолжительность осахаривания не влияет на конечные результаты брожения. Оптимальные условия при осахаривании заторов, необходимы не столько для обеспечения наибольшего количества продуктов гидролиза крахмала в осахаривателе, сколько для сохранения максимальной активности ферментов.

Повышение температуры от 30 до 65 °С в момент внесения в разваренную массу глубинной культуры гриба повышает скорость и улучшает показатели брожения, причем длительность контакта ферментов с субстратом должна быть минимальной. Наилучшие результаты получены при температуре 60–65 °С (табл. 4).

Таблица 4 – Качественные показатели брожения в различных температурных пределах

Показатели брожения	Температура, °С						
	30	50	55	60	65	70	75
Отброд, град	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,4
Кислотность, град.	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
pH	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1	5,0
РВ до гидролиза, г / 100 мл	0,63	0,63	0,57	0,40	0,53	0,54	0,43
РВ после гидролиза, г / 100 мл	1,66	1,53	1,63	1,61	1,56	1,60	1,60
Пентозы, %	1,22	1,12	1,25	1,19	1,18	1,18	1,03
РВ без пентоз, г / 100 мл	0,44	0,41	0,38	0,42	0,38	0,42	0,57
Остаточный крахмал, г / 100 мл	0,05	0,03	0,06	0,03	0,03	0,18	0,18
CO_2, г	11,0	11,12	11,0	11,17	11,22	10,76	10,50

Активность глубинной культуры составляла по амилазе 25 ед./100 мл, декстриназе 1650 ед./100 мл, мальтозе 215 ед./100 мл, расход культуры – 5 % к объему разваренной массы.

После разваривания сырья следует охладить массу до нужной температуры и сразу же внести небольшое количество (около 5 %, от потребного) глубинной культуры для разжижения. Остальная, наибольшая часть культуры подается в трубчатый осахариватель второй ступени, в котором масса находится 3–5 мин. при 65 °С; расход глубинной культуры 15 %, к объему бражки.

Такой режим осахаривания обеспечил хорошие технологические показатели (табл. 5); выход спирта составил 102 % к нормативному.

Таблица 5 – Качественные показатели разваренной и осахаренной массы с использованием ферментов

Разваренная масса, %		Длительность брожения, час.	Отброд, %		Кислотность, град.		РВ, г / 100 мл			Остаточный крахмал	Спирт, % об.
концентрация, %	осахаривающая способность, мл		плановый	фактический	начальная	конечная	до гидролиза	после гидролиза	за вычетом пентоз		
15,4	3,2	48	1,4	1,7	0,35	0,4	0,90	1,51	0,46	0,09	9,2
15,4	3,2	60	1,4	1,5	0,35	0,4	0,96	1,41	0,36	0,07	9,3
15,4	3,2	70	1.4	1,5	0,35	0,4	0,92	1,38	0,33	0,06	9,4

В производственных и даже лабораторных условиях активность грибной культуры колеблется в заметных пределах вследствие физиологического состояния и активности самой посевной культуры.

Состав питательной среды также не постоянен. Возникают затруднения в установлении оптимальной дозировки глубинной культуры для осахаривания сырья. Кроме того, даже увеличенный расход малоактивной культуры часто не обеспечивает хороших показателей брожения. Такое «несоответствие» сохраняется и при расходе различных культур, дозировки которых выровнены по единицам активности (табл. 6).

Таблица 6 – Норма расхода и показатели качества различных ферментных препаратов

Ферменты	Кол-во культуры, % к объему	Активность фермента, ед.	Сухое вещ-во бражки, % по сахарометру	pH	Кислотность, ° Д	РВ, г / 100 мл	РВ без пентоз, г / 100 мл	Остаточный крахмал, г / 100 мл	Выделилось CO_2, г
Амилаза		15							
Декстриназа	5	1680	1,3	5,2	0,3	1,51	0,33	0,03	11,2
Мальтаза		350							
Амилаза		37							
Декстриназа	10	1205	1,1	5,1	0,3	1,46	0,24	0,00	11,3
Мальтаза		240							
Амилаза		14							
Декстриназа	20	475	2,5	5,1	0,3	2,48	1,34	0,23	9,4
Мальтаза		83							

Если вести осахаривание той же культурой, но с активностью по амилазе 37, декстриназе 1205 и мальтазе 240 ед./100 мл в количестве 10, 15 и 20 %, то во всех трех вариантах опыта в зрелой бражке отсутствует остаточный крахмал; содержание редуцирующих веществ без пентоз по мере повышения расхода культуры соответственно снижается, а при расходе 20 % культуры редуцирующие сахара в бражке вообще отсутствуют. При указанных нормах расхода глубинной культуры гриба осахаривание проходит полно, но за 72 часа, не все сахара успевают сбродить. Осахаривание заторов при внесении 8 % глубинной культуры гриба Aspergillus usamii 45 с активностью по амилазе 56, декстриназе 2680 и мальтозе 720 ед./100 мл обеспечивает брожение по показателям (табл. 7).

Таблица 7 – Осахаривание заторов различными ферментными препаратами

Штамм гриба	Процент грибной культуры для осахаривания	Выделилось CO_2, за		Содержание спирта за		Кол-во несброженных углеводов, г / 100 мл		
						до гидролиза	после гидролиза за	
		65 час.	72 час.	65 час.	72 час.	72 час.	65 час.	72 час.
Aspergillus usamii 45		15,5	15,7	15,4	15,7	0,62	1,2	1,1
Aspergillus balatae 3859	4	14,5	14,8	14,6	15,0	0,64	2,0	1,4
Aspergillus niger S-4		14,2	14,9	13,4	14,3	0,71	2,2	1,8
Aspergillus usamii 45		15,9	16,1	15,8	16,0	0,53	1,0	1,0
Aspergillus batatae 3859	8	15,0	15,5	14,8	15,5	0,62	1,8	1,2
Aspergillus niger S-4		14,5	14,7	14,8	15,3	0,62	1,9	1,1
Aspergillus usamii 45		15,6	16,4	16,4	16,5	0,53	0,9	0,8
Aspergillus batatae 3859	12	14,9	15,5	15,5	15,8	0,58	1,4	1,1
Aspergillus niger S-4		14,4	15,1	14,8	15,5	0,60	1,4	1,2

Хорошие результаты получены при осахаривании за 72 часа и при расходе 4 % глубинной культуры.

Сопоставление результатов сбраживания зерновых заторов, осахаренных ферментами глубинной культуры и солода, показало преимущество ферментного комплекса микробного происхождения (табл. 8).

Таблица 8 – Показатели качества при сбраживании зерновых заторов, осахаренных ферментами глубинной культуры и солода

Источники амилазы	Внесено сбраживаемых углеводов	Выделилось CO_2	Спирт	Сухие вещ-ва бражки, % по сахарометру	Сахар-глюкоза		Остаточный крахмал
					без гидролиза	после гидролиза	
Культура Aspergillus niger (25 %)	31,8	14,8	15,2	0,4	1,95	1,98	0,04
Солод (ячменный и просяной)	31,8	14,6	14,8	0,7	1,50	1,90	0,94

Все показатели брожения при использовании грибной культуры оказались относительно лучшими, чем с солодом. Ферменты грибной культуры практически полностью гидролизуют крахмал перерабатываемого сырья, в зрелой бражке его остается 0,08 %, к весу исходного сырья, а при использовании активной культуры он совершенно отсутствует. При сбраживании заторов, осахаренных солодом, содержание остаточного крахмала в зрелой бражке составляет уже 1,9 %, к весу перерабатываемого сырья.

Таким образом, микроорганизмы, как богатый источник различных ферментов, имеют огромное значение в деле совершенствования технологических процессов спиртового производства. Преимущества применения культур плесневых грибов взамен солода следующее: высвобождается кондиционное зерно, расходуемое на приготовление солода; потери крахмала, имеющие место при солодоращении, устраняются; длительность процесса выращивания гриба 42–65 час., вместо 8–10 суток для получения зеленого солода. Эффективность и целесообразность применения ферментов микробов нуждается в трех катализаторах: амилазе, мальтозе и декстриназе.

ЛИТЕРАТУРА

Балашов В.Е. Практикум по расчетам технологического оборудования предприятий бродильной промышленности [Текст]: учебник / В.Е. Балашов, И.Т. Кретов, С.Т. Антипов. – М.: Агропромиздат, 1988. – 118 с.

Качмазов Г.С. Дрожжи бродильных производств: практическое руководство / Г.С. Качмазов; – СПб.: Лань, 2012. – 224 с. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://e.lanbook.com

Спиртовая, дрожжевая и ликероводочная промышленность [Текст]: Обзорная информация / В.П. Леденев и др. Выпуск 5. – М.: АгроНИИТЭИПП, 1992. – 40 с.

Хоконова М.Б. Анализ сырья для производства пищевого спирта [Текст]: Известия Кабардино-Балкарского ГАУ / М.Б. Хоконова, А.А. Портов. – Нальчик: КБГАУ, № 1 (19), 2018. С. 45–49.

Экономические и экологические проблемы выбора технологии переработки (утилизации) отходов производства биоэтанола [Текст]: научное издание / Э.Ю. Ашхотов [и др.]. – Нальчик: Издательство М. и В. Котляровых, 2009. – 172 с.

Яровенко В.Л. Технология спирта [Текст]: учебник / В.Л. Яровенко – М.: Легкая и пищевая промышленность, 2006. – 348 с.

УДК 664.681.1

ОБОГАЩЕНИЕ ХЛЕБА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ КОМПОНЕНТАМИ МИКРОВОДОРОСЛИ

Т.Н. Тертычная[1], Л.И. Лыткина[2], Д.В. Коптев[2]

[1] Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I, Воронеж, Россия

[2] Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Одним из путей ликвидации повышения стрессоустойчивости организма человека к различным неблагоприятным факторам окружающей среды является регулярное употребление продуктов питания с улучшенным химическим составом [1]. Ведущая роль отводится разработке новых функциональных пищевых продуктов, обеспечивающих человека незаменимыми для его качественной жизнедеятельности компонентами. Группа разработанных функциональных продуктов очень обширна [2–3]. Целью работы является разработка новой рецептуры хлеба с применением порошка микроводоросли сценедесмус (Scenedesmus) с улучшенными органолептическими показателями качества (запахом и вкусом, удельным объемом, эластичным мякишем) и расширение ассортимента хлебобулочных изделий функционального назначения. Микроводоросли – уникальная группа фототрофных организмов, представленная многочисленными видами и широким ареалом распространения в природе.

Специфика метаболизма микроводорослей, связанная с продуцированием метаболитов с ценными для человека свойствами, сделала их важным объектом биотехнологии [4].

Методами математического планирования эксперимента установлено, что оптимальными дозировками внесения в рецептуру хлеба порошка из микроводоросли Scenedesmus являются 4,0–9,0 % к массе муки в тесте. Хлеб, приготовленный с применением порошка микроводоросли, имеет приятный запах и вкус, без посторонних привкусов и запахов. Корка изделий – равномерно окрашенная, коричневого цвета, мякиш – коричневый. Это достигается за счет применения рецептурных компонентов, характеризующихся повышенным содержанием моно- и дисахаридов, аминокислот и других промежуточных продуктов распада белка. При выпечке реакция меланоидинообразования протекает более интенсивно. В результате улучшаются вкус и цвет готовых изделий, усиливается их аромат.

Содержание белков в хлебе, приготовленном по предлагаемому способу, увеличилось в 1.18–1,23 раза, содержание фосфора – в 2,8–3.5 раза, кальция – в 2,22–3,23 раза, содержание клетчатки увеличилось в 1,6–2,6 раза.

На основании проведенных комплексных исследований можно рекомендовать предприятиям хлебопекарной промышленности новые рецептуры хлеба лечебно-профилактического назначения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пономарева, Е.И. Мониторинг потребительских предпочтений людей пожилого возраста на рынке хлебобулочных изделий / Е.И. Пономарева, Н.М. Застрогина, А.А. Грибоедова // Хлебопродукты. – 2014. – № 5. – С. 47–49.

2. Бессонова Л.П. Оптимизация рецептуры хлеба повышенной пищевой ценности диабетического назначения / Л.П. Бессонова, А.А. Шевцов, И.В. Мажулина, Т.Н. Тертычная // Хлебопродукты. – 2014. – № 2. – С. 36–37.

3. Shishkina A.N. Use of secondary raw material of animal products in the technology of production of bakery products based on wheat-amaranth mixture / A.N. Shishkina, M.K. Sadygova, M.V. Belova, A.N. Astashov, Z.I. Ivanova // Scientific Study and Research: Chemistry and Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry. 2019. – T.20. – № 2. – P. 303–311.

4. Патент РФ № 2650804. МПК[7] C12M 1/02 (2006.01), C12M 1/06 (2006.01), C12M 1/14 (2006.01), C12M 1/38 (2006.01), A21D 13/80 (2017.01). Аппарат для культивирования автотрофных микроорганизмов / А.В. Дранников, А.А. Шевцов, Д.В. Коптев, Т.Н. Тертычная, И.В. Мажулина, К.В. Мишинев; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО «Воронеж. гос. университет инженерных технологий». – № 2017108749; заявл. 16.03.2017; опублик. 17.04.2018. Бюл. № 11.

УДК 637.523.5

НОВЫЕ ВИДЫ ОБОЛОЧЕК В КОЛБАСНОМ ПРОИЗВОДСТВЕ

Е.П. Мирошникова, М.В. Клычкова, Ю.С. Кичко, М.Д. Романко

Оренбургский государственный университет, Оренбург, Россия

В мясоперерабатывающей отрасли, как и в других отраслях АПК, сохранение готовых продуктов питания не менее важная задача, чем их производство. Круг существующих проблем известен: изначальная бактериальная обсемененность мясного сырья, загрязнение сырья и мясных продуктов в процессе их переработки, транспортировки и хранения, высокая скорость роста микроорганизмов на продуктах переработки мяса. Тенденция к отказу от консервантов, химических добавок и антибиотиков, проблема контроля их перехода в продукт (а значит, и отклонений по токсикологическим и органолептическим показателям у продукции), достижение длительного безопасного срока хранения продукции при минимальной технологической обработке – все это требует применения новых или альтернативных методов. Одним из таковых является использование современных упаковочных материалов, в частности оболочек, устойчивых к внешним факторам. К таким оболочкам относятся полиамидные, которые имеют много достоинств и позволяют получать продукцию с длительным сроком хранения. Тем не менее, традиционно для выработки колбас высокого качества используют натуральные, искусственные белковые, вискозные, целлофановые колбасные оболочки. Спрос на них с каждым годом растет, так как увеличиваются объемы производства колбасных изделий.

В связи с этим, вопросы, связанные с изучением влияния вида колбасной оболочки на качество и срок годности готовой продукции, являются весьма актуальными. Например продолжительность хранения вареных колбас в натуральной оболочке составляет от 2-х до 5-ти суток, вареных колбас в полиамидных оболочках – от 6-ти до 60-ти суток. Различный срок хранения колбасных изделий обусловлен их группой, а также видом оболочки.

В условиях рыночной экономики и честной конкуренции для предприятий важно выпускать широкий ассортимент готовой продукции высокого качества и хороших вкусовых характеристик, а также необходимо учитывать, что качественная колбаса должна обладать привлекательным внешним видом, достигаемым за счет колбасной оболочки. В связи с этим производители вкладывают не мало сил и средств в создание достойной упаковки. Многие из них стараются сделать свою марку узнаваемой с помощью рекламы.

Цель наших исследований – сравнительный анализ оболочки нового поколения с динамической проницаемостью «Диплекс» и традиционной оболочкой «Кутизин». В соответствии с этим были поставлены следующие задачи:

– изучить качественные показатели оболочки «Диплекс»;

– сравнить функционально-технологические свойства оболочек «Диплекс» и «Кутизин» при производстве колбасных изделий

Наиболее схожими с натуральными оболочками являются коллагеновые (белковые) оболочки. Они обладают высокой проницаемостью газа, пара и дыма. Материалом для производства данного вида оболочки служат коллагеновые волокна, которые получают из среднего слоя «спилки» шкур крупного рогатого скота.

Коллагеновые (белковые) оболочки предназначены для изготовления различных видов колбасных изделий: сырокопченых, полукопченых, сыровяленых, вареных, варено-копченых, ливерных колбас и ветчин в оболочке, а также сосисок и сарделек.

От качества коллагена и химической обработки «спилка» напрямую зависит качество получаемой оболочки и ее целевое назначение на производстве. Данная оболочка имеет преимущества перед натуральными: она хорошо клипсуется, имеют фиксированную фаршеемкость, хорошую проницаемость, бактериальную чистоту и эластичность. Привлекательный вид готового продукта зависит от проведения качественной обжарки с коптильным дымом, в результате которой оболочка денатурирует, подсушивается и превращается в тонкую, сухую пленку. В результате процесса дубления коллагена коптильным дымом, мы получаем оболочку золотисто-красного цвета, которая хорошо фиксирует заданную форму и становится достаточно прочной. В результате технологических процессов и использования коллагеновой оболочки, готовый продукт приобретает привлекательный товарный вид, высокие технологические и органолептические показатели. Следует отметить, что сосисочные оболочки являются съедобными и не подлежат снятию с готового продукта.

Искусственная белковая оболочка «Кутизин», фирма-производитель «Cutisin», корпорация «DEVRO» (страна Чехия), применяется для всех видов колбасных изделий: сыровяленых, сырокопченых, варено-копченых, полукопченых, вареных колбас, сарделек и других колбасных изделий из мяса птицы. Данная белковая оболочка обладает многочисленными преимуществами, а именно:

– превосходит натуральные оболочки по эластичности, прочности и бактериальной чистоте;

– при формовке обеспечивает стабильность диаметра (обеспечивает стабильную форму колбас);

– высокая проницаемость оболочки обеспечивает проникновение в продукт ароматических веществ при копчении, также позволяет сохранить аромат изделия на протяжении всего срока хранения;

– возможность увеличения фаршеемкости при шприцевании, за счет повышенной эластичности и прочности;

– использование оболочки «Кутизин» позволяет получить замечательный, традиционный вкус колбас и «натуральный» вид продукта.

Материалом изготовления оболочки «Кутизин» служат коллагеновые волокна, выделенные в процессе обработки спилка шкуры крупного рогатого скота.

Оболочка «Диплекс» – многослойная оболочка, изготовленная из полиамида, полиолефина и адгезива (модифицированного полиэтилена). Эта оболочка предназначена для производства, упаковки, хранения и реализации всех видов полукопченых, варено-копченых и вареных колбас, вырабатываемых по технологиям, включающим копчение (обжарку с дымом).

Оболочке «Диплекс» – присущи следующие качества:

– повышенная адгезия к фаршу;

– механическая прочность, позволяющая осуществлять формование батонов с использованием высокопроизводительных автоматических и полуавтоматических клипсаторов и обеспечивающая стабильность формы и фиксированный вес батонов при высоких скоростях формовки.

термоусадочные свойства, обеспечивающие привлекательный внешний вид продукции, в первую очередь отсутствие «морщин» на готовой колбасной продукции.

физиологическая безопасность, которая связана с тем, что оболочка «Диплекс» не подвергается микробиологической порче, так как материалы, из которых она изготовлена, инертны к воздействию бактерий и плесневых грибков.

От других многослойных барьерных оболочек оболочка «Диплекс» отличается свойством динамической дымопроницаемости. Динамическая проницаемость оболочки позволяет производить продукты с традиционными органолептическими характеристиками (вкус и запах копчения), в то же время обеспечивает отсутствие потерь веса и микробиологическую стабильность колбасной продукции на протяжении длительных сроков хранения, сопоставимых со сроками годности продукции в барьерных оболочках. В настоящее время выпускается следующий ассортимент оболочек «Диплекс» (таблица 1).

Таблица 1 – Ассортимент выпускаемой оболочки «Диплекс»

Название	Описание	Диаметр
Диплекс М	Матовая оболочка, переполнение 10 %.	35–120 мм
Диплекс Т	Глянцевая оболочка, переполнение 10 %.	35–120 мм
Диплекс Р	Шероховатая оболочка (имитация вискозно-армированной оболочки), переполнение 10 %.	35–120 мм
Диплекс С – М	Матовая оболочка для формовки с сеткой или для продукции в форме шара, переполнение 20–25 %.	35–80 мм
Диплекс С – Т	Глянцевая оболочка для формовки с сеткой или для продукции в форме шара, переполнение 20–25 %.	35–80 мм

На оболочку «Диплекс» наносится одноцветная, многоцветная, полноцветная печать красками на основе летучих растворителей. Оболочка поставляется в бухтах и гофрокуклах.

Подготовка оболочки к работе. Для придания оболочке эластичности и обеспечения равномерной набивки оболочку «Диплекс» необходимо замочить. Замачивание осуществляют в питьевой воде с температурой 20 – 25 °С. Особое внимание надо обратить на то, чтобы вода попадала внутрь рукава и смачивала не только внешнюю, но и внутреннюю поверхность оболочки. Не гофрированная оболочка до замачивания нарезается на отрезки необходимой длины. Бобина при разматывании оболочки должна находиться в вертикальном положении, чтобы не были повреждены ее торцы. Гофрированную оболочку замачивают, не вынимая из сетки.

Время замачивания оболочки:

– не менее 30 минут нарезанной на отрезки;

– не менее 60 минут в гофрированном виде.

Для проведения функционально-технологических и микробиологических исследований была выполнена опытная выработка колбасы вареной «Любительская» высшего сорта (ГОСТ Р 52196–2011) с использованием оболочек «Диплекс» и «Кутизин».

В результате исследований, были выявлены отличительные особенности оболочки нового поколения в сравнении с традиционной (таблица 2)

Таблица 2 – Характеристика оболочек

Виды оболочек	
Многослойная барьерная оболочка Диплекс	Белковая оболочка Кутизин
Механическая прочность	Эластичность и прочность
Термоусадочные свойства	Стабильность диаметра
Динамическая дымопроницаемость	Паро- и газопроницаемость
Повышенная адгезия к фаршу	-
Традиционные органолептические характеристики	Традиционный вкус колбас, и «натуральный» вид продукта
Отсутствие потерь веса	-
Микробиологическая стабильность	-
Не штрикуется	-
Срок годности готовой продукции увеличивается до 60 суток	Срок годности для вареных колбас и сосисок, увеличивается до 8 суток при температуре хранения от 2 до 6 °С.
Срок годности оболочки с даты изготовления 3 года	Срок годности оболочки 12 месяцев со дня изготовления

Установлено, что контрольные и опытные образцы мясной продукции по органолептическим показателям отвечали нормативной документации: батоны с ровной чистой поверхностью, без наплыва фарша. На разрезе колбаса розовая, без пустот. Вкус свойственный данному виду продукта.

Химический состав колбасы не имел значительных отличий: содержание белка в 100 г. продукта составило 11,7–11,9 г, жира 28,6–28,8 г. Выход готовой продукции в оболочке «Диплекс» увеличился на 5,6 %.

При нарушении технологии производства колбасных изделий и санитарно-гигиенических условий производства продукты могут обсеменяться условно-патогенной и патогенной микрофлорой.

Бактериологический анализ показал, что в колбасе, изготовленной с использованием оболочки «Диплекс», количество бактерий группы кишечной палочки, сульфитредуцирующие клостридии, сальмонеллы не превышали допустимых санитарных норм в течение 60 суток, в то время как продукт, вырабатываемый в оболочке «Кутизин» подвергался микробиологической порче через 8–10 суток хранения.

По результатам проведенного опыта колбаса вареная «Любительская» высшего сорта (ГОСТ Р 52196–2011) с применением оболочки «Диплекс» имела сравнительное преимущество: органолептические характеристики улучшены, отсутствие потерь веса, а также срок хранения продлен до 60 суток, по сравнению с колбасным изделием в оболочке «Кутизин».

ЛИТЕРАТУРА

1. Топурия Г.М. Современное состояние рынка мяса и мясных продуктов // Вестник мясного производства. 2009. Вып. 62(4). С. 106–109.
2. Губер Н.Б. Биологическая ценность мясной продукции при использовании биологически активных веществ // Международный научно-исследовательский журнал. 2013. № 10–1(17). С. 96–97.
3. Поздняковский, В.М. Экспертиза мяса и мясопродуктов: Учеб. – справ. пособие. – 2-е изд., стер. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во 2002. – 526 с.
4. Кайшев, В.Г. Мясная индустрия России в 2013 году: состояние и тенденции / В.Г. Кайшев, В.В. Дойков // Мясная индустрия. – 2014. № 3. – С. 10–15.
5. Боброва, В.В. Современное состояние пищевой и перерабатывающей промышленности Оренбургской области // В.В. Боброва, П.В. Медведев. Всероссийская научно-практическая конференция «Перспективы развития пищевой промышленности России». Оренбург, 2014. – 432 с 6 Стадникова С.В., Буканова С.Ж. Использование современных оболочек в мясной промышленности/ С.В. Стадникова, С.Ж. Буканова // Мясная индустрия. – 2012. № 3. – С. 20
7. Семенова А.А. Качество и безопасность колбасных изделий / А.А. Семенова, Е.К. Туниева, Ф.В. Адылов // Мясная Индустрия, 2015. № 4. – С. 35
8. ГОСТ Р 52196–2011 Изделия колбасные вареные. Технические условия
9. ГОСТ Р 55455–2013 Колбасы варено-копченые. Технические условия
10. ГОСТ 31785 – 2012 – Колбасы полукопченые. Технические условия
11. ГОСТ Р 55456–2013 Колбасы сырокопченые. Технические условия

УДК 632.959

КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ХИТИНАЗЫ 19 СЕМЕЙСТВА ИЗ *D.CAPENSIS*

И.Г. Синельников

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

Хитиназы (КФ 3.2.1.14) – эндо-ферменты, катализирующие деградацию хитина, отщепляя хитоолигосахариды длиной от 2-х до 6-ти N-ацетилглюкозаминовых остатков. Хитиназы подразделяются на два основных семейства. Хитиназы 18 семейства являются широко изученным классом ферментов, представлены практически во всех группах организмов и обладают широким спектром физиологических функций. Грибные продуценты 18 семейства используются в сельском хозяйстве для зашиты растений от фитопатогенов и вредителей. Хитиназы 19 менее изучены, однако их потенциал как агента биоконтроля может существенно превосходить хитиназы 18 семьи, так как эволюционно они представляют собой белки иммунного ответа высших растений в ответ на заражение фитопатогенами. Хитиндеградирующая активность хитиназ определяет их практическое применение в качестве защитных агентов против патогенных организмов, таких как грибы и насекомые, что позволяет перейти к биоконтролю распространения фитопатогенов, элиминировав стадию обработки с/х растений мутагенными пестицидами.

Настоящая работа посвящена клонированию и гетерологической экспрессии хитиназы 19 семейства (GH19) из наскомоядных растений *Drosera capensis*, способных эффективно разрушать экзоскелет насекомых.

Из растений, полученных *IV vitro*, были выделены РНК и ДНК, модифицированным CTAB методом [1]. Последовательность гена хитиназы была восстановлена методом TAIL-PCR [2] и депонирована в базу данных GenBank (MK093978). Длина гена составила 2,443 п.о., включая 3 интрона. Предсказанная открытая рамка считывания состояла из 978 нуклеотидов, и была подтверждена амплификацией кодирующей последовательности с кДНК.

Белок, длиной 325 аминокислотных остатков, кодируемый полученной последовательностью, представляет собой классическую хитиназу 19 семейства имеющую двудоменную структуру и сигнальный пептид на С-концевом участке. Гетерологическая экспрессия хитиназы осуществлялась в клетках *E.coli Arctic Express (DE3)*. Полученный в виде телец включения белок, растворяли в 5М гидрохлориде гуанидина и осуществляли рефолдинг в системе глютатионов [3].

Для полученной гомогенной хитиназы температурный и pH оптимум составляли 55 °C и 4,5 соответственно. В оптимальных условиях активность хитиназы по коллоидному хитину составила 0,36 ед./мг и 0,084 ед./мг по кристаллическому. Неспецифические активности по другим полисахаридам (микрокристаллическая целлюлоза, ксилан, карбоксиметилцеллюлоза) не обнаружены.

Таким образом, в работе был осуществлен направленный поиск и клонирование хитиназ 19-ого семейства из *Drosera capensis*. Описаны первичные биохимические характеристики, определены pH и температурные оптимумы. Каталитическая активность полученной хитиназы сопоставима с гомологичными ферментами, выделенными из других растений, а также с бактериальной GH19 из *Streptomyces sp*. Совокупность характеристик полученного фермента демонстрирует актуальность дальнейшего изучения фунгицидных и фитопротекторных свойств, с целью создания биопрепаратов для контроля фитопатогенов.

ЛИТЕРАТУРА

1) Fleischmann A., Heubl G. Overcoming DNA extraction problems from carnivorous plants // An. del Jardín Botánico Madrid. 2009. Vol. 66. №. 2. P. 209–215.

2) Jia X., Lin X., Chen J. Linear and exponential TAIL-PCR: a method for efficient and quick amplification of flanking sequences adjacent to Tn5 transposon insertion sites // AMB Express. 2017. Vol. 7. №. 1. P. 195–203.

3) Moghadam M., Ganji A., Varasteh A., Falak R., Sankian M. Refolding process of cysteine-rich proteins: Chitinase as a model Rep // Biochem. Mol. Biol. 2015. Vol. 4, No. 1, P. 19–24.

УДК 664.951.039.4:665.213

О ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ УЛЬТРАЗВУКА ДЛЯ ИНТЕНСИФИКАЦИИ ПРОЦЕССА ВЫДЕЛЕНИЯ ЖИРА ИЗ ГОЛОВ ТИХООКЕАНСКИХ ЛОСОСЕВЫХ РЫБ

А.Г. Артемова, О.В. Бредихина, Р.В. Артемов, Ю.А. Баскакова

Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии, Москва, Россия

Важнейшей отличительной особенностью жиров рыб от жиров растительного происхождения и других животных является наличие в их составе биологически активных омега-3 жирных кислот, в первую очередь, эйкозапентаеновой и докозагексаеновой, которые являются незаменимыми элементами питания для человека, важнейшими средствами профилактики и лечения различных заболеваний. В среднем содержание ПНЖК омега-3 в жирах водных биоресурсов составляет 14–22 %, в отдельных случаях может достигать 60 %. [14].

Общемировой объём производства рыбного жира в 2006–2015 гг. составил 856–1104 тыс. т. с тенденцией к увеличению до 1230 тыс. т. к. 2020 г. [5, 21]. Основными странами – производителями рыбного жира в настоящее время являются Чили, Перу, США, Япония, а также страны Скандинавии. Лидерами в производстве жира являются страны Южной Америки – Чили и Перу, на долю которых приходится около 38 % от общего объема производства жира.

В Российской Федерации суммарное количество ежегодно выпускаемого отечественными предприятиями рыбного жира незначительно (3,67 тыс. т) и не превышает 0,4 % от общемирового [12, 13]. При этом его основу составляют преимущественно технический и ветеринарный жиры из водных биологических ресурсов, а необходимый при производстве БАД и лечебно-профилактических продуктов пищевой жир импортируется, в основном, из Исландии и других стран Скандинавии.

Мониторинг состояния питания населения России указывает на постоянно растущий дефицит рыбных жиров, и, как следствие, наблюдается существенное снижение показателей здоровья детского и взрослого населения [2].

Одним из перспективных видов сырья для получения жира являются вторичные продукты переработки тихоокеанских лососевых рыб (горбуши, кеты, нерки, кижуча) на рыбоперерабатывающих предприятиях, что объясняется рядом объективных причин.

Во-первых, лососевые рыбы имеют огромное промысловое значение для Российской Федерации, составляя более 11 % от среднегодового общего улова Российской Федерации [13]. Так, по данным Росрыболовства, вылов тихоокеанских лососей в РФ в 2018 г. достиг исторического рекорда – более 675 тыс. т, что почти в два раза превышает улов 2017 г. [17].

Во-вторых, при производстве предприятиями Дальнего Востока основной продукции из тихоокеанских лососей – рыбы мороженой и охлаждённой, доля отходов при обезглавливании составляет – 11,2–23,0 % [15]. Соответственно, на предприятиях при промпереработке образуется значительное количество голов лососевых рыб, которые при полной загруженности производства измельчают и сбрасывают в море. Одним из путей решения проблем комплексного использования тихоокеанских лососевых рыб и обеспечения населения уникальными по составу рыбными жирами является разработка технологии получения жира пищевого из голов лососевых рыб [2].

В-третьих, согласно данным общего химического состава головы лососевых рыб относятся к высокожирному сырью (до 15,0 %), при этом жир характеризуется высоким содержанием пигментов (например, астаксантин, эфиры лютеина), придающих ему оранжево-красную окраску [2, 20]. Биологическая ценность жира из голов лососевых рыб подтверждается высоким содержанием (до 44,2 %) полиненасыщенных жирных кислот омега-3, следовательно, он может быть использован в пищевых и фармацевтических целях [2].

В отечественной рыбной промышленности применительно к отходам рыбоперерабатывающих предприятий наибольшее распространение нашли такие методы выделения жиров как вытапливание и извлечение жира из эмульсий. Ферментативный способ разрушения жиросодержащих тканей применяется в технологиях, предусматривающих выделение жира из сырья и дальнейшее изготовление кормовой рыбной муки из обезжиренного жома [11].

Способ выделения жира посредством ферментативного гидролиза основан на разрушении жиросодержащих тканей сырья в результате воздействия протеолитических ферментов на белки. Происходит разрушение липопротеидных комплексов, что приводит к лучшему отделению жира от водно-белковой массы. Выбор ферментного препарата определяется такими факторами, как доступность цены и активность по отношению к выбранному вида сырья. Чаще всего для разрушения жиросодержащих тканей измельченных голов лососевых рыб используются ферментные препараты микробного происхождения, в частности, полученные из бактерий рода Bacillus subtilis.

Данный способ выделения жира отличается проведением процесса при относительно низкой температуре (45–50ºС), что способствует сохранению биологически активных веществ, при этом возможна обработка сырья с содержанием жира от 7 до 15 % [2, 4, 7, 11].

В ФГБНУ «ВНИРО» был разработан ферментативный способ выделения жира из голов кеты с применением ферментного препарата Maxazyme NNP DS, разрешенного для использования в пищевой промышленности. Указанный препарат содержит нейтральную протеазу, полученную из бактерий рода Bacillus subtilis. Максимальный выход жира – 69,12 % – был достигнут за счет двукратного измельчения фарша, внесении воды в количестве 40 % к массе сырья, концентрации фермента 0,13 % к массе сырья, и времени ферментирования 40 минут. Оптимальные параметры процесса ферментирования измельчённых голов кеты были подтверждены низкими значениями кислотного (1,15 мг КОН/г) и перекисного чисел (0,98 ммоль активного кислорода/кг). Также установлено, что полученный образец жира по показателям перекисного и кислотного чисел соответствует требованиям ТР ТС 040/2016, предъявляемым к пищевым жирам.

Одним из существующих на сегодняшний день подходов к решению вопросов интенсификации технологических процессов в пищевых производствах является использование физических методов обработки сырья, в частности, ультразвуковых колебаний высокой интенсивности, которые позволяют ускорить процессы химических, микробиологических и пищевых технологий [18].

Исследования отечественных и зарубежных ученых, основанные на изучении свойств и специфичности действия ультразвука на биологические объекты, доказали, что в основе ультразвуковой обработки лежит энергетическое влияние ультразвуковых колебаний на их клеточную структуру [9].

Влияние ультразвуковых колебаний на жидкие реакционные среды обусловлено эффектами кавитации, ультразвукового ветра и ультразвукового давления, причем максимальное влияние обусловлено ультразвуковой кавитацией. Ультразвуковая кавитация – возникновение в жидкости, облучаемой ультразвуковыми волнами, пульсирующих и захлопывающихся пузырьков, заполненных паром, газом или их смесью. Захлопываясь, пузырьки порождают в растворе мощные импульсы давления и ударные волны. Именно энергия, выделяемая при схлопывании этих пузырьков, приводит к ускорению технологических процессов. Количество и размер кавитационных пузырьков зависят от параметров поля – интенсивности, частоты и звукового давления и характеристик жидкости: вязкости, плотности, температуры, поверхностного натяжения и давления парогазовой смеси.

Ультразвуковые процессы лучше всего проводить в диапазоне частот от 20 до 50 кГц, поскольку активность кавитации в поле низкочастотного ультразвука значительно выше, чем в поле высокочастотных ультразвуковых колебаний [10, 16]. Кроме того, ультразвуковую обработку в основном проводят при пониженных температурах для увеличения количества кавитационных пузырьков.

Одновременно, с целью реализации явления кавитации в воде необходимо применять ультразвуковые колебания с интенсивностью 1–10 Вт/см^2. Использование ультразвука большей интенсивности способствует образованию на поверхности рабочего инструмента кавитационного облака (большого количества воздушных пузырьков), препятствующего передаче ультразвуковых колебаний в объем [19]. Кроме того, более интенсивные и длительные воздействия могут привести к перегреву биологических структур и их разрушению (денатурация белков и др.).

Физико-химическое действие ультразвука на биологические объекты, прежде всего, связано с морфологией их поверхности. Ультразвук усиливает в тканях проницаемость клеточных мембран и диффузные процессы, увеличивает интенсивность протекания ферментативных процессов, изменяет концентрацию водородных ионов в тканях, вызывает расщепление высокомолекулярных соединений. Особенно эффективен для разрушения клеток низкочастотный ультразвук (до 200 кГц) [10].

Кроме того, учеными доказано стерилизующее действие ультразвука при частоте 20 кГц и выше, при интенсивности более 0,5 Вт/см^2. Механизм стерилизующего действия ультразвука весьма сложен и раскрыт не полностью. Доказано, что основным стерилизующим фактором является кавитация [10].

В настоящее время, ультразвуковая обработка часто используется для улучшения экстракции липидов и белков из семян таких растений, как соевые бобы (мука или обезжиренная соя) или других масличных семян. В этом случае разрушение стенок клетки облегчает отжим (холодный или горячий) и тем самым снижает содержание остатков масла или жира в жмыхе.

Известен способ выделения липидов из древесной зелени пихты, где в качестве органического неполярного растворителя используют бензин. Суть метода состоит в том, что ультразвук способствует разрушению связи липидов с другими соединениями, тем самым освобождая их для выделения. Поскольку извлечение липидов происходит в эмульсии, а ультразвук способствует образованию эмульсии, озвучивание реакционной смеси увеличивает выход липидов [10].

Успешно применяют ультразвук и для повышения эффективности производства рыбной кормовой муки. Обычно образующиеся в процессе прессования при производстве рыбной муки бульоны содержат значительное количество белков и липидов. Так, в бульоне, образовавшемся при переработке 30 т сырья, содержится около 1,5 т белка и 0,5 т жира. Этот подпрессовый бульон можно упарить, а образовавшийся концентрат использовать для обогащения кормовой муки. Однако процесс упаривания подпрессового бульона не эффективен из-за пригара белковой части и периодической остановки вакуум-выпарного оборудования для очистки. Кроме того, метод упаривания весьма энергоемок. Для отделения белка и жира от жидкой среды можно использовать методы электрофлотации и электрокоагуляции, но оба эти метода требуют затрат большого количества энергии на единицу готовой продукции, в которую к тому же нередко попадает металл электродов в виде загрязняющих примесей. Этих недостатков лишен ультразвуковой метод коагуляции белков в подпрессовых бульонах. После десятиминутной обработки мощным низкочастотным ультразвуком в бульоне, выдерживаемом при 95 °С, образуются хлопья, которые быстро осаждаются. Их легко отделяют с помощью сепаратора и высушивают одним из обычных способов. Применение ультразвука позволяет без существенных дополнительных затрат на 8–10 % увеличить общий выход рыбной муки – ценной кормовой добавки в рационе сельскохозяйственных животных [8].

Следует отметить, что в рыбной муке, полученной из высокожирного сырья, содержится значительное количество жира, который, окисляясь при хранении, снижает качество продукции. Известен способ снижения содержания жира в жоме за счет добавления к нему после прессования воды в соотношении 1:4 и обработки смеси мощным ультразвуком с частотой 18–22 кГц в течение 10–15 мин. Затем жом вновь подвергается прессованию. В результате содержание жира в жоме и конечном продукте снижается с 13 до 8 %, что существенно повышает качество рыбной муки. Отделенный при этом рыбий жир также представляет собой ценную кормовую добавку [1, 16].

Известен электроимпульсный способ выделения жира из жиросодержащего сырья (мелких мезопелагических рыб с содержанием жира 14–20 %) при получении кормовой муки. Измельченное сырье предварительно нагревают до температуры 40 °С и подвергают воздействию электрического тока. В результате денатурации белков и воздействия электрического тока происходит интенсивное разрушение мембран жиросодержащих клеток и выделение из них жира. Данная технология применяется при получении БАД к пище «Гидробионол» [3]. Аналогичным образом ультразвуковая обработка жиросодержащего сырья (например, печени рыб) высокочастотными звуковыми колебаниями от 300 до 1500 кГц воздействует на молекулярную структуру белка, что приводит к разрушению мембран клеток и выходу жира в межклеточное пространство [6].

Из выше изложенного можно сделать вывод, что эффективность влияния ультразвука может быть объяснена воздействием специфических факторов, присущих ультразвуковым колебаниям: кавитационного эффекта; образования микропотоков; повышения диффузионной проницаемости ткани экстрагируемого материала, а также разрушающего действия на пограничный слой и клеточную стенку сырья.

В дальнейшем нами предусматривается проведение работы по ультразвуковой обработке ферментированных голов лососевых рыб с целью интенсификации процесса выделения жира. Будут определены рациональные параметры ультразвуковой обработки ферментолизатов: частота, интенсивность ультразвуковых колебаний, продолжительность воздействия и температура проведения процесса, для получения пищевого жира с высокой биологической ценностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акопян, В.Б. Основы взаимодействия ультразвука с «биологическими объектами» (ультразвук в медицине, ветеринарии и экспериментальной биологии) / В.Б. Акопян, Ю.А. Ершов. М.: Изд-во РГТУ им. Н.Э. Баумана, 2005. 300 с.

2. Артемова А.Г. Технология получения жир пищевого из голов лососевых рыб ферментативным способом // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2013. – С. 9–16

3. Боева Н.П. Научное обоснование комплексной технологии кормовой муки из нетрадиционных объектов промысла: автореферат диссертации доктора технических наук: 05.18.04 / Калининград. гос. техн. ун-т. – Москва, 2002. – 52 с.

4. Боева Н.П. Новые подходы к технологии пищевого рыбного жира из голов лососевых рыб рода Oncorhynchus / Н.П. Боева, М.С. Петрова, А.Г. Артемова, Ю.А. Баскакова // Труды ВНИРО: Технология переработки водных биоресурсов. – 2015. – Т.158. – С. 162–166

5. Мировое производство рыбной продукции 2007–2011 гг. (по материалам ФАО). – М.: Изд-во ВНИРО, 2016. – 68 с.

6. Патент РФ 2468072. Боева Н.П., Замылина Д.В., Харенко Е.Н., Бедина Л.Ф. Способ получения жира из печени рыб. Опубл. 27.11.2012. Бюл. № 33. Дата подачи заявки 29.06.2011

7. Патент РФ 2478695. Замылина Д.В., Боева Н.П., Сергиенко Е.В., Макарова А.М. Способ получения жира из печени рыб. Опубл. 10.04.2013. Бюл. № 10. Дата подачи заявки 22.04.2011

8. Патент РФ № 2168908. МПК А23К1/12. Способ получения кормовых добавок из растительного сырья / А.И. Коновалов, Н.А. Соснина, С.Т. Минзанова, В.Ф. Миронов, С.С. Хируг // опубл.: 20.06.2001

9. Постнов Г.М. Обоснование интенсификации посола рыбы с помощью ультразвука / Постнов Г.М. Чеканов Н.А., Червоный В.Н., Яковлев О.В. // сборник науч. Трудов 4-ой Международной научно-практ. конференции «Современные инновации в науке и технике». – Курск, 2014. – С. 334–337

10. Прутенская, Е.А. Использование ультразвука в химии и биотехнологии: учебное пособие / Е.А. Прутенская, Э.М. Сульман, М.Г. Сульман, Е.В. Селиванова. 1-е изд. Тверь: ТГТУ, 2011. 92 с.

11. Сергиенко Е.В. О возможности использования отходов переработки лососевых рыб на предприятиях Курильских островов в качестве сырья для получения пищевого жира / Е.В. Сергиенко, Н.П. Боева, А.Г. Артемова, А.И. Бочкарев // Рыбное хозяйство. – 2013. – № 2. – С. 114–118

12. Статистические сведения по рыбной промышленности России. 2014, 2015 гг. М.: ВНИРО, 2016. – 75 с.

13. Статистические сведения по рыбной промышленности России. 2015, 2016 гг. М.: ВНИРО, 2017. – 74 с.

14. Технология жиров из водных биологических ресурсов: монография. / Н.П. Боева, О.В. Бредихина, М.С. Петрова, Ю.А. Баскакова – М.: ВНИРО, 2016. -107 с.

15. Харенко Е.Н. и др. Единые нормы выхода продуктов переработки водных биологичемских ресурсов и объектов аквакультуры. Технологическое нормирование. Выпуск 6. – М.: ВНИРО, 2012. 222 с Хмелев В.Н. Применение ультразвука высокой интенсивности в промышленности /., А.Н. Сливин, Р.В. Барсуков, С.Н. Цыганок, А.В. Шалунов; Алт. гос. техн. ун-т, БТИ. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2010. – 203с.

16. Электронный ресурс: https://fishnews.ru/news / 36303 (дата обращения 10.07.2019)

17. Яковлев О.В. Применение ультразвука для интенсификации процесса посола рыбы / Яковлев О.В., Яшонков А.А. // матер. II Национальной научно-практ. конф. «Актуальные проблемы биоразнообразия и природопользования». – Симферополь, 2019. – С 540–543

18. Яричевская Н.Н. Разработка оптимальных режимов ультразвуковой обработки крабового сырья в технологии мороженой продукции / Яричевская Н.Н., Харенко Е.Н., Фомичева Л.Ф. // Труды ВНИРО: Технология переработки водных биоресурсов. – 2015. – Т.154. – С. 112–122

19. Fish meal and fish oil from salmon waste. // Eurofish Mag. – 2002. – № 5. – p. 42–43

20. Fish Oil (Anchovy, Mackerel, Sardines, Cod, Herring, Menhaden, Others) Market for Aquaculture, Animal Nutrition & Pet, Food, Pharmaceuticals Supplement & Functional Food and Other Applications: Global Industry Perspective, Comprehensive Analysis, Size, Share, Growth, Segment, Trends and Forecast, 2014 – 2020 / Zion Market Research: Obligated company. – [Electronic resource] – URL: http://www.marketresearchstore.com/report/fish-oil-market-z607 (дата обращения 05.03.2018)

УДК 66.047

ЭФФЕКТИВНОСТЬ НОВОГО ОРГАНО-МИНЕРАЛЬНОГО УДОБРЕНИЯ «АРКСОЙЛ» НА ПОСЕВАХ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

М.Г. Жариков[1], Р.Ю. Салпагаров[1], В.П. Грунская[2]

[1] ООО НПО «Эко Ойл Сервис», г. Москва, Россия
[2] Тульскоий НИИСХ – Филиал ФИЦ "Немчиновка" Тульская область, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Главная задача сельскохозяйственного производства – получение высоких урожаев зерна при минимальных затратах. Озимая пшеница является одной из самых распространенных продовольственных культур на земном шаре, ценность, зерна которой определяется высоким содержанием белков, жиров и углеводов. Для увеличения производства зерна в Нечернозёмной зоне есть все необходимые условия: этому благоприятствуют сравнительно мягкие зимы, более устойчивая увлажнённость, чем в других зонах страны и достаточное количество тепла. Традиционные технологии возделывания культуры, основанные преимущественно на использовании химико-техногенных факторов интенсификации, имеют ряд недостатков. Несмотря на значительные вложения, имеющийся потенциал культуры по продуктивности используется в недостаточной степени. Перспективным направлением совершенствования существующих технологий возделывания сельскохозяйственных культур является концепция биологизации растениеводства, которая заключается в интенсификации и максимальном использовании биологических факторов в системах земледелия.

Для повышения урожайности и получения качественного зерна большое значение имеет применение новых удобрений, содержащих не только макро- и микроэлементы, но и имеющих в своем составе витамины, аминокислоты и другие биологически активные вещества, обладающие ростостимулирующими свойствами. К таким комплексным удобрениям относятся биопрепараты линейки «Арксойл». «Арксойл ККР» и «Арксойл КНЭ» обладает ростостимулирующими и фунгицидными свойствами, подавляя рост и развитие возбудителей грибных и бактериальных заболеваний за счёт разрушения уже образовавшихся структур патогенов, также производится стимуляция иммунитета растений. Арксойл ККР и КНЭ активизирует жизнедеятельность полезного микробного сообщества на корнях растений Фиксация атмосферного азота, перевод нерастворимых форм фосфора в растворимые). Арксойл ККР и КНЭ обеспечивает эффективный обмен подвижными формами Калия, Фосфора, Марганца и Железа (причем в сбалансированном составе двух и трех валентного железа), поглощает экотоксиканты почвы. Тормозит рост плесени и грибковых поражений корневищ, улучшает структуру почв и способствует пролонгированию действия активных ингредиентов препарата, а также ряду важнейших биохимических и экологических функций влияющих на развитие растений:

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследований являются озимая пшеница отечественной селекции Московская-40. В опыте по изучению влияния «Арксойл» на продуктивность озимой пшеницы и улучшения качества зерна использовали органо-минеральные удобрения марки «Арксойл» ККР (концентрат коллоидного раствора) и «Арксойл» КНЭ (концентрат наноэмульсии). Одновременно определялось влияние удобрений на изменение содержания радионуклидов в зерне.

Цель исследований – совершенствование агротехнологии возделывания озимой пшеницы за счёт использования новых препаратов.

Для этого решались следующие задачи:

– определение влияния обработки семян и растений биопрепаратами КНЭ и ККР на рост и развитие озимой пшеницы, даты наступления фенологических фаз и продолжительность межфазных периодов;

– учет влияния обработки семян биопрепаратами на уровень урожайности и ее структуру, а также на показатели качества зерна;

– учёт влияния обработки посевов биопрепаратами на уровень содержания радионуклидов в зерне.

Схема эксперимента:

1. Контроль
2. N_{60} P_{60} K_{60} обработка семян «Арксойл» КНЭ
3. N_{60} P_{60} K_{60} обработка семян «Арксойл» ККР
4. N_{60} P_{60} K_{60} обработка растений «Арксойл» КНЭ
5. N_{60} P_{60} K_{60} обработка растений «Арксойл» ККР
6. обработка семян «Арксойл» КНЭ
7. обработка растений «Арксойл» КНЭ
8. обработка семян «Арксойл» ККР
9. обработка растений «Арксойл» ККР
10. обработка семян «Арксойл» КНЭ + N_{40} P_{40} K_{40}
11. обработка растений «Арксойл» КНЭ + N_{40} P_{40} K_{40}
12. обработка семян «Арксойл» ККР + N_{40} P_{40} K_{40}
13. обработка растений «Арксойл» ККР + N_{40} P_{40} K_{40}

Обработка семян производилась за 2–5 дней до посева: «Арксойл» КНЭ – 100г / 10 л воды на 1 т семян, «Арксойл» ККР – 80г / 10 л воды на 1 т семян. Обработка растений проводилась – три срока: 2–3 листа; кущение; колошение – начало цветение: «Арксойл» КНЭ – 75г в 200 л воды/га, «Арксойл» ККР – 90г в 200 л воды/га

Работа проводилась на полях отдела земледелия Тульского НИИСХ – филиала ФИЦ «Немчиновка» на типичном для региона глубоковыщелоченном среднесуглинистом среднегумусном чернозёме. Агротехника возделывания озимой пшеницы была общепринятой. Предшественник – чёрный пар. Семена обрабатывались «Арксойлом» перед посевом, растения обрабатывались в три срока: 1 – 2–3 листа, 2 – кущение, 3 – колошение-начало цветения.

Посев на всех вариантах был проведен протравленными семенами с помощью СН-16. Химическая прополка – с помощью опрыскивателя ОП-200 или вручную с помощью ранцевого опрыскивателя. Математическая обработка данных проводилась методом дисперсионного анализа (Доспехов Б.А., 1985).

Фенологические наблюдения проводились согласно «Наставления гидрометеостанциям и постам». На всех вариантах опыта отмечали даты массового наступления фаз развития растений: посев, всходы, третий лист кущения, прекращение вегетации, возобновление вегетации, выход в трубку, появление нижнего узла соломины над поверхностью почвы, колошение, цветение, молочная спелость, восковая спелость, полная спелость. Определение влажности почвы проводилось инструментально через каждые 10 см до метровой глубины по 8 числам ежедекадно (до восковой спелости зерна). Состояния озимой оценивалось по пятибалльной шкале (5 – отличное… 1-плохое).

Таблица 1 Дата наступления фаз развития озимой пшеницы Московская 40. Запасы продуктивной влаги (мм) 2018 г.

Фаза	Дата	Запасы продуктивной влаги, мм			
		0–5 см / 0–10 см	0–20 см	0–50 см	0–100 см
Посев	18.09	2/7	19	69	155
Всходы	28.09	0/4	15	56	138
Третий лист	14.10	21	42	107	211
Кущение	22.04	14	29	83	200
Прекращение вегетации	19.10	11/21	42	107	211
Возобновление вегетации	12.04	16	34	89	199
Нижний узел соломины	28.04	14	29	83	200
Колошение	4.06	2	6	21	61
Цветение	14.06	0	3	17	45
Молочная спелость	26.06	0	2	12	39
Восковая спелость	12.07	12	25	65	75
Полная спелость	26.07				
Уборка	5.08				

Анализ фитосанитарного состояния агроценоза проводился по основным фазам развития на каждом варианте, начиная с появления нижнего узла соломины, отмечалось наличие вредителей и степень поражения ими культуры. В начале и конце вегетации на всех вариантах определялась степень поражения пшеницы корневыми гнилями.

Перед уборкой на всех вариантах опыта определяли: общую массу надземной части растения на 1 м^2, количество продуктивных стеблей, длину колоса, количество колосков в колосе, массу колоса, массу 1000 зёрен, определялась натура зерна, доля зерна в общей надземной массе и в колосе. Растения для анализа срезали при восковой спелости на уровне почвы.

Учёт урожая был проведен сплошной, поделяночный с помощью комбайна «Winterschteiger». Учётная площадь делянки – 40 м^2. Урожай рассчитывался на стандартную влажность и стопроцентную чистоту. В зерне по общепринятым методикам определялось содержание белка и клейковины. Определение содержания радионуклидов в образцах зерна (по вариантам) проводилось в лаборатории ВНИИРАЭ γ – спектрометрическим методом на многоканальных анализаторах IN 1200 с германиевым детектором.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В связи с неблагоприятными условиями вегетационного периода 2017 года, сроки сева озимых под урожай 2018 года были сдвинуты на две недели. Сев озимой на делянках провели 18 сентября в слабо-увлажнённую почву – 2 мм продуктивной влаги в слое 0–5 см. Средняя температура воздуха была выше многолетней на 5,2°. Из-за недостатка почвенной влаги всходы появились лишь через декаду. К концу сентября на нижних листьях озимой было отмечено повреждение хлебной блохой. Третья декада сентября и первая октября по теплу были близки к многолетнем значениям – 8,8 и 6,7°, но осадков в третье декаде сентября не было, продуктивной влаги в 10 см слое почвы было всего 4 мм, в пахотном слое (0 – 20 см) – 15 мм, что недостаточно для хорошего роста и развития озимых. В первой десятидневке октября осадков выпало 93 % от нормы, запасы продуктивной влаги повысились в 0–20 см слое к концу декады до отличных – 40 мм. Прекращение вегетации отмечено 19 октября, к этому времени растения озимой пшеницы, находились в фазе 3-й лист; начало кущения отмечено у 5 % растений.

Весенние процессы начались в средний многолетний срок – 31 марта. Сход снега произошёл 9 апреля, почва к этому времени оставалась сильно промёрзшей до 37 см. Вешняя вода от таяния снега слабо впитывались почвой, поэтому на полях со слабыми склонами появились промоины, иногда глубиной до 10 – 20 см. В пониженных местах талая вода застаивалась, здесь отмечено вымокание и выпревание посевов, но процент гибели невелик: от 5 до 10.

6 апреля осуществился переход средней суточной температуры воздуха через +5°, отмечено возобновление вегетации на полях с небольшим южным уклоном, с ровной экспозицией возобновление вегетации отмечено 12 апреля, на пятидневку раньше обычного. В течение всего весеннего периода (31 марта – 29 апреля), средние температуры воздуха превышали многолетние на 1–2°, осадков выпало 32 мм, это 75 % от нормы. В последний день апреля средняя температура воздуха с опережением на 37 дней, перешла +15° – началось лето.

В начале мая отмечено поспевание почвы. Хорошее увлажнение верхнего слоя удерживалось до 15 мая, далее она стала слабоувлажнённой, а с 23 мая сухой.

Осадков в первом летнем месяце – мае, выпало всего 35,6 мм, это 79 % от нормы, а среднесуточные температуры воздуха превышали средние многолетние на 6° в первой декаде, на 2,2° – во второй и на 0,5° в третьей. Запасы продуктивной влаги под озимой пшеницей постепенно снижались и на 28 мая в метровом слое почвы они составляли 59 мм, что оценивается как плохие.

Первая декада июня была холодной и сухой. Средняя температура воздуха составила 13,2°, это на 2,9° ниже многолетней. Осадков выпало 54 % от нормы. В дальнейшем все декады вегетации имели положительную аномалию температур, с недобором осадков, лишь в третьей декаде июля осадков выпало 33,1 мм, это 114 % от многолетней величины. Достаточно влаги в почве было лишь до колошения пшеницы, т. е. закладка колоса проходила при благоприятных погодных условиях, а цветение и налив зерна при недостаточном и плохом увлажнении почвы на фоне повышенных температур.

Анализ растений в опыте показал, что в начале весенней вегетации корневой гнили не было, 23 июля, в фазу восковой спелости, на контрольном варианте количество растений с корневой гнилью – 8шт/м^2, на участке с обработкой растений ККР (вариант 9) – 8шт./м^2. Наибольшее количество растений с корневой гнилью на варианте 11 – с N_{40} P_{40} K_{40} и обработкой КНЭ растений – 16 шт./м^2. На остальных вариантах корневых гнилей не обнаружено. Можно сделать вывод: на всех делянках с обработанными семенами перед посевом ККР и КНЭ корневые гнили не образовались. На вариантах с обработкой растений ККР и КНЭ корневые гнили присутствуют (варианты 5, 7), минеральное удобрение N_{60} P_{60} K_{60} здесь роли не сыграло.

В фазу восковой спелости на всех вариантах опыта была определена структура урожая (табл. 2). Вследствие преимущества жаркой сухой погоды высота растений на всех вариантах была значительно ниже средней многолетней (108 см), на контроле она составила всего 76 см. Обработка семян и растений препаратом КНЭ практически показатель не изменила, а обработка ККР увеличила на 1–2 см. При внесении N_{60} P_{60} K_{60} высота увеличилась при обработке КНЭ на 3–4 см, ККР – на 5 см. На фоне с уменьшенным количеством N_{40} P_{40} K_{40} препарат КНЭ высоту озимой не изменил, осталась как и при полном N_{60} P_{60} K_{60} – 80–82 см но на 10 – 11 см увеличил биопрепарат ККР – 86–87 см. Следовательно, обработка семян и растений биоудобрениями ККР, КНЭ высоту растений, при сложившихся агрометусловиях не поменяло, ККР увеличило лишь на 1 – 2 см, при внесении минерального удобрения высота увеличивается, но в связи с жаркой погодой показатель выше, когда удобрения меньше.

Длина колоса на контроле 7 см, обработка семян и растений биопрепаратами ККР и КНЭ как без минеральных удобрений так и на их фоне увеличила показатель на 1–2 см. Общая масса снопа увеличивалась в сравнении с контролем (991г) на всех вариантах, наименьшее увеличение на вариантах 2 – 5 с N_{60} P_{60} K_{60} и обработкой ККР и КНЭ – 20 %; с уменьшением N_{40} P_{40} K_{40} – без применения минеральных удобрений общая масса снопа на вариантах 6–9 выросла на 29 %.

Количество продуктивных стеблей на контроле 431 шт./м^2. Применение минеральных удобрений N_{60} P_{60} K_{60} и обработка семян и растений органо-минеральными удобрениями увеличила стеблестой на 4 %, на столько же отмечено увеличение стеблей и без минеральных удобрений, варианты 10 – 13 с N_{40} P_{40} K_{40} дали лучше результаты – 9 %. Продуктивность колоса находилась в прямой зависимости от количества NPK. На контроле один колос весил 1.01 г., обработка органо-минеральными удобрениями повысила их вес на 19 %, на фоне $N4_{40}$ P_{40} K_{40} вес колоса увеличился на 23 % и стал весить 1,24 г, а фон N_{60} P_{60} K_{60} добавил колосу 31 % – 1,32 г.

Количество колосков в колосе зависело от обработки ККР и КНЭ, показатель увеличился на 20 % на фоне N_{60} P_{60} K_{60} – на 14 %, уменьшение N_{40} P_{40} K_{40} увеличило число колосков в колосе на 17 %, т. е. для получения лучших результатов достаточно обработки семян и растений биопрепаратами ККР и КНЭ.

Масса 1000 зёрен увеличилась на 5 %, в сравнении с контролем благодаря обработке органо-минеральными удобрениями ККР и КНЭ без NPK и на их фоне. Но уменьшение количества минеральных удобрений увеличило массу 1000 зёрен на 11 %. Биологическая урожайность зерна зависела от количества минеральных удобрений и обработки ККР и КНЭ, обработка лишь органо-минеральными удобрениями семян и растений (варианта 6–9) увеличила урожайность зерна на 24 %, на остальных вариантах на фоне NPK урожайность выше контрольного 33–35 %.

Таблица 2. Структура урожая озимая пшеница Московская 40, 2018 г.

Варианта	Высота стебля, см	Длина колоса, см	Общая масса снопа, г	Кол-во продуктивных стеблей, шт./м^2	Продуктсть колоса, г	Количество колосков в колосе, шт.		Кол-во зёрен в колосе, шт.	Масса 1000 зёрен, г	Биоло-гический урожай, т/га	Масса зёрна с 1 м^2, г
1.	76	7	991	431	1.01	13.2	2.5	22.9	44.3	4.37	437
2.	79	7	1176	452	1.27	14.2	2.6	27.1	47.1	5.76	576
3.	81	8	1056	440	1.34	14.7	2.3	28.8	46.6	5.91	591
4.	80	8	1227	450	1.30	16.0	2.6	28.2	46.1	5.84	584
5.	81	7	1281	447	1.36	15.3	3.1	29.6	46.1	6.09	609
6.	76	9	1448	450	1.20	16.3	1.4	25.8	46.6	5.41	541
7.	76	8	1244	460	1.20	14.9	1.7	25.5	47.1	5.53	553
8.	78	8	1240	444	1.21	15.8	1.0	25.5	47.5	5.38	538
9.	77	8	1168	446	1.19	16.4	1.3	26.2	45.5	5.32	532
10.	80	8	1408	466	1.24	15.1	1.8	25.7	48.2	5.78	578
11.	82	8	1312	480	1.21	15.6	1.4	24.4	49.7	5.82	582
12.	86	8	1292	454	1.30	15.0	2.0	26.5	48.9	5.89	589
13.	87	9	1520	472	1.22	15.9	1.5	24.9	49.1	5.78	578
среднее	79.9	7.9	1258	453	1.23	13.4	1.35	26.2	44.1	5.60	560

Главным показателем в опыте является величина урожая зерна, убранного комбайном (табл. 3). Урожай озимой пшеницы на контрольном варианте 4,52 т/га. Обработка семян и растений органо-минеральнами удобрениями ККР и КНЭ (варианты 6–9) увеличила урожайность в среднем на 13 % и составила 5,1 т/га. На фоне минерального удобрения показатель самый высокий – 22 % прибавка, урожайность в среднем (на вариантах 2–5) – 5,52 т/га. Несколько ниже прибавка урожая зерна на вариантах 10–13, где минеральных удобрений меньше на 30 %, – 20 % средняя урожайность 5,42 т/га.

Таблица 3 Урожайность озимой пшеницы Московская 40, 2018 г.

№	Вариант			Урожайность, т/га	Чистота зерна, %	Натра зерна
	NPK	Арксойл КНЭ	Арксойл ККР			
1.	контроль			4.515	99,5	797,0
2.	N_{60} P_{60} K_{60}	обработка семян		5.486	99,9	793,6
3.	N_{60} P_{60} K_{60}		обработка семян	5.520	99,9	787,5
4.	N_{60} P_{60} K_{60}	обработка растений		5.594	99,9	790,0
5.	N_{60} P_{60} K_{60}		обработка растений	5.483	99,8	795,0
6.	-	обработка семян		5.072	99,9	792,7
7.	-	обработка растений		5.181	99,8	789,7
8.	-		обработка семян	5.109	99,9	787,5
9.	-		обработка растений	5.029	99,5	790,8
10.	N_{40} P_{40} K_{40}	обработка семян		5.386	99,8	795,0
11.	N_{40} P_{40} K_{40}	обработка растений		5.555	99,8	794,5
12.	N_{40} P_{40} K_{40}		обработка семян	5.372	99,9	792,9
13.	N_{40} P_{40} K_{40}		обработка растений	5.382	99,9	795,6

Обработка семян за 2–5 дней до посева: Арксойл КНЭ – 100г / 10 л воды на 1т семян
Арксойл ККР – 80г / 10 л воды на 1т семян
Обработка растений – 3 срока:
1) 2–3 листа Арксойл КНЭ – 75г / 200 л воды на 1га
2) кущение Арксойл ККР – 90г / 200 л воды на 1га
3) колошение-начало цветения

Осенью 2017 года, перед посевом озимой пшеницы был взят образец зерна (720г) для определения в нём радиоактивного^{137} Cs, результат -0,76 Бк/кг, погрешность определения 0,12 Бк/кг. После уборке урожая по всем вариантам так же определили содержание^{137} Cs. По результатам определения (табл. 4)

Таблица 4 Влияние органо-минеральных удобрений Арксойл на качество зерна и содержание радионуклидов в озимой пшенице Московская-40, 2018 г.

№	NPK, кг д.в./1га	Обработка «Арксойл КНЭ»	Обработка «Арксойл ККР»	Белок, %	Клейковина, %	Содержание ^{137}Cs в зерне Бк/кг	Ошибка измерения+/-, Бк/кг
1.	контроль			13,2	27,0	√0,7	0,12
2.	N_{60} P_{60} K_{60}	семена		13,8	27,1	1,2	0,1
3.	N_{60} P_{60} K_{60}		семена	14,2	27,3	1,0	0,1
4.	N_{60} P_{60} K_{60}	растения		13,5	24,0	0,9	0,12
5.	N_{60} P_{60} K_{60}		растения	13,8	26,5	1,1	0,1
6.		семена		13,3	25,1	0,71	0,1
7.		растения		13,3	25,4	0,9	0,12
8.			семена	14,3	26,9	0,57	0,2
9.			растения	13,9	26,9	1,0	0,12
10.	N_{40} P_{40} K_{40}	семена		14,6	28,4	1,0	0,1
11.	N_{40} P_{40} K_{40}	растения		13,8	26,4	0,67	0,12
12.	N_{40} P_{40} K_{40}		семена	14,1	27,3	0,9	0,14
13.	N_{40} P_{40} K_{40}		растения	14,2	27,7	1,1	0,1

√ – погрешность измерения

На основании результатов измерений можно сделать вывод, что зерно на вариантах с обработкой КНЭ и ККР уменьшало количество радионуклида с уменьшением вносимых минеральных удобрений. Наименьшие показатели на варианте без минеральных удобрений – 0,57 (ККР) и 071 (КНЭ) с погрешностью измерения 0,2 и 0,1 Бк/кг. Обработка растений результат несколько повышает.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в целях экономии материальных и энергетических ресурсов в условиях современного сельскохозяйственного производства на черноземных почвах Тульской области применение органо–минеральных удобрений «Арксойл ККР» и «Арксойл КНЭ» является экономически целесообразным.

ВЫВОДЫ

1. Изучение влияния биопрепарата «Арксойл ККР» и «Арксойл КНЭ» на пшенице озимой Московская-40, в условиях Тульской области показало его эффективность в качестве биоудобрения.

2. Применение органо–минеральных удобрений «Арксойл ККР» и «Арксойл КНЭ» обеспечивает повышение урожайности озимой пшеницы «Московская 40» до 5,52 т/га (на вариантах 2–5) с применением N_{60} P_{60} K_{60}, что дало условно – чистый доход 5138 руб./га; при уменьшении N_{40} P_{40} K_{40} средняя урожайность (вар. 10–13) составила 5,42 т/га, доход составил – 5488 руб./га; без применения минеральных удобрений, урожайность (вар. 6–9) 5,10 т/га, условно-чистый доход – 5308 руб./га.

3. Обработка зерна «Арксойлом КНЭ» и «Арксойлом ККР» способствует уменьшению количество радионуклидов в зерне пшенице при уменьшение дозы вносимых минеральных удобрений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Прянишников А.И., Андреева Л.В., Кулеватова Т.Б., Мачихина Л.И., Мелешкина Е.П. Качество зерна – источник здоровья нации. // Достижения науки и техники АПК. – 2010. – № 11. – С. 16–17.

2. Влияние различных видов органических удобрений, диатомита и биопрепарата на продуктивность озимой пшеницы / С.Н. Никитин, А.И. Захаров // АгроXXI. – 2009. – № 4–6. – С. 63–64.

3. Агрофизическое состояние чернозема выщелоченного в зависимости от последствия органических и нетрадиционных удобрений/ С.Н. Немцев, С.Н. Никитин, Г.В. Сайдяшева // Вестник Ульяновской ГСХА. – 2011. – № 1. – С. 18–22.

4. «Методические указания по регистрационным испытаниям фунгицидов в сельском хозяйстве», под редакцией В.И. Долженко, С-Пб., 2009 г.

5. «Основные принципы и методические положения планирования научно-исследовательских работ и отчетности в системе Россельхозакадемии. М.: Россельхозакадемия, 2012»

6. «Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследования)» Доспехов Б.А., 5 изд., перераб. и доп. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.

УДК 639.3:347.77

ИНФОРМАЦИОННО-ПАТЕНТНЫЕ АСПЕКТЫ ПРОДОВОЛЬСТВЕННОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ПРОДУЦИИ АКВАКЛЬТУРЫ

Е.А. Зюзина

Астраханский государственный университет, Астрахань, Россия

Концепция интенсивного развития аквакультуры целенаправленно расширяет свои позиции, активно включает в сферу своих исследований и производства все технологические этапы, которые начинаются с культивирования рыбоводной продукции и заканчиваются переработкой аквакультурного сырья в пищевую продукцию для обеспечения продовольственной безопасности населения. Опыт показывает, что научные и технологические достижения в любой отрасли определяются наличием «пионерских» проектов, и в первую очередь основанных на информационно – патентной информации.

Информационно – патентные исследования для нужд аквакультуры традиционно нацелены на совершенствование технологий, в данном случае на этапе переработки товарной продукции, например, осетровой. Товарное выращивание осетровых видов рыб и особенно их переработка для пищевых целей относительно новое направление аквакультуры.

Ассортимент пищевой продукции из товарных осетровых видов рыб разнообразен и включает как переработку рыбы, так и икры – сырец. В настоящее время это копченая и провесная продукция, балычная продукция: ломтики и нарезка в плёнке под вакуумом, в жестебанке, деликатесные консервы натуральные и в различных соусах, пресервы. Для производства пищевой икры на экспорт используют только икру-сырец прижизненного способа получения.

В 2016 г. в ассоциации «Астраханьрыбхоз» произведено и реализовано: товарных осетровых – 80 т, пищевой икры 6,5 т, биомасса выращенных в садках осетровых составила 650, 0 т. Производство икорной продукции из осетровых видов рыб составляет 22 % от общероссийского производства. [1, стр. 12].

На Российском и мировом рынках конкуренция пищевой продукции из осетровых видов рыб, особенно икорной, растет. Переориентация традиционных пищевых производств на сырье из аквакультуры обостряет ситуацию в области обеспечения продовольственной безопасности.

Экспертными оценками констатируется. В настоящее время в странах, занимающихся товарным осетроводством, ежегодно производится до 35 тыс. т мяса осетровых и около 650 т пищевой черной икры. Основная доля приходится на Китай, где продукция аквакультуры из осетровых видов составляет около 30 тыс. т мяса и свыше 500 т черной икры в год [2, стр. 9].

В настоящее время предприятия аквакультуры остались единственным легальным источником для производства черной икры и продукции из осетровых рыб, поскольку их промысел запрещен.

Следовательно, с ростом производства продукции аквакультуры растет необходимость в новых технологиях ее переработки, а производство доступной, качественной и разнообразной пищевой продукции аквакультуры актуально и приобретает новые аспекты, в том числе и информационно – патентные.

В работе на основе патентной информации отражены перспективные технологические направления получения и переработки продукции из аквакультуры, в том числе и икорной.

Анализируются патенты, которые отражают технологические задачи переработки гидробионтов, выращенных в условиях аквакультуры, например, в садковых хозяйствах, УЗВ, в свете проблем продовольственной безопасности.

Информация для анализа взята из доступных баз данных Федерального института по интеллектуальной собственности (ФИПС). Поиск осуществлен по ключевым словам, а также по некоторым классам международной патентной классификации (МПК) A01K 61/00, A01K 63/04. Доступность информации на сайте http://new.fips.ru, автоматизированный поиск осуществлялся в бесплатном режиме. Использование патентно-информационной поддержки российского сервера ФИПС соответствует современной концепции реализации научных исследований в области аквакультуры, обеспечивает оперативность информационного обслуживания.

Продовольственная безопасность означает гарантирование доступных, экологически чистых, качественных и безопасных продуктов питания для всего населения страны (включая малообеспеченные слои) при обеспечении уровня среднедушевого потребления основных продовольственных товаров соответственно рациональным нормам, при которых достигается максимально возможная в современных условиях средняя продолжительность жизни.

Икорная продукция из осетровых видов рыб является деликатесной и не рассматривается при обеспечении среднедушевого потребления, тем не менее, что она должна быть экологически чистой, качественной и безопасной является очевидным и не вызывает сомнений.

Обеспечение продовольственной безопасности включает также необходимость использования природных ресурсов с минимальным ущербом для биосферы и одновременным улучшением среды обитания, требует проведения единой для всей страны (а в перспективе – и глобальной) политики природопользования, охраны и восстановления окружающей среды [3].

Всё вышеизложенное соответствует интенсивному развитию товарного осетроводства и переработки получаемой продукции в рамках основополагающих положений о продовольственной безопасности.

Аквакультура в России становится все более разнообразным, интенсивным и технологически современным сектором. С 2007 г. аквакультура включена в приоритетный национальный проект «Развитие агропромышленного комплекса». Спрос на ценные виды рыб стимулирует развитие индустриальной аквакультуры. Научно-технические разработки основываются на интенсивных методах разведения осетровых рыб в условиях садкового, бассейнового, УЗВ и комбинированных методов из них для культивирования рыбы, а также получения пищевой продукции.

На текущий момент имеется устойчивый интерес к культивированию осетровых рыб в установках замкнутого водоснабжения (УЗВ). В связи с этим рассмотрим патент 2647935 «Устройство подготовки воды для предпродажной подготовки гидробионтов» [4].

Данное изобретение относится к сфере аквакультуры и может быть использовано для подготовки воды при предпродажной подготовке гидробионтов, выращенных в УЗВ.

Его задачей является организация промышленного производства гидробионтов, выращенных в УЗВ. В результате получить товарную продукцию с улучшенными органолептическими показателями (отсутствием мулячного и плесневелого вкуса, обусловленных геосмином и 2-метилозоборнеолом), снизить уровнь экологической опасности эксплуатации УЗВ, предназначенных для выращивания гидробионтов.

При разработке заявленного устройства авторами учитываются следующие положения.

В процессе выращивания гидробионтов в УЗВ при очистке оборотной воды от аммонийного азота, нитритов и нитратов используются нитрификационные и денитрификационные биофильтры, которые имеют побочные эффекты в виде выделения в оборотную воду упомянутых УЗВ таких органических веществ как геосмин, 2-метилизоборнеол, бензотиазол и диметилдисульфид. Вышеупомянутые органические вещества, их наличие придает воде в установке землистые, затхло-плесневелые и сернистые запахи.

В описании патентного документа авторы: указывают, что если повышенную концентрацию геосмина и 2-метилизоборнеола оперативно не убирать из воды, то со временем происходит обратный процесс, а именно их проникновение в ткани гидробионтов, что в последствие влияет на качество пищевой продукции, получаемой из такого сырья.

констатируют, что при промывке гидробионтов временной процесс их промывки при стабильных температурных параметрах воды сильно коррелирован с физиологическими процессами, происходящими в гидробионтах, а именно увеличение объема подаваемой свежей воды кратно не приводит к пропорциональному увеличению вывода органических веществ из тканей гидробионтов в воду. Увеличение стрессовых ситуаций для гидробионтов в процессе их промывки не более одного раза, также не приносит существенного ускорения процесса промывки гидробионтов.

Обычно удаление посторонних привкусов у гидробионтов при их предпродажной подготовке осуществляют путем длительного, по времени, промывания гидробионтов в бассейнах без кормления с добавлением чистой воды в сутки на уровне не менее 40 % от объема воды в бассейне.

Заявленное устройство решает обозначенную проблему следующим образом. Устройство представляет технологически связанную систему из соответствующего технологического оборудования и приборного оснащения, в том числе компьютерного. На компьютерное оборудование инсталлируют программу для электронно-вычислительной машины «Программа управления подготовкой воды в процессе предпродажной подготовки гидробионтов» (Свидетельство РФ о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2017610669 от 16 января 2017 года).

Посредством вышеназванной программы для ЭВМ, на заявленном устройстве оперативно осуществляется управление процессом удаления из тел, подготавливаемых к продаже гидробионтов, геосмина и 2-метилизоборнеола, тем самым обеспечивая приемлемый уровень органолептического качества рыбной продукции. Конструктивное решение направлено и на сокращение времени предпродажной подготовки гидробионтов.

Несмотря на устойчивый интерес к культивированию осетровых в УЗВ, основная масса сырья для пищевой продукции, включая икру, поступает из хозяйств садкового типа. Это определяет выбор следующего патента 2654637 «Способ защиты производства икры от микробиологической порчи» [5].

Традиционные правила производства икры, ориентированные на рыбу от промысла, предписывают каждый этап ее обработки (извлечение, промывку, засолку, упаковку) проводить в чистом помещении, используя продезинфицированные инструменты и оборудование, холодную питьевую воду без примесей, соль высокой степени очистки, чтобы избежать попадания в конечный продукт микробов и загрязнений. По санитарным нормам брать икру можно только у живой или свежеубитой рыбы, так как сразу после гибели в ее кишечнике и расположенных рядом с ним яичниках начинается размножение бактерий, в том числе и опасных. Хранение и транспортировка икры, чтобы она сохранила вкус и питательную ценность, должны проходить в очень узком диапазоне температур, а именно от – 4 °С до 0 °С. Выход за этот диапазон температур предполагал увеличение количества соли, использование пищевых добавок и / или консервантов.

Снижение объемов производства икорной продукции, научный прогресс в пищевой промышленности, изменение условий обитания рыбы, которая становится сырьем для икорного производства (рыба-сырец), влияют на организацию современного производства икры осетровых видов рыб, изменяют ее производственно-технологическую культуру.

Общеизвестно, что высокий уровень антропогенного загрязнения окружающей среды приводит к ухудшению экологической обстановки акваторий, где размещают рыбоводные хозяйства, что в конечном результате влияет на уровень микробной обсемененности и наличие условно-патогенной микрофлоры у выращиваемых рыб.

На современном товарном осетровом хозяйстве, которое является поставщиком сырья для производства деликатесной продукции, в частности, икры, ведется строгий контроль показателей качества воды, количества и качества кормов, соблюдение регламента работ. Кроме того, микробиологические исследования показывают, что имеются температурно-временные периоды, когда рыба имеет минимальную микробиологическую обсемененность, что используется автором в предлагаемом способе.

При организации современного пищевого производства перспективным методом дезинфекции является озонирование. Это экологически чистая технология очистки, основанная на использовании газа озона – сильного окислителя. Озонатор вырабатывает озон из кислорода, содержащегося в атмосферном воздухе. После взаимодействия с загрязняющими химическими и микробиологическими веществами озон превращается в обычный кислород. Практически доказано, что все продукты озонирования являются безвредными для человека. По бактерицидному действию озонирование помещений превосходит действие ультрафиолетового кварцевого облучения.

Технической задачей заявленного изобретения является способ, который направлен на расширение сферы применения новых технологий по повышению пищевой безопасности производства икры. Способ комбинирует определенное сочетание ресурсов и оборудования. Рыбу-сырец используют с гарантированно низким уровнем микробиологического обсеменения, что обеспечивается временными и температурными параметрами заготовки рыбы – сырца. Для обеззараживания воздушной среды помещений, оборудования и инвентаря, используемых при производстве икры осетровых видов рыб, применяют средства и приемы опосредованного воздействия, что позволяет получить качественный продукт и не оказывает влияния на вкусовые качества конечного продукта.

Таким образом, заявленная совокупность существенных признаков формирует определенное сочетание ресурсов и оборудования, которое дает синергетический эффект, позволяет получить качественный продукт, адаптированный к требованиям по безопасности продуктов питания, в том числе к санитарно-гигиеническим.

Из всего вышеизложенного видно, что применение (внедрение) заявленного устройство и/ или способа в рамках «пионерных» проектов обеспечит получение аквакультурной пищевой продукции соответствующего качеств, как в рамках продовольственной безопасности, так и с точки зрения санитарно – гигиенических требований.

ЛИТЕРАТУРА

Чертова, Е.Н. Товарное осетроводство на предприятиях ассоциации «Астраханьрыбхоз» [Текст] / Е.Н. Чертова, С.М. Зуборев // Аквакультура осетровых рыб: проблемы и перспективы: материалы Международной научно-практической конференции, 10–12 октября 2017 г., г. Астрахань / сост.: С.С, Астафьева, Н.В. Судакова, К.А. Ветрова, С.А. Гуцуляк, дизайн обложки А.З. Анохиной. – Махачкала: Издательст во ДГУ. – 2017. – С. 10–13.

Васильева, Л.М. Проблемы и перспективы развития аквакультуры осетровых рыб в современных условиях [Текст] / Л.М. Васильева // Аквакультура осетровых рыб: проблемы и перспективы: материалы Международной научно-практической конференции, 10–12 октября 2017 г., г. Астрахань / сост.: С.С, Астафьева, Н.В. Судакова, К.А. Ветрова, С.А. Гуцуляк, дизайн обложки А.З. Анохиной. – Махачкала: Издательство ДГУ. – 2017. – С. 7–10.

Кранина Е. Роль аквакультуры в обеспечении продовольственной безопасности Китая. [Электронный ресурс] http://naukarus.com/rol-akvakultury-v-obespechenii-prodovolstvennoy-bezopasnosti-kitaya

Патент РФ 2647935 РФ, RU 2 647 935 C1 Устройство подготовки воды для предпродажной подготовки гидробионтов [Текст] / Киташин Ю.А. и др.; заявлено 16.03.2017; Опубл.21.03.2018, Бюл. 9.

Патент РФ 2654637 РФ, RU 2 654 637 C1 Способ защиты производства икры от микробиологической порчи [Текст] / Букатов И.Н.; заявлено 12.12.2016; Опубл.21.05.2018, Бюл. 15

УДК 636.5.033:636.087:636.084.52

БЕЛКОВАЯ КОРМОВАЯ ДОБАВКА В КОМБИКОРМАХ ДЛЯ ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ

И.П. Салеева[1], В.С. Лукашенко[1], Е.В. Журавчук[1], Е.А. Овсейчик[1], В.Г. Волик[2], Д.Ю. Исмаилова[2]

[1] Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» РАН, Сергиев Посад, Россия

[2] «Всероссийский научно-исследовательский институт птицеперерабатывающей промышленности» – филиал ФНЦ «ВНИТИП» РАН, Ржавки, Россия

В настоящее время разработаны легкоусвояемые белковые кормовые добавки, полученные методом кратковременной высокотемпературной обработки и ферментативного гидролиза вторичного сырья птицеперерабатывающей промышленности (перо, мясокостный остаток и др.).

В связи с этим, целью исследований являлось определение влияния на продуктивные показатели цыплят-бройлеров замены в рационе кормления рыбной муки на легкоусвояемые кормовые компоненты, такие как ферментативные гидролизаты пера и коллагена.

Опыт был проведен в условиях вивария СГЦ «Загорское ЭПХ» – филиала ФНЦ «ВНИТИП» РАН на цыплятах-бройлерах кросса Росс-308. Для этот было сформировано 4 группы цыплят. Каждая группа разделялась на 2 подгруппы. Одну подгруппу из каждой группы выращивали до 38-дневного, а вторую до 49-дневного возраста. Птицу выращивали на подстилке из древесной стружки, при этом для всех групп были соблюдены одинаковые условия содержания, как по микроклимату, так и по другим технологическим параметрам.

Первая контрольная группа цыплят получала полнорационный комбикорм, источником животного белка в котором была рыбная мука с содержанием сырого протеина (СП) 67 %. В рационе опытной группы 2 рыбная мука была заменена кормовой добавкой из кератинсодержащего сырья (СП – 85,7 %). В опытной группе 3 использовали рацион кормления с кормовой добавкой из кератинсодержащего сырья (СП – 85,7 %), с применением пробиотического препарата в состав которого входят живые бактерии Bacillus subtilis, Lactobacillus paracasei и Enterococcus faecium. Опытная группа 4 получала комбикорм с кормовой добавкой из смеси кератин- и коллагенсодержащего сырья (СП – 67,1 %) с добавлением того же пробиотического препарата.

По результатам опыта было установлено, что средняя живая масса цыплят всех опытных групп достоверно превышала контроль. Так, опытная группа 2, опередила контрольную группу 1 по данному показателю в 38-дневном возрасте на 6,7 % (при $p \leq 0,01$) и в 49-дневном возрасте на 6,5 % (при $p \leq 0,01$). Затраты корма на 1 кг ее прироста были ниже, чем в контроле на 5,6 % и на 7,1 % по возрастам соответственно.

Замена рыбной муки в рационах кормовой добавкой из смеси кератин- и коллагенсодержащего сырья (4 группа) способствовала повышению средней живой массы цыплят по отношению к контролю на 5,4 % (при $p \leq 0,01$) в 38-дневном возрасте и на 4,5 % (при $p \leq 0,05$) в 49-дневном возрасте, а затраты корма были ниже на 5,1 % и 5,6 %, соответственно.

Лучшей группой по средней живой массе была опытная группа 3, в которой цыплята получали ферментированный гидролизат пера с пробиотическим препаратом. Изучаемый показатель в этой группе достоверно опережал контроль на 8,6 % (при $p \leq 0,001$) и на 9 % (при $p \leq 0,001$) в 38- и 49-дневном возрасте соответственно. Затраты корма на 1 кг прироста живой массы третьей опытной группы были ниже в сравнении с контрольной группой 1 на 6,7 % и 8,1 %.

Сохранность во всех группах составила 100 %.

На основании полученных данных сделано заключение, что включение в рацион кормления цыплят-бройлеров ферментированных гидролизатов отходов переработки птицы способствует повышению их продуктивных показателей.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 17–16–01028)

УДК 66.047619.616.1/9:579.088.13

ПРОБИОТИК ПРОТИВ СМЕШАННОЙ КИШЕЧНОЙ ИНФЕКЦИИ МОЛОДНЯКА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Н.Н. Гаврилова, А.К. Саданов, Г.К. Таубекова, И.А. Ратникова, Ж.Е. Сагидолдина

Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», г. Алматы, Казахстан

В связи с повышением требований к экологической безопасности продукции животноводства, важное место отводится разработке экологически безопасных препаратов для защиты животных от заболеваний, таких как пробиотики. В настоящее время известно большое число пробиотиков для животноводства, состоящих из молочнокислых и бифидобактерий, являющихся основной защитной группой микроорганизмов кишечника, безвредных для человека и животных. Основанием для применения пробиотиков в ветеринарной медицине являются вызываемые ими положительные эффекты в организме животных. К основным эффектам пробиотиков относятся улучшение пищеварения, иммуностимулирующее действие и повышение продуктивности животных [1–5].

Однако известные пробиотики не стали альтернативой антибиотикам, так как имеют недостаточно широкий антимикробный спектр действия и используются преимущественно для восстановления нормальной микрофлоры кишечника. Часто применение рекомендованных препаратов не эффективно, так как при этом не учитывается характер инфекции.

Предлагаемый новый пробиотик на основе молочнокислых и пропионовокислых бактерий отличается от известных широким спектром антимикробного действия в отношении патогенных и условно-патогенных возбудителей кишечных заболеваний благодаря целенаправленному отбору в его состав штаммов молочнокислых бактерий – антагонистов к наиболее часто встречающимся возбудителям заболеваний.

Отработана технология получения данного пробиотика в сухом и жидком виде.

Испытание профилактической и лечебной эффективности сухого пробиотика проводили в крестьянском хозяйстве «Пчелка» с. им. Х. Бижанова, Енбекшиказахского района, Алматинской области.

Для испытаний отобрано 10 голов телят, из них 5 голов 1 месячного возраста, заболевших диспепсией и 5 голов в возрасте до пяти дней с целью профилактики.

Рабочий раствор сухого пробиотика готовили непосредственно перед применением. При этом 250 г. пробиотика растворяли в 1 л кипяченой и охлажденной до 30 °С питьевой воды. Растворенный пробиотик хранили в холодильнике не более 24 часов.

С целью профилактики препарат выпаивали новорожденным телятам по 50 мл один раз в день (утром натощак за 15 минут до кормления) в течение 5 дней. Наблюдение за телятами проводили в течение 10 дней. Результаты наблюдений представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Испытание профилактической эффективности пробиотика на телятах

Название хозяйствующего субъекта, населенного пункта	Вид, возраст, кличка и идентификационный № животного	Количество животных, получавших пробиотик	
		всего	заболело
КХ «Пчелка»	теленок, 2 дня, чернопестрый, № 3022	1	нет
КХ «Пчелка»	теленок, 2 дня, чернопестрый, № 3027	1	нет
КХ «Пчелка»	теленок, 5 дней, черный № 3030	1	нет
КХ «Пчелка»	теленок, 3 дня, бурый, № 3018	1	нет
КХ «Пчелка»	теленок, 3 дня, белоголовый, № 3020	1	нет

Как видно из приведенной таблицы, среди телят, получавших пробиотик с профилактической целью, заболевших не обнаружено.

Больным диспепсией телятам выпаивали препарат за 15 минут до кормления 3 раза в день по 50 мл. Результаты испытаний представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Испытание лечебной эффективности пробиотика на телятах

Название хозяйствующего субъекта, населенного пункта	Вид, возраст, кличка и идентификационный № животного	Количество животных, получавших пробиотик	
		всего	выздоровело, ч/з дней
КХ «Пчелка»	теленок, 1 мес., чернопесрый, № 3004	1	3
КХ «Пчелка»	теленок, 1 мес., чернопестрый, № 3013	1	4
КХ «Пчелка»	теленок, 1 мес., чернопестрый, № 3012	1	4
КХ «Пчелка»	теленок, 1 мес., чернопестрый, № 3003	1	3
КХ «Пчелка»	теленок, 1 мес., чернопестрый, № 3015	1	5

Больные животные, получавшие пробиотик, выздоровели через 3–5 суток.

Проведено также испытание лечебно-профилактической эффективности сухого пробиотика на ягнятах. В исследованиях участвовали 6 новорожденных ягнят, из которых 3 животных за 15 минут перед первым кормлением в течение 5 дней получали пробиотик в дозе 15 мл на голову. Остальные 3 животных пробиотик не получали и служили контролем. Наблюдение вели в течение 10 дней. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Испытание профилактической эффективности сухого пробиотика на ягнятах

Название хозяйствующего субъекта, населенного пункта	Вид, возраст, кличка и идентификационный № животного	Количество животных, получавших пробиотик	
		всего	заболело
КХ «Пчелка»	ягненок, 3 дня, № 06097584	1	нет
КХ «Пчелка»	ягненок, 3 дня, № 06097580	1	нет
КХ «Пчелка»	ягненок, 3 дня, № 06097585	1	нет

В результате испытаний установлено, что в группе новорожденных, получавших с профилактической целью, заболеваемость не регистрировалась.

В группе животных, не получавших препарат с профилактической целью, заболело один ягненок (таблица 4). Заболевшего ягненка выпаивали пробиотик 3 раза в день по 15 мл на голову за 15 мин. перед кормлением до полного выздоровления. Выздоровление произошло на 3 сутки (таблица 5).

Проведено испытание профилактической эффективности пробиотика на поросятах-сосунах. Поросята опытной группы в количестве 5 голов за 15 минут перед первым кормлением в течение 5 дней получали пробиотик в дозе 15 мл на голову. Контрольные животные (5 голов), родившиеся в то же время, пробиотик не получали. Наблюдение вели в течение 15 дней.

Таблица 4 – Наблюдение за ягнятами, не получавшими пробиотик

Название хозяйствующего субъекта, населенного пункта	Вид, возраст, кличка и идентификационный № животного	Количество животных, получавших пробиотик	
		всего	заболело
КХ «Пчелка»	ягненок, 3 дня, № 06097588	1	нет
КХ «Пчелка»	ягненок, 3 дня, № 06097586	1	1
КХ «Пчелка»	ягненок, 3 дня, № 06097589	1	нет

Таблица 5 – Испытание лечебной эффективности пробиотика на заболевших ягнятах

Название хозяйствующего субъекта, населенного пункта	Вид, возраст, кличка и идентификационный № животного	Количество животных, получавших пробиотик	
		всего	выздоровело, ч/з дней
КХ «Пчелка»	ягненок, 3 дня, № 06097586	1	3

Таблица 7 – Испытание профилактической эффективности пробиотика на поросятах-сосунах

Название хозяйствующего субъекта	Вид, возраст, кличка и идентификационный № животного	Количество животных, получавших пробиотик	
		всего	заболело
КХ «Пчелка»	Поросенок, 1 день, б/н-21	1	нет
КХ «Пчелка»	Поросенок, 1 день, б/н-22	1	нет
КХ «Пчелка»	Поросенок, 1 день, б/н-23	1	нет
КХ «Пчелка»	Поросенок, 1 день, б/н-24	1	нет
КХ «Пчелка»	Поросенок, 1 день, б/н-25	1	нет

В результате испытаний установлено, что в группе новорожденных, получавших с профилактической целью, заболеваемость не регистрировалась. В группе животных, не получавших препарат с профилактической целью, заболел один поросенок (таблица 8).

Таблица 8 – Наблюдение за поросятами, не получавшими пробиотик

Название хозяйствующего субъекта	Вид, возраст, кличка и идентификационный № животного	Количество животных, получавших пробиотик	
		всего	заболело
КХ «Пчелка»	Поросенок, 1 день, б/н-26	1	нет
КХ «Пчелка»	Поросенок, 1 день, б/н-27	1	нет
КХ «Пчелка»	Поросенок, 1 день, б/н-28	1	1
КХ «Пчелка»	Поросенок, 1 день, б/н-29	1	нет
КХ «Пчелка»	Поросенок, 1 день, б/н-30	1	нет

Заболевшему диспепсией поросенку выпаивали пробиотик по 15 мл на голову трижды в день за 15 минут до кормления в течение 5 дней. Выздоровление наступило на 3 сутки.

Таким образом, разработанный пробиотик сухой является эффективным лечебным и профилактическим средством против диспепсии телят, ягнят и поросят.

ЛИТЕРАТУРА

1 Левахин В.И. Пробиотики в животноводстве // Вестник мясного скотоводства. – 2013. – Т.1. – № 79. – С. 7–10.

2 Подчалимов М.И., Грибанова Е.М., Злобин С.В. Влияние кормовых добавок на продуктивность молодняка и свиней // Вестник Курской гос. с.-х. акад. – 2010. – Т3. – № 3. – С. 67–63.

3 Ja Kyeom Seo, Seon-Woo Kim1, Myung Hoo Kim, Santi D. Upadhaya, Dong Keun Kam2 and Jong K. Ha Direct-fed Microbials for Ruminant Animals Asian-Aust // J. Anim. Sci. – 2010. – Vol. 23, № 12. – P. 1657–1667.

4 Некрасов В.Р. Пробиотик нового поколения в кормлении коров // Достижения науки и техники АПК. – 2013. – № 13. – С. 38–40.

5 Кощаев А.Г., Кощаева О.В., Калюжный С.А. Пробиотик Трилактобакт в кормлении перепелов // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Научный журнал КубГАУ). – 2014. – № 95. – С. 633–647.

УДК 637.146: 663.052:546.722: 546.46

ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ КОНЦЕНТРАТОВ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ, ОБОГАЩЕННЫХ ЭССЕНЦИАЛЬНЫМИ МИКРО- И МАКРОЭЛЕМЕНТАМИ

А.В. Щёкотова, И.С. Хамагаева, М.С. Аюшеева, С.Н. Хазагаева, А.А. Дёмина

Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления, г Улан-Уд, Россия

В молочной промышленности в последние годы прослеживается тенденция создания продуктов нового поколения, в том числе кисломолочных продуктов, обладающих повышенной пищевой и биологической ценностью. Предполагается их направленное использование: для массового потребления, лечебно-профилактического и детского питания. При этом широко используется промышленная переработка вторичного молочного сырья, позволяющая реализовать принципы безотходной технологии, увеличить ресурсы полноценных продуктов питания, повысить экономическую эффективность производства и исключить загрязнение окружающей среды. Особенно актуально в настоящее время, когда остро ощущается недостаток в пищевом рационе полноценных белков, добавление в продукты питания сывороточных белков, которые по своему аминокислотному составу относятся к наиболее ценным белкам животного происхождения. Кроме того, сывороточные белки являются источниками незаменимых аминокислот проявляют иммуномодулирующую, антагонистическую, противораковую активность, отвечают за транспорт жирорастворимых витаминов и перенос железа в организме [1].

Потребность в расширении ассортимента функциональных молочных продуктов, богатых такими эссенциальными микроэлементами как железо и макроэлементами как магний, сегодня также актуальна [2, 3]. Железо является одним из важнейших микронутриентов, различные формы недостаточности которого (предлатентный дефицит железа, латентный дефицит железа, железодефицитная анемия), по обобщенным данным, среди отдельных групп населения выявляется в (2 – 60)% случаев [2]. Дефицит магния выявляется в 46 % случаев и приводит к развитию нервно-мышечных и сердечно-сосудистых заболеваний, расстройствам психики, мигреням, хронической усталости и депрессивным состояниям [3].

В этих условиях целесообразным и эффективным путем улучшения обеспеченности населения России алиментарными микронутриентами, путем, по которому идет большинство стран мира, является дополнительное обогащение ими основных групп продуктов питания, в том числе и молочных [4]. В Восточно-Сибирском государственном университете технологий и управления в течение нескольких лет проводятся исследования по разработке таких продуктов. Нами выполнен цикл исследований по обогащению органическим железом и магнием концентрата сывороточных белков (КСБ) [5, 6]. В частности были приведены исследования по изучению возможности использования железосодержащего концентрата сывороточных белков (КСБ-Fe) при производстве бифидосодержащих кисломолочных продуктов и магнийсодержащего концентрата сывороточных белков (КСБ-Mg) при производстве йогурта.

Кисломолочный продукт и йогурт получали согласно нормативно-технической документации. Обогащенные КСБ вносили в продукты на стадии заквашивания в дозировке 3 %, 5 %, 7 % и 10 %. Перед внесением КСБ предварительно растворяли в небольшом количестве пастеризованного, охлажденного до (60–65) °С молока.

В результате проведенных исследований установлено, что внесение сухих обогащенных КСБ в количестве 3 и 5 % не оказывает влияние на вкусоароматический профиль молочной основы продуктов. Добавление большего количества КСБ-Fe и КСБ-Mg вызывает появление неприемлемого с потребительской точки зрения привкуса восстановленного молока (привкус сывороточных белков). Данный порок можно объяснить невысокой растворимостью КСБ. Специфические пороки, свойственные большинству магнийсодержащих добавок (горький вкус) при внесении КСБ-Mg в исследуемых образцах не обнаружен.

При изучении влияния вносимых белковых добавок на процесс сквашивания кисломолочных продуктов отмечено, что внесение КСБ стимулирует кислотообразующую способность используемых культур заквасок. Интенсивное нарастание титруемой кислотности позволяет сократить процесс на 2–4 часа. В ходе экспериментов был отмечен более интенсивный рост исследуемых культур в образцах с КСБ. Это свидетельствует о том, что молоко с КСБ-Fe или КСБ-Mg является более благоприятной средой для развития бифидобактерий и молочнокислых микроорганизмов.

Приём материалов статей по адресу: actbio@mail.ru

На основании исследований влияния обогащенных КСБ на биохимические и микробиологические процессы, протекающие в процессе сквашивания молока, были усовершенствованы технологии кисломолочного продукта «Бифивит» и йогурта. К особенностям технологии относятся предварительная подготовка и внесение определенной дозы сухих КСБ-Fe или КСБ-Mg (3–5 %).

Качественная характеристика кисломолочных продуктов, обогащенных эссенциальными микро- и макроэлементами, представлена в таблице 1. Данные таблицы 1, показывают, что обогащенные кисломолочные продукты обладают хорошими органолептическими свойствами, содержат повышенное количество белка и профилактическую дозу магния и железа в легкоусвояемой форме, а также высокое количество клеток молочнокислых бактерий и бифидобактерий.

Таблица 1 – Качественная характеристика кисломолочных продуктов, обогащенных железом и магнием

Показатели		Характеристика	
		Кисломолочный продукт, обогащенный КСБ-Fe	Йогурт, обогащенный КСБ-Mg
Внешний вид и консистенция		Нежная, однородная, вязкая	Однородная, густая, нежная, кремообразная, вязкая
Вкус и запах		Чистый, кисломолочный, без посторонних запахов и привкусов	Чистый, кисломолочный, без посторонних запахов и привкусов
Цвет		Молочно-белый, с кремовым оттенком	Молочно-белый, с кремовым оттенком
Массовая доля жира, %		3,2	2,5
Массовая доля белка, % не менее		2,8	5,8
Кислотность, °Т		70–72	85–88
Массовая доля железа, мг / 100г		1,83 ± 0,3	-
Массовая доля магния, мг / 100г		-	73 ± 0,5
КМАФАнМ, КОЕ/см^3		-	(5–7)×10^9
Количество клеток бифидобактерий, КОЕ/см^3		3×10$^{1\circ}$	-
Объем (масса) продукта, см^3 (г) в котором не допускаются	БГКП (колиформы)	0,1	
	патогенные, в том числе сальмонеллы:	25	
Дрожжи (Д), плесени (П), КОЕ/см^3 (г), не более		Д-50 П-50	

На основании проведенных исследований разработана технология кисломолочного продукта, обогащенного железом и йогурта, обогащенного магнием. К особенностям технологии относится использование в качестве железо – и магнийсодержащей добавки сухого концентрата сывороточных белков (КСБ-Fe, КСБ-Mg). Установлено, что применение обогащенных эссенциальными микро- и макроэлементами КСБ при производстве кисломолочных продуктов не только обогащает их легкоусвояемым железом и магнием, но интенсифицирует процесс ферментации. Производство бифидосодержащего кисломолочного продукта, обогащенного железом и йогурта, обогащенного магнием, не требует каких-либо дополнительных затрат, данные продукты могут вырабатываться в промышленных условиях.

ЛИТЕРАТУРА

Гордиенко Л.А., Евдокимов И.А., Горлачёва С.В. Использование белков молочной сыворотки в производстве кисло-молочных напитков // Молочная промышленность. – 2015. – № 3. – С. 72–73.

Онишенко Г.Г. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 16 сентября 2003 г. № 148 «О дополнительных мерах по профилактике заболеваний, обусловленных дефицитом железа в структуре питания населения» // Российская газета. – 2003. – № 190. – С. 3304.

Трисветова Е.Л. Магний в клинической практике // Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии. – 2012. – № 8 (4). – С. 545–552

Распоряжение Правительства Российской Федерации от 17 апреля 2012 года % 559-р «Об утверждении Стратегии развития пищевой и перерабатывающей промышленности Российской Федерации» // АПК: экономика и управление. – 2012. – № 6. – С. 81.

Щёкотова А.В., Хамагаева И.С. Белковые концентраты, обогащенные пробиотическими культурами и эссенциальными микро- и макроэлементами: монография. – Уран-Удэ: Изд-во ВСГУТУ, 2017. – 264 с.

Щёкотова А.В., Бадмаева Н.Д. Исследование влияния дозы и вида магнийсодержащих коагулянтов на эффективность выделения сывороточных белков // Инновационные технологии в пищевой промышленности: наука, образование и производство: Сб. материалов IV междунар. научн.-технич. конф. – Воронеж.: Изд-во ВГУИТ, 2017. – С. 141–145.

УДК 582.273:665.939.351:577.152.3

ПРИМЕНЕНИЕ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ АГАРА ИЗ КРАСНЫХ ВОДОРОСЛЕЙ РОДА *AHNFELTIA*

Н.В. Бурова, А.В. Подкорытова

Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии, Москва, Россия

Агар – ценный гидроколлоид природного происхождения, широко применяемый в пищевой, фармацевтической, медицинской, биотехнологической и многих других отраслях промышленности во всём мире. Уникальным свойством гелей агара является их высокая прочность по сравнению с гелями любого другого желирующего агента. 1 % водный раствор агара переходит в гель при температуре 30–43 °С, не плавится при температуре ниже 85 °С и характеризуется отличной обратимостью. Гели агара не обладают вкусом, действуют как фиксаторы и закрепители аромата, прозрачны и легко окрашиваются. Высокоочищенные гели не ингибируют рост микроорганизмов [2, 5, 6, 10, 14]. Основным отечественным сырьём для производства агара являются красные водоросли рода *Ahnfeltia*. Классические технологии экстракции агара, основанные на применении щелочей, позволяют получить выход целевого продукта из биомассы дальневосточной и беломорской анфельции не более 10 и 20 %, соответственно [3, 7].

С целью *повышения* эффективности *экстрагирования агара* исследован процесс предварительной обработки анфельции комплексом гидролитических ферментов, катализирующих деструкцию полимеров растительной клеточной стенки. Объектом исследования послужили красные водоросли *Ahnfeltia tobuchiensis* и *A. plicata*, образцы которых были заготовлены способом активного лова, а также собраны из штормовых выбросов в 2013–2018 гг. в Дальневосточном и Северном рыбохозяйственных бассейнах, соответственно. Известно, что клеточная стенка красных водорослей представлена сетью фибрилл целлюлозы, ксилана и маннана, а также обширным коллоидным матриксом [11, 13]. На основании данных хроматографического [4, 8, 9] и спектрофотометрического [12, 15] анализов гидролизата нами установлены массовые доли некрахмальных полисахаридов анфельции. Водоросли *A. tobuchiensis* и *A. plicata* содержали 28,0–52,8 % агара, 10,0–11,6 % целлюлозы, 0,6–0,9 % ксилана и 0,4–0,7 % маннана. Присутствие целлюлозы и гемицеллюлоз в составе углеводной фракции анфельции открывает перспективы применения гидролитических ферментов в процессе её предварительной обработки с целью достижения максимально глубокой и эффективной деструкции полисахаридов клеточной стенки. Критериями оценки результатов проведённых экспериментов служили выход целевого продукта и прочность геля 0,85 %-ного водного раствора агара, определенная на приборе Валента [1]. Полученные экспериментальные данные сравнивали с результатами контрольных процессов, которые выполняли параллельно при соблюдении абсолютно равных условий, но без внесения фермента на стадии предобработки. Проведённые исследования показали, что предварительная ферментная обработка биомассы анфельции способствует повышению выхода целевого продукта с 9 ± 2 до 15 ± 1 % для *A. tobuchiensis* и с 19 ± 1 до 28 ± 2 % для *A. plicata*. Прочность 0,85 % гелей агаров экспериментальных и контрольных образцов практически не изменялась. В результате действия гидролитических ферментов на химические структуры трудногидролизуемых полисахаридов происходило выраженное набухание талломов водорослей. При этом целостность талломов оставалась неизменной, что не затрудняло последующую очистку экстрактов. Также стоит отметить, что ферментная предобработка обеспечивала более эффективное обесцвечивание геля агара, ввиду присутствия в коммерческих препаратах ксиланаз, широко применяемых в качестве отбеливающих агентов.

Проведённые исследования позволили установить, что предварительная обработка красных водорослей *A. tobuchiensis* и *A. plicata* гидролитическими ферментами способствует повышению выхода агара до 15 ± 1 и 28 ± 2 %, соответственно, при сохранении гелеобразующих свойств полисахарида. Таким образом, данный подход позволит осуществить разработку принципиально новой энергосберегающей и коммерчески рентабельной технологии производства отечественного агара. Кроме того, использование ферментов способствует уменьшению применения химических веществ в процессе производства агара, что в свою очередь сократит вредное воздействие на окружающую среду.

ЛИТЕРАТУРА

1. ГОСТ 26185–84. 2010. Водоросли морские, травы морские и продукты их переработки. Методы анализа. М.: ФГУП «Стандартинформ». 34 с.
2. Донченко Л.В., Сокол Н.В., Красноселова Е.А. 2018. Пищевая химия. Гидроколлоиды. – М. Юрайт. 180 с.
3. Кизеветтер И.В., Грюнер В.С., Евтушенко В.А. 1967. Переработка морских водорослей и других промысловых водных растений. М.: Пищевая промышленность. 416 с.
4. Лопатина Н.А., Клочкова Н.Г., Усов А.И. 2017. Полисахариды водорослей. Сообщение 69. Моносахаридный состав полисахаридов некоторых тихоокеанских красных водорослей по данным восстановительного гидролиза биомассы // Известия Академии наук. № 5. С. 915–921.
5. Льюис У., Скуайрс Л., Брутон Дж. 1948. Химия коллоидных и аморфных веществ. М.: Государственное изд-во иностранной литературы. 536 с.
6. Подкорытова А.В. 2005. Морские водоросли-макрофиты и травы. М.: Изд-во ВНИРО. 174 с.
7. Суховерхов С.В., Кадникова И.А., Кушева О.А., Подкорытова А.В. 1999. Обоснование технологии получения агарозы из красной водоросли *Ahnfeltia tobuchiensis* // Известия Тихоокеанского научно-исследовательского рыбохозяйственного центра. Т. 125. С. 282–286.
8. Усов А.И. 2001. Проблемы и достижения в структурном анализе сульфатированных полиса-харидов красных водорослей // Химия растительного сырья. № 2. С. 7–20.
9. Усов А.И., Элашвили М.Я. 1991. Количественное определение производных 3,6-ангидрогалактозы и специфическое расщепление галактанов красных водорослей в условиях восстановительного гидролиза // Биоорганическая химия. Т. 17. № 6. С. 839–848.
10. Armisen R., Galatas F. 2009. Agar. In: Handbook of hydrocolloids. Ed. Phillips O.G., Williams P.A. Oxford: Woodhead Publishing. P. 82–107.
11. Cole K.M., Sheath R.G. 1990. Biology of the red algae. Cambridge: Cambridge U. Press. 517 p.
12. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Analytical Chemistry. V. 28. P. 350–356.
13. Fritsch F.E. 1977. The structure and reproduction of the algae. V. 2. Foreword, Phaeophyceae, Rhodophyceae, Myxophyceae. Cambridge: Cambridge U. Press. 939 p.
14. McHugh D.J. 1987. Production and utilization of products from commercial seaweeds. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome: FAO fisheries technical paper. 198 p.
15. Updegraff M.D. 1969. Semimicro determination of cellulose in biological material // Analytical biochemistry. V. 32. I. 3. P. 420–424.

УДК 664.61:577.15.02

НОВЫЕ РЕЦЕПТУРЫ ПРЯНИКОВ ДИАБЕТИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

Т.Н. Тертычная[1], И.В. Мажулина[1], С.В. Калашникова[1], С.Ф. Яковлева[2]

[1] Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I, Воронеж, Россия

[2] Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Мучные кондитерские изделия имеют привлекательный внешний вид, отличаются высокой калорийностью и легкой усвояемостью. Они содержат необходимые человеку для нормальной жизнедеятельности пищевые вещества, в том числе белки, липиды, углеводы, минеральные вещества, витамины, пищевые волокна, характеризуются легкой перевариваемостью, высокой энергетической ценностью, приятным вкусом, более длительное время сохраняют свои потребительские свойства, значительно дешевле в сравнении с другими продуктами питания [1].

Целью работы является разработка новой рецептуры пряников с улучшенными органолептическими показателями качества (запахом и вкусом, эластичным мякишем) и расширение ассортимента мучных кондитерских изделий диабетического назначения.

Одним из перспективных видов сырья для производства мучных кондитерских изделий является тритикале. Использовалась мука тритикалевая обдирная хлебопекарная с повышенным содержанием белковых веществ [2]. Использование инулиназ открывает широкую перспективу получения чистых фруктозных сиропов из растительного сырья – из инулина топинамбура [3]. Выход фруктозы достигает 95 %. Фруктоза становится все более востребованной в пищевых технологиях как более безопасная для здоровья человека альтернатива сахарозе. Топинамбур в силу богатого химического состава представляет собой эффективное лечебное средство и может рассматриваться как уникальный продукт диабетического питания. Топинамбур необходимо включать в пищевой рацион жителям крупных городов с неблагоприятной экологической обстановкой, так как он имеет свойство нейтрализовывать негативные последствия воздействий окружающей среды. Пищевые волокна топинамбура способны связывать в комплексы и выводить из организма человека соли тяжелых металлов, токсины,

радионуклиды, избыток холестерина [4]. В качестве биологически активных добавок в рецептуру пряников было введено 8,0 % полуфабриката из топинамбура в виде гидролизованного порошка топинамбура. Оптимальным можно считать следующее соотношение мучных компонентов пряников: содержание муки тритикалевой обдирной 53,0–55,0 %, содержание муки пшеничной первого сорта 40,0–42,0 %; крахмала 4,5–5,0 %. В этом случае намокаемость пряников составляет 180–185 %. Химический состав готовой продукции позволяет отнести пряники «Ажурные» к группе изделий диабетического и лечебно-профилактического назначения.

На основании проведенных комплексных исследований можно рекомендовать предприятиям кондитерской промышленности новые рецептуры пряников диабетического назначения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пономарева, Е.И. Мониторинг потребительских предпочтений людей пожилого возраста на рынке хлебобулочных изделий / Е.И. Пономарева, Н.М. Застрогина, А.А. Грибоедова // Хлебопродукты. 2014. № 5. С. 47–49.

2. Тертычная Т.Н. Сдобное печенье высокой пищевой ценности из муки тритикале / Т.Н. Тертычная // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2009. – № 2. – С. 40–43.

3. Шевцов А.А. Выбор рациональных параметров процесса ультрафильтрации инулиназы Bacillus polymyxa 29 / А.А. Шевцов, А.И. Ключников, А.В. Дранников, И.В. Мажулина // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2013. – № 7. – С. 30–33.

4. Топинамбур – нетрадиционное сельскохозяйственное сырье / О.С. Корнеева, Н.А. Жеребцов, Т.Н. Тертычная, Ю.С. Сербулов, К.В. Харченков // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. 1994. № 4. С. 67–68.

УДК 616.69–008.6

РАЗРАБОТКА НАПИТКОВ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО НАЗНАЧЕНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМПЛЕКСА L-КАРНИТИНА И ВИТАМИНА Е

Г.А. Аюпова[1,2], Л.А. Хасанова[1], Р.Ф. Ахметов[2], З.М. Хасанова[1]

[1] Башкирский государственный педагогический университет имени М. Акмуллы, Уфа, Россия
[2] Республиканский медико-генетический центр, Уфа, Россия

Рассматривается разработка напитков функционального назначения с использованием комплекса L-карнитина и витамина Е для профилактики мужского бесплодия на основании результатов, полученных в процессе изучения влияния комплекса L-карнитина и ацетил-L-карнитина в сочетании с альфа-токоферола ацетатом на качественные и количественные показатели спермограмм у мужчин с различными формами патозооспермии.

В результате проведенных исследований достоверно установлено влияние данного комплекса на качественные и количественные показатели спермограмм у мужчин с патозооспермией. Через 3 месяца применения комплекса L-карнитина и ацетил-L-карнитина в сочетании с альфа-токоферола ацетатом наблюдалось более чем двух кратное увеличение доли сперматозоидов с поступательным движением, при этом рост концентрации сперматозоидов в эякуляте увеличивался в два-три раза, а также имело место увеличение доли морфологически нормальных форм сперматозоидов более чем в два раза.

Известно, что недостаточное присутствие L-карнитина и фруктозы в эякуляте может являться одной из причин патозооспермии [1]. Следовательно, нормализация содержания L-карнитина и фруктозы является важным фактором улучшения количественных и качественных показателей эякулята.

Высокая эффективность применения комплекса ацетил-L-карнитина и L-карнитина в комбинации с альфа-токоферола ацетатом при бесплодии у мужчин объясняется тем, что альфа-токоферола ацетат угнетает свободнорадикальные реакции, стимулируя синтез цитохромов, каталазы и пероксидазы, следствием чего являются улучшение метаболических процессов в тканях придаточных половых желез и ликвидация продуктов перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот и липидов, повреждающих клеточные мембраны сперматозоидов [1,2].

Таким образом, использование комплекса L-карнитина и витамина Е в пищевых рационах и, особенно его применение при разработке продуктов и, в частности, напитков функционального назначения, является эффективным инструментом коррекции мужского бесплодия и различных форм патозооспермии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградов И.В., Капто А.А., Афанасьева Л.М. Опыт применения карнитина у больных с идиопатической патоспермией // Проблемы репродуктологии, 2009. – С. 76–77.

2. Costa M., Canale D, Filicori M.D., Iddio S., Lenzi A. L-carnitine in idiopathic asthenozoospermia: a multicenter study //Andrologia, 1994. -26(3). – P.155–159.

УДК 66.665.2

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ ЛИНИИ ПЕРЕРАБОТКИ СЕМЯН МАСЛИЧНЫХ КУЛЬТУР В БИОДИЗЕЛЬНОЕ ТОПЛИВО

А.А. Шевцов[1], Т.Н. Тертычная[2], В.В. Ткач[3], Н.А. Сердюкова[3]

[1] Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия
[2] Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I, Воронеж, Россия
[3] Военный учебно-научный центр Военно-воздушных сил «Военно-воздушная академия имени профессора Н.Е. Жуковского и Ю.А. Гагарина», Воронеж, Россия

В технологии комплексной переработки растительного масла все более широкое применение находят тепловые насосы, которые позволяют довести эксплуатацию оборудования до высокого энергетического совершенства в отношении рационального использования энергоносителей. Повышение эффективности теплонасосных установок за счет совершенствования их рабочих циклов и схем составляет основу современных исследований в области теплонасосных технологий. Идеология создания тепловых насосов (ТН) базируется на масштабном опыте разработки холодильных машин (ХМ), что не всегда оправдано, так как температурные режимы работы, охлаждаемые и нагреваемые среды, рабочие тела и термодинамические циклы, условия конкурирования на рынке теплоты и холода для ТН и ХМ в общем случае различаются. Для оценки их эффективности используются различные показатели, недостаточно полно отражающие специфику многих перспективных предложений при совместной выработке тепла и холода. Это делает необходимым разработку и использование универсальных подходов анализа и поиска решений по повышению эффективности ТН и теплоснабжающих систем на их основе [1, 2].

Цель работы – разработка энергетически эффективной линии комплексной переработки семян масличных культур за счет максимальной рекуперации и утилизации вторичных энергоресурсов в замкнутых термодинамических циклах по материальным и тепловым потокам с использованием парокомпрессионного теплового насоса.

В работе предложена линия переработки семян рапса в биодизельное топливо из семян рапса с применением парокомпрессионного теплового насоса. Линия включает следующие технологические операции мойку, сушку, измельчение, обжарку и форпрессование семян, фильтрацию масла, вымораживание восковых веществ, переэтерификацию масла и его разделение на биодизель и глицерин. Особенность эксплуатации линии заключается в том, что подготовка сушильного агента, хладагента для вымораживания восковых веществ, перегретого пара для обжарки измельченных семян в парокомпрессионном тепловом насосе позволяет обеспечить надежность эксплуатации оборудования на заданном уровне качества получаемого биодизельного топлива; максимально снизить выброс отработанных теплоносителей в окружающую атмосферу; использовать теплоту конденсации хладагента в конденсаторе и температуру кипения хладагента в испарителе теплового насоса для подготовки теплоносителей в замкнутых термодинамических циклах, что обеспечит снижение удельных энергозатрат на 15–20 %.

Парокомпрессионный тепловой насос обеспечивает необходимую производительность трубчатого конденсатора с высокой рабочей температурой воздуха для последующего его использования для сушки семян, а также для нагрева воды, смешиваемой с измельченной выжимкой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Савченко Т.В. Управление производством масличных культур на основе кластерного подхода / Т.В. Савченко, А.В. Улезько, Н.Н. Кравченко. – Воронеж: ВГАУ, 2013. – 160 с.

2. Шевцов А.А. Разработка высокоэффективной линии комплексной переработки семян масличных культур / А.А. Шевцов, Т.Н. Тертычная, В.В. Ткач, Н.А. Сердюкова // Актуальная биотехнология. – 2018. – № 3 (26). – С. 517.

УДК 637.1

НАУЧНЫЕ ПОДХОДЫ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ – ВАЖНЫЙ ШАГ В ВЫПОЛНЕНИИ ФЕДЕРАЛЬНОГО ПРОЕКТА «УКРЕПЛЕНИЕ ОБЩЕСТВЕННОГО ЗДОРОВЬЯ»

В.И. Ганина

Московский государственный университет технологий и управления имени К.Г. Разумовского, Москва, Россия

Укрепление общественного здоровья – одно из приоритетных направлений государственной политики в России и это подтверждается рядом принятых законов, постановлений, федеральных проектов, национальных программ и других документов [1, 2, 3]. Активное продвижение решений в данном направлении приносит свои плоды: отношение наших сограждан к своему здоровью по сравнению с тем, что было еще лет десять-пятнадцать назад, постепенно изменяется в положительную сторону. Однако ещё много задач, которые связаны с улучшением здорового образа жизни, формированием вкусовых предпочтений, развития принципов правильного и здорового питания, способствующих активному долголетию, и их следует планомерно решать. Здоровье человека напрямую связано не только с состоянием общественного здравоохранения, но и с самим образом жизни людей, с экологией, с развитием науки, техники, инновационных и цифровых технологий, включая пищевую промышленность.

Характер и привычки питания, его несбалансированность, снижение количества потребляемых микронутриентов с пищей, содержание в ней загрязняющих веществ и другие причины, приводят к увеличению у населения числа неинфекционных заболеваний (НИЗ). В одном из докладов ВОЗ (Независимой комиссии высокого уровня по неинфекционным заболеваниям) подчёркивается необходимость активизации деятельности во всех странах по предотвращению преждевременной смертности от неинфекционных заболеваний и сокращению факторов риска развития НИЗ путём профилактических мероприятий. Питание играет ведущую или значительную роль в развитии заболеваний желудочно-кишечного тракта, ожирения, артериальной гипертонии, атеросклероза и ишемической болезни сердца, сахарного диабета 2-ого типа, злокачественных опухолей, подагры, желчекаменной болезни, панкреотита, аллергических и других заболеваний. Поставлены определенные цели, ряд из которых связаны с питанием, включая коррекцию пищевых рационов и расширение линейки продукции с применением функциональных компонентов [4].

В соответствии с ГОСТ Р 52349–2005 «Продукты пищевые. Продукты пищевые функциональные. Термины и определения» (с Изменением № 1) пробиотические микроорганизмы относят к пищевым функциональным ингредиентам [5]. Об эффективности пробиотичских бактерий сообщается во многих публикациях отечественных и зарубежных авторов. На конгрессе Федерации европейских микробиологических обществ в 2015 году была выдвинута концепция о включении в состав продуктов питания пробиотических консорциумов, реализация которой способствует комплексной профилактике ряда заболеваний. Такое внимание к пробиотическим бактериям обусловлено их благоприятным воздействием на организм человека через нормализацию микробиоты пищеварительного тракта. Известно, что пробиотические бактерии участвуют в выполнении ряда функций в организме человека: защитной; пищеварительной; абсорбционной и детоксикационной; ферментативной и синтезирующей; коррекционной при функциональных нарушениях работы кишечника; способствуют профилактике возникновения язвенной болезни, колитов, канцерогенеза роста опухолей и онкозаболеваний кишечника; генетико-антигенной; иммуномодулирующей и других. Одновременно учёные продолжают исследования по поиску, изучению и подтверждению эффективности новых штаммов пробиотических бактерий с целью создания на их основе более активных пробиотических медицинских препаратов, а также стартовых заквасок для продуктов диетического профилактического питания [6–11]. По мере получения новых данных о свойствах и функциях микробиоты круг штаммов пробиотических бактерий постоянно расширяется. К настоящему моменту в России к пробиотическим бактериям, которые допускается применять в пищевой промышленности относят: представителей родов бактерий *Bifidobacterium ssp*., *Lactobacillus ssp*. и *Propionibacterium spp*. с доказанными пробиотическими свойствами, а также *Lactococcus spp*. и *S. thermophilus* в монокультурах и в ассоциациях с пробиотическими

микроорганизмами. В нашей стране и за рубежом производятся кисломолочные продукты с пробиотическими бактериями уже достаточно долгое время [12,13]. Продолжение и углубление исследований в этом направлении позволяет обосновывать преимущества и недостатки применяемых способов использования пробиотических микроорганизмов в технологии кисломолочной и другой пищевой продукции. К настоящему времени предложены разные способы применения пробиотических бактерий в технологии пищевой продукции. Одним из наиболее распространенных способов является применение пробиотических бактерий для непосредственного процесса сквашивания и / или сквашивания и ферментации перерабатываемого сырья, например молочного. Для этого исследователи предложили следующие технологические приёмы: создание специальных условий питания для активного и непосредственного участия клеток пробиотических культур в процессе ферментации молочного или другого сырья; применение стандартного состава сырья и специальных ростовых добавок; использование культур термофильного молочнокислого стрептококка, симбиотически сочетающихся с бифидобактериями или другими лактобациллами; внесение фермента β-галактозидазы; применение пребиотиков.

В технологии кисломолочной продукции, которая в разных странах мира лидирует по использованию пробиотических микроорганизмов, наиболее часто применяют *Lactobacillus ssp*. и / или *Bifidobacterium ssp*. в сочетании *S. thermophilus и / или Lactococcus spp*. для непосредственного сквашивания молочного сырья. Преимущества данного способа обусловлены содержанием в готовой продукции регламентируемого количества самих клеток пробиотических бактерий и ценных продуктов их метаболизма, которые накапливаются в результате биотехнологического цикла получения продукта. К недостаткам данной биотехнологии следует отнести то, что при употреблении продукции часть клеток пробиотических бактерий погибает и не достигает кишечника – естественной ниши обитания, что приводит к снижению эффективности выполнения функций микроорганизмами и полезных свойств пищевой продукции. Существует технология производства обогащенных видов пищевой продукции, когда пробиотические бактерии вносятся на конечном этапе получения (до фасования или при фасовании продукта в потребительскую упаковку). Данный способ имеет дополнительные недостатки по сравнению с первым способом, заключающиеся в отсутствии продуктов метаболизма пробиотических бактерий и неравномерном распределении клеток в случае внесения заквасочных культур в резервуар практически в готовую продукцию с последующим фасованием в потребительскую упаковку. Для повышения эффективного действия пробиотической пищевой продукции на организм человека некоторые исследователи предлагают применять культуры пробиотиков в инкапсулированной форме, что способствует их большей выживаемости при прохождении пищеварительного тракта и достижения кишечника [14, 15]. К сожалению, данный способ менее распространён из-за отсутствия соответствующего оборудования для получения инкапсулированных форм микроорганизмов на отечественных биофабриках, выпускающих закваски, а также более дорогой цены на импортные закваски таких видов. К научно обоснованному подходу получения продукции с пробиотическими бактериями следует отнести их совместное использование с пребиотиками, т. е. получение синбиотических видов продукции. Однако предложенный способ медленно внедряется на предприятиях в России, поскольку такая технология имеет определенные сложности и приводит к повышению стоимости готовой продукции. Преимущества такого способа очевидны, приводятся в научной литературе и связаны с тем, что пребиотики являются дополнительным фактором, способствующим восстановлению и активизации собственной микробиоты конкретного человека. В последнее десятилетие учёными установлено, что микробиота каждого человека имеет уникальный профиль как по составу, так и функциональной активности. В связи с этим некоторые исследователи высказывают мнение о необходимости расширения линейки пищевой продукции с применением аутоштаммов пробиотических бактерий, которые выделяют из кишечника индивидуального человека.

Рассматривая в целом направление по научному обоснованию применения пробиотических бактерий можно сделать заключение о целесообразности продолжения исследований по выделению, изучению свойств новых штаммов, включая аутопробиотики, для разработки новых видов пищевой продукции, а также исследованию их положительных эффектов на организм человека, способствующих укреплению общественного здоровья.

ЛИТЕРАТУРА

1. Федеральный проект «Укрепление общественного здоровья» (с 2019по 2024 гг.), принятый в рамках Национального проекта Демография, утв. президиумом Совета при Президенте РФЫ по стратегическому развитию и национальным проектам, протокол от 24.12.2018 № 16

2. Указ Президента РФ от 7 мая 2018 г. № 204 "О национальных целях и стратегических задачах развития Российской Федерации на период до 2024 года".

3. Распоряжение Правительства РФ от 25 октября 2010 г. № 1873-р об утверждении Основ государственной политики РФ в области здорового питания населения на период до 2020 г. – 5 с.

4. Время выполнять обещания: доклад Независимой комиссии высокого уровня ВОЗ по неинфекционным заболеваниям, опубл. 20.07.2018 / http:// apps.who.int/ipis/bitstream/handle / 10665/272713/9789244514160-rus.pdf

5. Ганина, В.И. К вопросу о функциональных продуктах питания / В.И. Ганина, И.И. Ионова // Молочная промышленность, 2018, № 3. – С. 44–47

6. Захарова И.Н., Дмитриева Ю.А. Кишечная микробиота и применение пробиотиков с позиции доказательной медицины / И.Н. Захарова, Ю.А. Дмитриева // Consilium Medicum. Педиатрия (Прил.), 2016; 4: 24–28.

7. Шендеров, БА. Кишечная микробиота как источник новых биомаркеров старения // Вестник восстановительной медицины, 2015. – С. 40–47

8. Ардатская, М.Д. Пробиотики, пребиотики и метабиотики в коррекции микроэкологичеких нарушений кишечника/М.Д. Ардатская // Медицинский совет, 2015, № 13. – С. 94–99

9. Prescott, S.L. Biodiversity the human microbiome fnd mental health: moving toward a new clinical ecology for the 21st century / S.L. Prescott, A.C. Logan, R.A. Millstein, M.A. Katszman // *Int. J. Biodiversity*, 2016, 2718275

10. Blum, H.E. The human microbiome. //Advance in Medical Sciences, 2017: 62:414–20.http://dx.doi.org / 01.10.19

11. Charbonneau, M.R. A microbial perspective of human developmental biology / M.R. Charbonneau // Nature, 2016, 535. – P. 48–55

12. Шевелёва, С.А. Пробиотики в пищевой индустрии: нормативная база, перспективы/С.А. Шевелёва // Переработка молока, 2018, № 10. – С. 30–34

13. Шевелёва, С.А. Пробиотики в пищевой индустрии: нормативная база, перспективы/С.А. Шевелёва // Переработка молока, 2018, № 11. – С. 18–21

14. Ананьева, Н.В. Совершенствование технологии пробиотических культур прямого внесения для молочных продуктов/ Н.В. Ананьева // Автореферат диссертации на соискание учёной степени кандидата технических наук, М., 2006. – 26 с.

15. Favaro-Trindate, C.S. Microencapsulation of L.acidophilus (La-05) and B.lactis and evalution of their survival at the pH values of the stomatch and bile / C.S. Favaro-Trindate, C.R. Grosso // J Microencapsulation, 2002, 19(4). – P.485–94

УДК 636.087.73 + 636.086.78 + 664

ДИГИДРОКВЕРЦЕТИН И АРАБИНОГАЛАКТАН – ПРИРОДНЫЕ БИОРЕГУЛЯТОРЫ, ПРИМЕНЕНИЕ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ И ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Ю.П. Фомичев, Л.А. Никанова

ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им Л.К. Эрнста, Подольск, Россия

Дигидрокверцетин (ДКВ) относится к биофлавоноидам, которые представляют разнообразную группу растительных полифенольных соединений, в основе структуры которых лежит дифенилпропановый углеродный скелет. ДКВ обладает плеотропными свойствами, регулирует метаболические процессы, оказывает положительное влияние на функциональное состояние внутренних органов организма, создает механизмы защиты здоровых клеток организма от патологий, вызываемых химическими отравлениями, воздействием электромагнитного излучения и радиации, путем нейтрализации радикальной активности, процессов вирусной и бактериальной природы. Он не токсичен, безвреден, обладает высокой активностью при небольших концентрациях, устойчив к тепловым и механическим воздействиям. Признан как эталонный антиоксидант и широко применяется в медицине и пищевой промышленности [1, 2]. ДКВ в настоящее время используется

более чем в 100 биологически активных добавках к пище и лекарственных средств, а также в продуктах питания и косметической продукции, которая подвержена процессам окисления. Он также необходим для животных, особенно при их разведении и производстве продукции животноводства в техногенных по тяжелым металлам (Pb, Cd, As, Hg и др.) и радионуклидам ($^{9\circ}$ Sr, ^{137} Cs), территориях, а также подверженных загрязнениями промышленных предприятий химической, металлургической, нефтехимической и других видов промышленности. На основе ДКВ разработаны кормовые добавки «Экостимул-1» и «Экостимул-2» предназначенные для повышения продуктивности и сохранности сельскохозяйственных животных и птицы. «Экостимул-1» содержит 1,0–2,0 % ДКВ и в качестве носителя разноволокненную древесную массу комлевой части лиственницы. «Экостимул-2» содержит от 77 до 88 % ДКВ и около 10 % сопутствующих биофлавоноидов (аромадендрин 2,0–4,0 %, эриодиктиол 0,3–0,7 %, кверцетин 0,5–1,0 %, нарингинин 0,6–0,9 %, кемпферол 0,3–0,7 %, пиноцембрин 1,2–1,7 %). Введение в рацион сельскохозяйственных животных и птицы «Экостимул-2» оказывает положительный эффект при иммунодефицитном состоянии, бронхолегочной патологии и нарушении функционального состояния печени и др., которое является, как правило, следствием воздействия на организм неблагоприятных факторов среды и технологий, неадекватных физиологии сельскохозяйственных животных. В настоящее время проведены широкие исследования эффективности применения ДКВ в молочном скотоводстве, свиноводстве, птицеводстве, пчеловодстве, кролиководстве и звероводстве. Эффективность его применения в зонах, загрязненных радионуклидами и тяжелыми металлами, на дойных коровах и телятах проявилась в повышении выведения из организма поллюантов, резистентности и продуктивности животных. Положительное влияние ДКВ на организм животных проявляется как в период действия неблагоприятных факторов среды, так и в период действия технологических факторов [3]. Уникальные свойства ДКВ позволяют широко использовать его в пищевой промышленности для увеличения сроков хранения исходного сырья для производства пищевых продуктов и самих продуктов, содержащих жиры; придания пищевым продуктам лечебно-профилактических свойств; увеличения сроков годности жиров и растительных масел; увеличения сроков годности сухого, сгущенного молока и других молочных продуктов; в частности, сливок, мороженого, сметаны, йогуртов, а также предохраняет овощи, фрукты и продукты их переработки от потемнения и преждевременного гниения. Введение ДКВ в жиросодержащие продукты питания продлевает срок их годности в несколько раз и придает им ярко выраженные оздоровительные свойства, потребление таких продуктов мягко повышает активность иммунной системы организма естественным и физиологичным путем. ДКВ, введенный в состав пищевых продуктов, особенно необходим для населения, проживающего в экологически неблагополучных районах. При регулярном потреблении продуктов с ДКВ предохраняется печень от разрушения вирусами и различными токсичными веществами, выводятся токсины, радионуклиды и соли тяжелых металлов естественным путем. В настоящее время разработан ГОСТ 33504–2015, Дигидрокверцетин, ТУ, введен с 01.01.2017 г.

В пищевой промышленности ДКВ широко используют в качестве антиокислителя, позволяющего увеличить срок годности продукта. Применение ДКВ в молочной промышленности обусловлено тем, что он предотвращает процесс самоокисления продуктов питания и увеличивает продолжительность срока их хранения в 1,5 – 4 раза, сохраняет первоначальные органолептические показатели более длительное время. Так, например, срок годности йогурта увеличивает до 60 суток, майонеза до 30 суток, мороженого в 2–3 раза, сметаны до 40 суток сыра плавленого до 120 суток, продуктов, изготовленных из сухого молока жирностью 25 % в 1,5 – 2 раза, сухого молока, сухого цельного молока до 2 лет, соево-молочного концентрата – до 12 месяцев, творога сублимационной сушки – в 2 раза. ДКВ способствует торможению процесса развития микроорганизмов в готовой продукции. В частности, оказывает ингибирующее действие на золотистый стафилококк (S.aureus) на 90 %; липолитических микроорганизмов от 44 до 88 %; бактерий L.monolcytogenes на 30 %, E.coli на 12 %. угнетает дикие дрожжи рода Rhodotorula, молочнокислые бактерии и бактерии группы Aicyclobacillus acidoterrestris [4,5,]. В настоящее время комиссия Совета Европы приняла решение о применении в пищевой промышленности дигидрокверцетиа (таксифолина) в качестве нового пищевого ингредиента в странах ЕС. (Official Journal of the European Union. L 295/1. EN.14.11.2017).

Арабиногалактан – комплексный природный водорастворимый полисахарид, экстрагируемый из древесины лиственницы разных видов. Представляет собой аморфный порошок белого, или бледно-серого, или бледно-кремового цвета, без вкуса и запаха. [6]. Арабиногалактан (АГ) относится к группе гидрокарбонатных соединений. Состоит из цепочечных соединений галактозы и арабинозы,

соединенных между собой бета-гликозидными связями. Содержится в ряде фруктов, моркови, редисе, пшенице, зернах кофе, эхинацее. Однако уникальным источником АГ является лиственница. Именно она дает возможность получить АГ с наиболее полезными свойствами. По физико-химическим свойствам АГ характеризуется низкой вязкостью, высокой клейкостью, отсутствием острой и хронической токсичности, влагоудерживающим эффектом, биоразлагаемостью, устойчивостью в кислой среде и при температурной обработке. АГ обладает широким спектром биологических свойств, включающих: иммунобиологическую, гепатопротекторную, гастропротекторную, митогенную (стимулирует размножение клеток селезенки и костного мозга) и мембранотропную активность; микогенные, пребиотические, гиполипидемические свойства; способность активации окислительного метаболизма клетки и диспергирующего действия; является источником пищевой клетчатки. АГ повышает синтез жирных кислот с короткой цепью, что делает клетки толстой кишки более устойчивыми к опухолевому росту и заболеваниям кишечника. Уменьшает клетки метастаза. Обладает противоопухолевой активностью. Он ферментируется в толстом кишечнике с образованием короткоцепочечных кислот, которые укрепляют защитные силы слизистой кишечника против ряда заболеваний и воздействия канцерогенов. Стимулирует цитоксичность клеток против опухолевых клеток, поддерживает дружественную микрофлору.

Применение АГ в ветеринарии в настоящее время особо актуально, в связи с запретом использования в животноводстве ряда антибиотиков. Испытаниями на телятах, поросятах и бройлерах установлено, что АГ поддерживает в желудочно-кишечном тракте животных уровень бифидобактерий и лактобацилл, за счет чего улучшается эффективность питания, повышаются привесы, снижается потребность в обычных антибиотиках. При суточной дозе 6 г наблюдалось повышение привесов у телят на 5 % без случаев диареи. По данным J. Richards (2001) применение 5 %-го раствора экстракта из древесины лиственницы Даурской в обработке мяса и тушек бройлеров оказывало супрессивное действие на рост salmonella и E.coli на уровне 30–70 % в зависимости от условий применения. Предполагается, что механизм действия связан с эмульгирующим и стабилизирующим свойствами, которые делают поверхность бактериальных клеток более чувствительными к действию второго компонента экстракта полифенолов. Являясь источником растворимых диетических волокон, АГ улучшает питание, всасывание и сохранение в здоровом состоянии желудочно-кишечного тракта и может рекомендоваться как нутрицевтик или функциональная добавка к пище в ежедневной диете. С клинической точки зрения это очень привлекательный продукт; регулярный прием его может поддерживать нормальный иммунитет не только через прямое воздействие, но и через эффекты на бактерии кишечника, которые, в свою очередь, помогают сложной иммунной системе человека функционировать более надежно. Благодаря диспергирующей хорошей способности АГ может использоваться для приготовления пищевых продуктов (йогурт, соки, напитки, сухое молоко, кондитерские изделия), обогащенных минеральными добавками (йодид калияфосфат или карбонат кальция, соединения железа, цинка, селена) и витаминами (А, С, D, Е, комплекс витаминов В). Эти продукты являются источником растворимых диетических волокон, а также биодоступных витаминов и микроэлементов, с сохранением вкусовых качеств. Показана перспективность использования АГ с добавками известных антиоксидантов ДКВ и кверцетина для увеличения сроков хранения продуктов питания. Всестороннее изучение воздействия средств химической защиты не только на сорные растения, но и на культуру, включающее познание стратегий развития и выживания видов возделываемых растений, должно помочь выбору химических препаратов и технологий их применения. Перспективное направление в защите сельскохозяйственных культур – использование «растительных» препаратов, созданных на основе тритерпеновых и других органических кислот, полученных из хвойных растений.

Эти препараты обладают четко выраженными ростостимулирующим иммунизирующим эффектами. Применение хвойных экстрактов стимулирует устойчивость картофеля к абиотическим стрессорам и грибным заболеваниям. К данной группе веществ с ростмодулирующими свойствами относятся полисахариды. Одним из перспективных веществ этой группы является АГ. Благодаря значительному содержанию в растительном сырье и уникальным свойствам водорастворимый АГ занимает особое место среди полисахаридов. АГ в пищевой промышленности применяется благодаря высокой растворимости, водоудерживающей и жиросвязывающей способности. АГ хорошо растворим как в горячей, так и в холодной воде. В течение 15 минут можно растворить от 14 до 50 г. АГ в 100 мл. воды при температуре от 0 до 90º С. АГ также растворим в водно-этиловой среде, но он не растворим в маслах и практически не растворим в чистом этиловом спирте. Водоудерживающая способность

АГ особенно важна при производстве мучных кондитерских изделий диетического назначения. Жиросвязывающая способность АГ составляет в среднем 85 %. Ряд исследований показали, что высокоочищенный АГ обладает бактерицидными свойствами. АГ стимулирует фагоцитарную активность микрофагов в отношении псевдотуберкулезных микробов штамма Yersinia pseudotuberculosis И-716, оказывает выраженное ингибирующее действие на размножение псевдотуберкулезных микробов внутри микрофагов, повышает активность НАДФН – оксидазы и супероксиддисмутазы, активирует окислительный метаболизм клетки и тем самым усиливает бактерицидный эффект в отношении поглощенных микроорганизмов. Обладая свойствами пребиотика АГ поддерживает баланс микрофлоры желудочно-кишечного тракта. Являясь источником растворимых диетических волокон, АГ улучшает питание, всасывание и сохранение в здоровом состоянии ЖКТ и может рекомендоваться как нутрицевтик или функциональная добавка к пище в ежедневной диете, способствует образованию короткоцепочечных жирных кислот, чрезвычайно важных для нормальной работы организма. Физико-химические и биологические свойства АГ во многом определили сферы использования его в пищевой промышленности, в которой он используется в трех направлениях: в качестве загустителя, желатирующего агента и стабилизатора. АГ используют как источник пищевой клетчатки. Обладая гигроскопичностью, АГ благоприятно влияет на перевариваемую пищу, что помогает избежать некоторых заболеваний толстой кишки. Пищевые волокна способствуют созданию благоприятных условия для развития полезных лактобактерий. В качестве пищевой добавки при создании продуктов с парафармацевтическими свойствами. АГ применяют в хлебопекарной и кондитерской промышленности и при производстве безалкогольных напитков.

Функциональное питание Одним из биологических свойств ДКВ является снятие утомления после физических нагрузок. Оптимальное сочетание утомления и восстановления – физиологическая основа тренировки, главное условие адаптации организма к физическим нагрузкам и повышения спортивной работоспособности. Составной частью системы восстановления является спортивная фармакология. Препарат ДКВ при курсовом применении (на лыжниках высшей квалификации) в течение 4-х месяцев поддерживал общую и спортивную работоспособность, позитивно влиял на факторы лимитирующие необходимые физические нагрузки. Препарат позволяет сохранить массу тела при высоких физических нагрузках без применения стероидных препаратов, запрещенных МК МОК. Препарат не содержит допинговых компонентов и может быть рекомендован для широкого применения в спортивной медицине, а также при занятиях физической культуры с целью расширения границ адаптации к физическим нагрузкам В НИИ Спорта РГУФКСМИТ было изучено влияние препарата ДКВ на физическую работоспособность высокопрофессиональных спортсменов циклических видов спорта» По результатам исследования были сделаны рекомендации [7,8]. Применение ДКВ длительностью 2–3 недели способствует увеличению аэробных возможностей мышц спортсменов высокой квалификации циклических видов спорта, а также скорости восстановления после интенсивных физических нагрузок. Рекомендуется использовать ДКВ, как эффективного природного и безопасного антиоксиданта, капилляропротектора и иммуномодулятора в видах спорта, связанных с проявлением как локальной, так и глобальной мышечной выносливости в периоды интенсивных тренировок, направленных на увеличение аэробных возможностей мышц.

Растениеводство. На основе ДКВ разработан регулятор роста растений «Лариксин», ДКВ и АГ в сочетании 1: 3 – регулятор роста с фунгицидным действием «Эко-Ларикс», АГи гербицидов – гербецидные составы.

Лариксин благодаря основному действующему веществу ДКВ, оказывает комплексное положительное воздействие на растения: ускоряет прорастание семян и повышает их всхожесть и активность начального роста, ускоряет рост корневой системы и увеличивает ее массу в 1,5–2 раза, ускоряет созревание, наступление биологической и технологической зрелости, увеличивает устойчивость к заморозкам до 3–6° С., снижает грибковую и бактериальную заболеваемость растений в 3–5 раз, увеличивает урожайность на 12–35 %, способствует уменьшению потерь при хранении. Лариксин оказывает положительные действия при его применении на посевах сои, сахарной свеклы, подсолнечника, ячменя, пшеницы, картофеля, льна-долгунца, винограда, кукурузы, томатов, огурцов, фасоли. Установлено, что Лариксин повышает (индуцирует) у культурных растений экспрессию (активность) генов защиты. Воздействуя на растения биологически активным веществом, повышает активность генов стрессоустойчивости, тем самым синтезирует специальные вещества, функцией которых является организация связи между факторами внешней среды и активностью отдельных генов

или их блоков. Лариксин зарегистрирован МСХ РФ, Госхимкомиссией РФ за № 09–00632–0063(0680) – 0 и внесен в Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации.

«Эко-Ларикс». усиливает устойчивость культурных растений к болезням и неблагоприятным климатическим условиям, оказывает стимулирующее действие на иммунную систему растений, предотвращая и снижая в значительной степени поражение растений грибковыми и бактериальными болезнями. Его применение на сельскохозяйственных культурах увеличивает урожайность, улучшает качество продукции, увеличивает полевую всхожесть и сохранность растений к моменту уборки. Результаты полевых испытаний показали, что применение Эко-Ларикса на сорте сои Даурия была получена достоверная прибавка урожайности семян по сравнению с контролем на 3,6 ц/га Обработка также способствовала повышению содержанию в семенах белка на 5,9 % и жира на 8,0 %. (№ Госрегистрации 253–07–331–0; ТУ 2449–022–70692152–2013.)

Гербицидные составы с – лавитол-арабиногалактаном (пивот + пульсар + АГ, фабиан + базагран + АГ, хармони + галаксиТОП + АГ, галаксиТОП + арама + пульсар + АГ, глифосат + АГ и дикват + АГ) : применяются для лечения заболеваний:

– пшеницы (озимая и яровая), ячменя ярового, картофеля, льна-долгунца, свеклы сахарной.

Микробиологическое удобрение «БиоБеСтА» – инокулят., представляет собой жидкость с содержанием азот – фиксирующих бактерий Sinorhizoblum fredll, которые обладают высокой адаптационной возможностью, и способностью быстрому наращиванию биомассы в условиях отличных от оптимальных и активной фиксации атмосферного азота, что может обеспечивает биологическим азотом растения на 65–80 % от общей потребности. (№ Госрегистрации 253–19–318–1, ТУ 9291–026–70692152).

Дигидрокверцетин и арабиногалактан – природные биорегуляторы при применении в различных отраслях АПК оказывают положительное влияние на сохранность, продуктивность и безопасность продукции животноводства и растениеводства, увеличивают сроки годности продукции пищевой промышленности, являются ценными ингредиентами в разработке и производстве продукции с парафармацевтическими свойствами [9].

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабкин, В.А. Биомасса лиственницы: от химического состава до инновационных продуктов. / Бабкин, В.А., Остроухова, А.А., Трофимова, Н.Н. Отв.ред. Семенов А.А.; Рос.акад. наук, Сиб. отд-ние, Иркутский ин-т химии им. Фаворского А.Е. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2011. – 236 с.

2. Даурский А.М., Колесник Ю.А., Руленко И.А., и др. Использование дигидрокверцетина как антиоксидантной пищевой добавки для получения кондитерских изделий лечебно-профилактического назначения // 3-й Международный симпозиум «Экология человека: проблемы и состояние лечебно-профилактического питания, – Москва, 1994, – С. 189–192.

3. Фомичев Ю.П., Никанова Л.А., Торшков А.А. Природные кормовые добавки «Экостимул» и «Арабиногалактан» в экологии, продуктивном использовании животных и птицы в комбикормовой промышленности. Практическое наставление. Из-во ВИЖ. 2010. 76 с.

4 Решетник Е.И. Обоснование и разраблотка технологии производства пищевых продуктов с применением д игидрокверцетигна // Вестник Даль– ГАУ, 2007, Вып.1, С. 135–137.

5. Семенова А.А., Антиокислители нового поколения для мясной промышленности / А.А. Семенова, В.В. Насонова // Мясная индустрия. – 2006. – № 3, с. 47–50.

6. Медведев Е.Н., Бабкин В.А., Остроухова Л.А. Арабиногалактан лиственницы – свойства и перспективы использования (обзор). // Химия растительного сырья. – 20–3, – № 1, – С. 27–37.

7. Вальтер Г.Ф., Лисин П.А. Функциональные продукты питания: теоретические и практические аспекты развития // Современные технологии продуктов питания: теория и практика производства, // Материалы международного научно-практического семинара – Омск, Вариант-Омск. -2010, 336 с.

8. Левушкин С.П., Сарсания С.К. Влияние препарата «Таксифолин» (дигидрокверцетин) на физическую работоспособность высокопрофессиональных спортсменов циклических видов спорта. -2013 http://dic.academic.ru/dic.nsf/enc medicine / 29799/l

9. Фомичев Ю.П., Никанова Л.А., Дорожкин В.И. и др. Дигидрокверцетин и арабиногалактан – природные биорегуляторы в жизнедеятельности человека и животных, применение в сельском хозяйстве и пищевой промышленности. М.: Издательский дом «Научная библиотека» 2017, 701 с.

УДК 631.861

ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕРЕРАБОТКИ ЖИРОСОДЕРЖАЩЕГО ШЛАМА С ПОМОЩЬЮ ВЕРМИКОМПОСТИРОВАНИЯ

Я.А. Масютин, М.С. Кожикин

Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, Калининград, Россия,

В настоящее время в Калининградской области ведётся работа по созданию и совершенствованию технологий утилизации различных видов промышленных и бытовых отходов, в том числе и отходов пищевой промышленности. По состоянию на 2018 год даны поручения Президента РФ по ликвидации незаконных свалок и созданию индустрии переработки отходов [1]. В Калининградской области предприятия по переработке мяса скота и мяса птицы используют нормированные технологии по утилизации сточных вод и шлама после обращения с сырьём, из которого изготавливают готовые продукты, в т. ч. полуфабрикаты. Однако потенциал по дальнейшему использованию продуктов переработки, в частности производственного жиросодержащего шлама не реализуется в полной мере.

В Калининградской области на сегодняшний день наблюдается активное развитее сельского хозяйства [2]. В связи с этим происходит увеличение отходов производств, непосредственно связанных с сельским хозяйством. Примером таких отходов является жиросодержащий шлам, утилизация которого является серьезной проблемой для предприятий пищевой промышленности. Одним из оптимальных способов решения проблемы утилизации жиросодержащего шлама является его вермикомпостирование [3]. Продуктом вермикомпостирования органических отходов является биогумус (биоудобрение), который содержит множество питательных веществ для растений, а также более эффективен, чем навоз, компост и др. [4]. Предприятия, применяя вермикомпостирование, как способ дальнейшей переработки органических отходов, не только улучшают экологическую обстановку, но и создают дополнительный продукт – биоудобрение, имеющий добавленную стоимость.

Для исследования возможности переработки жиросодержащего шлама с помощью вермикомпостирования был предоставлен опытный образец от предприятия Калининградской области по переработки мяса птицы. Производственный жиросодержащий шлам состоит из продуктов переработки мяса птицы (панировочные сухари, мука, растительные и машинные масла, крахмал, специи, белок, молочные продукты, пищевые волокна, овощи и мясо мелкодисперсного состояния), фекалий и продуктов переработки сточных вод (коагулянты, активный ил).

Образец шлама после фильтр-пресса был исследован на количественное содержание влаги, сухого остатка, белков, жиров и углеводов согласно МУ 4287–86 «Методические указания по гигиеническому контролю за питанием в организованных коллективах» (Таблица 1).

Таблица 1 – Результаты определения химического состава образца производственного шлама

Наименование показателя	Значение показателя, % мас.	Метод испытания
Содержание сухого остатка	30,8	ГОСТ Р 57758 – 2017
Массовая доля золы	3,2	МУ № 4287–86 (Москва 1986 г.)
Массовая доля белка	5,0	МУ № 4287–86 (Москва 1986 г.)
Массовая доля сырого жира	66,0	МУ № 4287–86 (Москва 1986 г.)
Массовая доля углеводов	25,8	МУ № 4287–86 (Москва 1986 г.)

Также был изучен липидный состав образца методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС) (Таблица 2) с помощью газового хроматографа Agilent Technologies 7890B с масс-спектрометрическим детектором Agilent Technologies MSD 5977B, колонка HP-5, 30 м.

Таблица 2 – Результаты изучения липидного состава методом ГХ-МС

Наименование компонентов	Содержание, % мас.	Метод испытаний
Метиловый эфир пальмитиновой кислоты	8,781	ГОСТ 31663–2012
Метиловый эфир 9,12–октадекадиеновой (Z, Z)–(линолевой) кислоты	20,353	
Метиловый эфир 7-октадеценовой кислоты Метиловый эфир 8-октадеценовой кислоты Метиловый эфир 9-октадеценовой (олеиновой) кислоты	63,024	
Метиловый эфир 11 – октадеценовой кислоты	3,970	
Метиловый эфир стеариновой кислоты	2,560	
Метиловый эфир 11 – эйкозеновой кислоты	1,134	
Прочие компоненты	0,178	

Таблица 3 – Параметры процесса обработки производственного шлама при аэрировании в смеси с активным илом и целлюлозным наполнителем.

№ пробы	Объёмное соотношение компонентов (шлам: активный ил: опилки)	Температура обработки, °С	Давление подачи воздуха, бар	Продолжительность обработки шлама, сутки	Поддержи-ваемая влажность шлама
1	1:1:1	60	0,5	30	70–80 %
2	1:1:4	60	0,5	30	70–80 %
3	1:1:1	20	0	30	70–80 %
4	1:1:4	20	0	30	70–80 %

Следующим этапом проводилась обработка производственного шлама при аэрировании воздухом в смеси с активным илом и целлюлозным наполнителем (древесные опилки) согласно патенту «Способ обработки жиросодержащих осадков сточных вод» с целью наиболее полного разложения исходных органических веществ до безопасных соединений, которые могут быть переработаны с помощью вермикультуры в биогумус [5]. В ходе проведения экспериментов параметры обработки шлама варьировались для установления оптимальных значений применительно к исследуемому производственному шламу. Изучаемые параметры переработки представлены в таблице 4.

В результате исследования по органолептическим показателям и поведению вермикультуры при добавлении к ней проб было установлено, что наиболее полное окисление органических веществ наблюдалось при температуре 60 °С. Различное соотношение производственного шлама и целлюлозосодержащего наполнителя незначительно влияет на полноту окислительных реакций. К тому же соотношение 1:1:4, соответственно, затрудняет перемешивание и аэрацию проб. Также для полноты протекания процесса вермикультивирования предпочтительна подача воздуха под давлением (0,5 бар), т.н. принудительная аэрация, в сравнении с проведением обработки на воздухе.

В дальнейшем обезвреженный шлам смешивался с субстратом (питательная среда для вермикультуры, состоящая из почвы, торфа и компоста) в пропорции 1:1. Вермикомпостирование проводилось с помощью дождевых червей *Eisenia fetida* марки «Старатель» в течение 1–3 месяцев до визуального исчезновения шлама и неприятного запаха.

С помощью микробиологических индикаторов была оценена возможность переработки испытуемого шлама с помощью вермикомпостирования. Такими индикаторами являются микроорганизмы, входящие в состав копролитов червей. Наличие их в анализируемом образце указывает, что был произведён процесс вермикомпостирования [6].

Для микробиологического испытания были отобраны 2 образца: субстрат червей – образец № 1 и вермикомпост (шлам и субстрат в пропорции 1:1 после проведения вермикомпостирования) – образец № 2, которые были сравнены с торфо-минеральным грунтом без биогумуса (вермикомпоста) (Универсальная почвенная смесь «Золото флоры») – образец № 3 [6]. Образцы анализировали по показателям, указанных в Таблице 4 [7].

Таблица 4 – результаты изучения микробного и грибкового состава образцов

Показатель	Метод	Численность		
		Образец № 1	Образец № 2	Образец № 3
Общее микробное число, $N\times10^4$	Методом прямого посева на мясопептонном агаре	8790,0 ± 712,6	348,1 ± 30,8	2721,3 ± 480,4
Нитрификаторы, $N\times10^4$	Методом предельных разведений на среде Виноградского	30,5 ± 3,1	5,3 ± 4,5	$<10^2$
Актуальная активность азотобактера, %	Методом Виноградского на безазотистой среде Эшби	96,77 ± 1,9	87,10 ± 1,8	0

В данном ряду образцов, образец № 1 выступал в качестве эталона сравнения поскольку в нем культивировались черви, и он заведомо содержал их копролиты. На основании результатов, представленных в таблице 4, можно сделать вывод о переработке червями жиросодержащего шлама в образце № 2 и, соответственно, о протекании процесса вермикомпостирования. Несмотря на отсутствие принципиальной разницы в значениях общего микробного числа, показатели количества нитрификаторов и актуальной активности азотобактера демонстрируют наличие копролитов червей и, как следствие, возможность безопасной утилизации шлама с образованием биогумуса, экологически чистого удобрения.

Обобщая результаты проведенного исследования, можно сделать следующие выводы:

1. Жиросодержащий шлам предприятия по переработке мяса птицы состоит преимущественно из жиров (66,0 % мас.), а также углеводов (25,8 % мас.) и белков (5,0 % мас.).

2. Липидный состав шлама представлен в основном (более 85 % мас.) метиловыми эфирами ненасыщенных жирных кислот (олеиновой, линолевой и др.), а также метиловыми эфирами насыщенных жирных кислот (пальмитиновой и стеариновой).

3. Оптимальными параметрами переработки жиросодержащего шлама и его вермикультивирования являются следующие: объёмное соотношение компонентов (шлам: активный ил: опилки) – 1:1:1, температура обработки шлама – 60 °С, давление подачи воздуха – 0,5 бар, поддерживаемая влажность шлама – 70–80 %, продолжительность обработки шлама – 30 суток, продолжительность вермикомпостирования – 30–90 суток.

4. В результате микробиологических испытаний было косвенно установлено, что в образцах почвы со шламом присутствуют копролиты дождевых червей, свидетельствующие о протекании процесса вермикомпостирования.

5. Таким образом, процесс вермикомпостирования может быть использован для безопасной утилизации и переработки жиросодержащего шлама предприятий пищевой промышленности Калининградской области.

ЛИТЕРАТУРА

Большая пресс-конференция Владимира Путина – URL: http://www.kremlin.ru/events/president/news/59455 (дата обращения 12.08.2019)

Министерство природных ресурсов и экологии Калининградской области. Государственный доклад «Об экологической обстановке в Калининградской области в 2018 году». Калининград. – 2019. – С. 201.

Суханова И.М. и др. Вермикомпостирование как решение экологической проблемы утилизации отходов животноводства // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2015. – №. 223.

Вахабов А., Тиркашев Л.Я., Мухаммаджонов М.М. Роль биогумуса в ускорении всхода семян сельскохозяйственных культур // Теоретические и прикладные аспекты современной науки". Восьмой международный научный проект. Белгород. – 2015. – С. 18–21. UA 14786 C1, 18.02.1997.

Терещенко Н.Н., Юнусова Т.В., Писарчук А.Д. Микроорганизмы уникальные индикаторы качества вермикомпоста // Достижения науки и техники АПК. – 2012. – №. 5.

Практикум по микробиологии: Учебное пособие для студ. высш. учеб. заведений / Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Изд. Центр «Академия», 2005. – 608 с.

УДК 58.084.2:633.16

ВЛИЯНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА РОСТОВЫЕ ПРОЦЕССЫ ЯЧМЕНЯ

А.В. Платонов[1], И.И. Рассохина[1], Д.Н. Коткова[1], Л.В. Сухарева[1], В.Н. Большаков[2]

[1] Вологодский научный центр Российской академии наук, Вологда, Россия
[2] ООО «БИОТРОФ», Санкт-Петербург, г. Пушкин, Россия

В настоящее время все чаще затрагиваются вопросы развития экологически ориентированного сельского хозяйства, что связано, прежде всего, с массой проблем от традиционного сельскохозяйственного производства, активно использующего химические средства защиты растений, минеральные удобрения. Многие ученые отмечают, что окружающая среда испытывает стресс от человеческой деятельности: почвы деградируют, истощаются, биоразнообразие снижается, инвазионные виды занимают все большие пространства, а у вредных агентов происходит формирование резистентности к химическим действующим веществам. Кроме того, коэффициенты использования растениями действующего вещества из удобрений чрезвычайно низки. Так, усвоение минерального азота не превышает 35–50 %; фосфора – 15–20 %; калия – 25–60 % в зависимости от почвенно-климатических условий выращивания растений. В связи с этим не удивителен интерес растениеводства к достижениям микробиологии [1; 2; 5].

Некоторые ученые отмечают, что «чистое» сельское хозяйство обходится несколько дороже традиционного (продуктивность на 20 % ниже), но это компенсируется качеством продукции и защитой окружающей среды [1]. Неслучайно биопрепараты широко используются во многих странах Западной Европы, США, Китае [3].

Считается, что применение микробиологических препаратов обеспечивает высокую концентрацию полезных форм микроорганизмов в нужном месте и в нужное время. Поэтому активизация микробно-растительного взаимодействия – мощный фактор продуктивного функционирования агрофитоценоза [4]. В процессе такого взаимодействия создаются различные эффекты: стимулирование роста и развития культур, подавление вредных насекомых и возбудителей (в т. ч. могут проявляться ярко выраженные антагонистические свойства к патогенной микрофлоре), ускорение деструкции и минерализации остатков, снижение инфицирования почв [3; 5]. При этом, повышая уровень биологической активности в ризосфере растений путем применения микробных препаратов, увеличивается степень поглощения действующего вещества из минеральных удобрений, что подтверждают исследования некоторых авторов с меченым азотом [2].

Цель нашей работы – изучить влияние биопрепаратов на ростовые процессы ячменя сорта Сонет в условиях Вологодской области. Биопрепараты Натурост, Натурост-Актив, и Натурост-Фосфор созданы на основе живых бактерий и произведены ООО «БИОТРОФ».

Полевые испытания проводили на опытном поле Северо-Западного научно-исследовательского института молочного и лугопастбищного хозяйства, учетная площадь делянок составляла 6 м^2. Обработка растений проводилась путем предпосевного замачивания семян на 2 ч в растворах биопрепаратов в концентрации 1 мл исходного раствора/л и опрыскиванием вегетирующих растений в фазу 3-го листа до появления капель мелкодисперсной росы (концентрация биопрепарата 1 мл/л), контрольный вариант обрабатывался водой. В фазы 3-го листа и начала кущения определяли морфометрические показатели (масса 1 растения, число листьев, площадь листовой поверхности). Измерения проводили в 20-ти кратной аналитической повторности, в таблице представлены средние арифметические значения и стандартные отклонения.

Как видно из данных таблицы 1 морфометрические показатели, на начальном этапе онтогенеза, опытных и контрольных растений различаются незначительно. Так, только у растений, обработанных препаратом Натурост, по сравнению с контролем, на 10 % увеличена сырая и сухая масса. Однако все опытные растения отличаются несколько большей площадью листовой поверхности (выше на 7–11 %), что в последующем могло отразиться на ростовых процессах. При рассмотрении морфометрическиих показателей растений в фазу кущения наблюдается несколько иная картина (табл. 2). У обработанных биопрепаратами растений значительно выше площадь листовой поверхности (на 50–64 % в зависимости от варианта), что происходит как за счет увеличения общей олиствленности, так и за счет повышения площади одного листа. Повышение фотосинтетической поверхности приводит и к увеличению ростовых процессов. Так, у опытных растений сырая масса выше на 30–38 %, сухая – на 29–40 %.

Приём материалов статей по адресу: actbio@mail.ru

Таблица 1 Ростовые показатели растений в фазу третьего листа

Показатель	Контроль	Натурост	Натурост-Актив	Натурост-Фосфор
Сырая масса 1 растения, г	0,249 ± 0,018	0,274 ± 0,020	0,263 ± 0,021	0,244 ± 0,009
Сухая масса 1 растения, г	0,051 ± 0,003	0,056 ± 0,004	0,053 ± 0,005	0,049 ± 0,004
Доля сухого вещества, %	20,50 ± 0,34	20,33 ± 0,69	20,05 ± 0,17	20,10 ± 0,84
Площадь листовой поверхности 1 растения, $см^2$	5,47 ± 0,75	5,97 ± 0,85	6,19 ± 0,38	6,03 ± 0,47

Таблица 2 Ростовые показатели растений в фазу начала кущения

Показатель	Контроль	Натурост	Натурост-Актив	Натурост-Фосфор
Сырая масса 1 растения, г	0,814 ± 0,093	1,066 ± 0,046	1,127 ± 0,109	1,066 ± 0,087
Сухая масса 1 растения, г	0,178 ± 0,028	0,230 ± 0,028	0,254 ± 0,040	0,226 ± 0,035
Доля сухого вещества, %	21,77 ± 0,99	20,97 ± 0,67	22,03 ± 1,02	21,46 ± 1,46
Кустистость, шт.	2,0 ± 0,2	2,4 ± 0,2	2,3 ± 0,1	2,1 ± 0,2
Площадь листовой поверхности 1 растения, $см^2$	13,51 ± 1,57	20,56 ± 2,22	22,77 ± 0,52	22,42 ± 1,54
Количество листьев, шт.	5,1 ± 0,1	6,5 ± 0,4	7,0 ± 0,4	6,4 ± 0,9
Средняя площадь 1 листа, $см^2$	2,63	3,19	3,25	3,53

Более высокие биометрические показатели опытных растений, возможно, обусловлены тем, что используемые биопрепараты созданы на основе живых бактерий, продуцирующих биологически активные вещества и способные подавлять рост болезнетворных бактерий и грибов. Также микробиологические удобрения могут способствовать развитию корневой системы и более эффективному поглощению элементов питания, в том числе труднорастворимых. Можно предположить, что микроорганизмы, входящие в состав биопрепаратов, продуцируют ауксины и цитокинины, однако это требует дальнейшего изучения.

Таким образом, микробиологические препараты Натурост, Натурост-Актив, и Натурост-Фосфор благоприятно сказываются на росте и развитии ячменя в условиях Вологодской области. Однако данные результаты носят промежуточный характер, в дальнейшем в течение вегетационного периода будет изучено влияние биопрепаратов на: суточные приросты растений, морфометрические показатели в фазы трубкования и цветения, структуру урожая (продуктивная кустистость, озерненность, масса зерна с растения, масса 1000 зерен), коэффициент хозяйственного использования и фотосинтетические показатели растений. В зерне будет определено содержание микотоксинов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Болотник, Е.В. Применение биодинамических препаратов в органическом растениеводстве (обзор) / Е.В. Болотник, О.В. Молчан, Ч.А. Романовский, А.А. Шабанов, Э.И. Коломиец // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: сборник научных трудов. – Минск: Белорусская наука, 2017. – Т. 9. – С. 165–182.

2. Волкогон, В.В. Микробные препараты в технологиях выращивания сельскохозяйственных культур как фактор ограничения потерь питательных веществ / В.В. Волкогон, С.Б. Димова, Е.И. Волкогон, И.Г. Короткая, А.В. Пирог // Биологически активные препараты для растениеводства. Научное обоснование – рекомендации – практические результаты: материалы XIV Междунар. науч.-практ. конф., Минск, 3–8 июля 2018 г. – Минск: БГУ, 2018. – С. 55–57.

3. Коломиец, Э. Вклад микробиологической науки в развитие агротехнологий / Э. Комилец // Наука и инновации. – 2016. – № 6 (160). – С. 23–25.

4. Петров, В.Б., Микробиологические препараты в практическом растениеводстве россии: функции, эффективность, перспективы [Электронный ресурс] / В.Б. Петров, В.К. Чеботарь // Бисолби микробные препараты. Библиотека: справочные материалы и другая полезная информация доступная для скачивания. – Режим доступа: http:// bisolbiplus.ru //docs/28.pdf. – СПб, 2017.

5. Петровский, А.С. Микробиологические препараты в растениеводстве. Альтернатива или партнерство? / А.С. Петровский, С.Д. Каракотов // Защита и карантин растений. – М., 2017. – № 2. – С. 14–18.

УДК 573.6.086.835

ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МАКРОБИОТИЧЕСКИХ ПРОДУКТОВ «ДИАХИТ» И «ОПТИМАЛ ВЕС»

Н.А. Кленова, Н.Ю. Орлова[1], Е.А. Повереннова[2]

[1] Самарский национальный исследовательский университет им. С.П. Королева, Самара, Россия
[2] «ИП Повереннова Е.А.»

ВВЕДЕНИЕ

Концепция рационального питания предполагает тщательную сбалансированность питательных компонентов, включение в рацион балластных веществ, витаминов, антиоксидантов и других биологически активных соединений. Наибольший интерес в этом плане представляют макробиотические продукты, изготовляемые из натуральных компонентов, служащих полноценным источником различных биологически активных веществ. Многие производимые макробиотические коктейли служат обычным блюдом при добавлении воды, молока или кисломолочных продуктов. Подобные макробиотические продукты производятся индивидуальным предприятием «ИП Повереннова Е.А.» и реализуются в Самаре и Самарской области. Состав данных коктейлей содержит пищевые волокна, витаминные соединения, антиоксиданты. Вопросы о влиянии данных продуктов на клетки организма человека, а также максимальной эффективности их составов в настоящий момент остаются актуальными.

Целью данного исследования стал анализ технологии производства, состава и биологической активности двух макробиотических коктейлей «ДиаХит» и «Оптимал вес», производимых «ИП Повереннова Е.А.

Технология производства. Производство данных макробиотических продуктов идет по техническим условиям Используемые технические условия распространяются на концентраты пищевые – продукты моментального приготовления экструзионной технологии, изготовленные из пророщенного зерна, круп с добавлением добавок растительного происхождения, пряностей, специй, предназначенные для приготовления блюд путём добавления горячего или холодного кипячёного молока, воды, кисломолочных продуктов.

Продукты моментального приготовления соответствуют требованиям настоящих технических условий и изготавливаться с соблюдением требований Технического регламента Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» ТР ТС 021/2011, утвержденных Решением Комиссии Таможенного Союза 09.12.2011 № 880, по технологической инструкции, рецептурам, утвержденным в установленном порядке.

Фирменное отличие состоит в том, что зерно тщательно промывается и замачивается на 36 часов перед проведением экструдирования. Замачивание сопровождается переходом многих гидролитических ферментов в активное состояние, кроме замачивания этому способствует проращивание. При проращивании начинается процесс расщепления биополимеров, что делает их более легко усвояемыми. В связи с этим в пророщенном зерне отсутствует глютен, синтезируются и активируются фитостерины, накапливаются органические кислоты. Также при замачивании и проращивании семян значительно уменьшается уровень фитиновой кислоты, которая мешает усвоению важных макроэлементов: кальция и магния.

В основе экструдирования лежат несколько процессов: температурная обработка продукта под давлением, механическое деформирование продукта: «взрыв» продукта во фронте ударного разряжения, и, как следствие предыдущих механизмов, изменение химического состава конечного продукта. После тепловой обработки улучшаются вкусовые качества кормовых средств, так как образуются различные ароматические вещества, значительно возрастает активность ферментов для переваримости зерна, а также происходит нейтрализация некоторых токсинов и гибель их продуцентов. Продукт обрабатывают в пресс-экструдере при давлении до 40 атмосфер и температуре до 200 ºС. После этого из экструдера выходит вспученный, пористый продукт в виде жгута (стренга) диаметром 20–30 мм, с объемной массой 100–120 г./см^3 и влажностью около 7–9 %. В процессе экструдирования происходят глубокие деструктивные изменения в питательных веществах. Так крахмал расщепляется до декстринов и сахаров, протеины подвергаются денатурации. В результате такой комплексной обработке получают экструдант с приятным вкусом и запахом. При такой уникальной обработке практически удваивается питательная ценность продукта.

Состав макробиотических коктелей. В состав макробиотического продукта питания «ДиаХит» входит промытое цельное зерно пророщенной зеленой гречихи, мука амаранта, мука из семян льна и мука из семян расторопши. Пищевая ценность на 100 г.: белки – 10 г., жиры – 2 г, углеводы – 62 г., калорийность – 306 кКал, калорийность 1 порции – 25,4 кКал.

Исследуемая биодобавка способствует глубокому очищению организма на клеточном уровне и насыщению всеми необходимыми микроэлементами, стимулирует умственные способности, служит профилактикой снижения иммунитета, улучшает мозговое кровообращение, убирает хроническую усталость. Рекомендуется диабетикам, а также при напряженной умственной работе и тяжелом физическом труде.

Для употребления рекомендуется 1–2 ст. ложки продукта развести в 100–150 мл сока, кисломолочного продукта, теплой воды. Температура не должна превышать 50 °С. Применять 1–2 раза в день до еды или можно заменить 1 прием пищи в любое время.

Биологическая активность продукта определяется составом компонентов. В зернах гречихиотмечается высокое содержания незаменимых аминокислот и почти полностью отсутствует проламин, а также низкое содержание глютелина и глютена. Важным достоинством гречихи является высокое содержание в ее зерне флавоноидов, особенно рутина [1]. Семена гречихи содержат девять жирных кислот, из которых 75 % составляют ненасыщенная масляная и линолевая кислоты, которые обладают антиоксидантной активностью. Белки семян гречихи могут блокировать накопление жира и увеличивать биологическую активность супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы [2].

Мука семян амаранта содержит комплекс физиологически ценных пищевых ингредиентов: белки, липиды, углеводы, моно- и дисахариды, крахмал, пищевые волокна (клетчатка, пектин) и минеральные вещества (кальций, фосфор, магний, калий, натрий, медь и марганец). Семя обогащено ценными аминокислотами, такими как аргинин, треонин, изолейцин, лизин, гистидин, валин и другими. Главная особенность семени амаранта содержание большого количества незаменимой аминокислоты – лизина – 6–7 %. В муке также содержится токоферолы, тиамин и рибофлавин [3].

Проростки семян ячменя в большом количестве содержат витамины Е, С и группы В, клетчатку, хром, литий, калий, железо. Так же здесь обнаруживаются такие микроэлементы как цинк, медь, марганец, никель, ванадий, молибден, бериллий, титан, серебро, селен, кобальт и другими стимуляторы, регулирующие обмен веществ и развитие организма. Антиоксидантная активность проростков часто в сотни раз выше, чем в обычных злаках и растениях, которыми мы питаемся [4].

Семена льна также являются ценным пищевым сырьем, они содержат в своем составе все необходимые для жизнедеятельности человека макро- и микроэлементы: белки, липиды, усвояемые углеводы (сахароза, крахмал, декстрины), пищевые волокна, лигнаны, витамины группы В (B_1, B_2, B_5, РР), витамин С, токоферолы, минеральные вещества (фосфор, калий, магний, железо, марганец, цинк, кальций, натрий). Уникальность семени льна в том, что оно содержит одновременно три группы веществ, важных для здоровья человека: альфа-линоленовую кислоту (растительные омега-3 жирные кислоты), лигнаны и растворимую клетчатку [5].

В семенах расторопши содержаться флаволигнаны, флавоноиды, липиды, эфирные масла, стеролы (холестерол, кампестерол и стигмастерол), органические кислоты, горечи, смолы, слизи, сахара, амины, сапонины и другие вещества [6].

В состав макрококтейля «Оптимал вес» входит промытое цельное зерно пророщенной пшеницы, овсяные отруби, мука из семян льна, мука из семян тыквы, мука из семян расторопши, зеленый кофе, каолин (белая глина). Пищевая ценность на 100 г.: белки – 10 г., жиры – 2 г, углеводы – 62 г., калорийность – 306 кКал, калорийность 1 порции – 25,4 кКал.

Исследуемая биодобавка «Оптимал вес» способствует нормализации веса, очищению организма, улучшению обмена веществ. Применяется: для снижения и поддержания веса, очищения крови от продуктов обмена, снижения уровня сахара в крови, ликвидации воспалений желудочно-кишечного тракта, восстановление микробиоты кишечника, восстановления пораженных токсинами, ядами, вирусами клеток печени.

Растительные компоненты БАД обладают полезными свойствами благодаря содержанию макронутриентов, витаминов и минералов.

Пророщенные зерна пшеницы содержат железо, кремний, калий, кальций, а особенно в нем много селена и марганца. Из витаминов больше всего содержится витаминов Е (основной антиоксидант, замедляющий процессы старения организма), B_6, F и Р. Также пророщенное зерно содержит увеличенное количество биофлавоноидов, являющихся антиоксадантами [7].

Овсяные отруби содержат значительное количество пищевых волокон, в том числе до 6 % β-глюканов, понижающих уровень холестерина и регулирующих сахар в крови.

В муке из семян тыквы до 40% белка, сбалансированного по аминокислотам, которые необходимы для питания пожилых людей. Высокая биологическая и пищевая ценность этой муки в значительной степени обусловлена ее уникальным минеральным составом. Она содержится более 50-ти макро- и микроэлементы (кальций, фосфор, калий, железо, цинк, магний, селен), комплекс витаминов (Е, А, группы В, С и др.), каротиноиды, необходимые пищевые волокна [8].

Зеленый кофе содержит различные минеральные вещества: калий, магний, кальций, натрий, железо, марганец, рубидий, цинк, медь, стронций, найдены следовые количества хрома, ванадия, бария, никеля, кобальта, свинца, молибдена, титана и кадмия. Зерна имеют антиоксидантный эффект за счет содержащейся в них хлорогеновой кислоты [9].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Приготовление водного экстракта макробиотических продуктов питания. Водный экстракт готовили добавлением 1 г макрококтейля «ДиаХит» или «Оптимал вес» в 10 мл дистиллированной воды температурой 50 °С и интенсивно перемешивали в течение нескольких минут. Центрифугирование проводили при 600 g в течение 10 минут. Далее использовали полученную надосадочную жидкость.

Отмывка эритроцитов. Цельную кровь центрифугировали при 600 g в течение 10 минут и убирали плазму крови и пленку лейкоцитов. Затем осуществляли четырехкратную отмывку эритроцитов холодным раствором PBS, pH 7,2. Отмывочный раствор добавляли в соотношении не менее 5:1. Центрифугирование проводили в том же режиме.

Инкубация эритроцитов с экстрактом БАДов «ДиаХит» и «Оптимал вес» в условиях окислительного стресса. В качестве модели воздействия окислительного стресса использовали среду Фентона, содержащую раствор 5 мМ сернокислого железа и 1,5 мМ перекиси водорода. Инкубацию эритроцитов осуществляли в среде Рингера-Локка в соотношении 1:4 в водном термостате при температуре 37 °С в течение 30 минут, с осторожным перемешиванием каждые 5 минут. В опытные пробы добавляли экстракт изучаемой добавки по 100 мкл на 0,1 мл суспензии эритроцитов. В контрольную пробу добавляли в таком количестве дист. воду.

После инкубации проводили центрифугирование при 600 g в течение 10 минут для отделения эритроцитов от среды. В инкубационной среде определяли содержание белковых соединений, в суспензии эритроцитов изучали следующие показатели: соотношение форм (окси-, дезокси- и метформы) гемоглобина, количество мембраносвязанного гемоглобина, скорость поглощения глюкозы клетками, осмотическая резистентность и активность каталазы [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Инкубация эритроцитов человека с водными экстрактами макробиотических продуктов «ДиаХит» и «Оптимал вес» не сопровождается изменением функциональной активности эритроцитов, что свидетельствует о отсутствии вредных воздействий водорастворимых компонентов этих БАД на данные клетки.

В условиях окислительного стресса (ОС) мы наблюдали рост содержания метформы гемоглобина в 3 раза, мембраносвязанного гемоглобина в 2,8 раз, наблюдается рост активной формы каталазы на 95 %. Клетки активно поглощают глюкозу, скорость поступления ее в эритроциты возрастает на 28 %. Изменения показателей функциональной активности эритроцитов свидетельствует о нарастании окислительных повреждений, напряжении метаболизма и повреждении клеток, так как осмотическая резистентность эритроцитов снижается на 33 % по сравнению с контролем.

Инкубация эритроцитов в условиях ОС с добавлением в инкубационную смесь водного экстракта макробиотического продукта «ДиаХит» показало, что происходит снижение содержания метгемоглобина на 35,7 % и мембраносвязанного гемоглобина на 39,0 % по сравнению с условиями окислительного стресс (табл. 1), тогда как добавление водного экстракта «Оптимал вес» сопровождается только тенденцией к уменьшению метгемоглобинобразования и фиксации гемоглобина в мембране. Подобные данные могут свидетельствовать о более выраженным антиоксидантным действии «Диахита», возможно, в водном экстракте этой добавки содержится либо больше антиоксидантов, либо есть соединения с большим восстановительным потенциалом.

Таблица 1 – Содержание отдельных фракций гемоглобина (%) в условиях окислительного стресса и действия экстрактных соединений макробиотических продуктов питания «ДиаХит» и «Оптимал вес»

Показатели	Контроль	Окислитель-ный стресс	Окислитель ный стресс + «ДиаХит»	Окислительный стресс + «Оптимал вес»
Метгемоглобин	1,97 ± 0,04	5,68 ± 0,49 *	3,65 ± 0,09°	4,96 ± 0,24
Мембраносвязан-ный гемоглобин	4,39 ± 0,17	12,45 ± 1,05 *	7,60 ± 0,13°	11,02 ± 0,74

Примечание: * $p < 0,01$ изменение соотношения форм гемоглобина относительно контрольных показателей; $p < 0,01$ изменение соотношения форм гемоглобина относительно показателей в условиях окислительного стресса

Добавление в условиях окислительного стресса экстракта продукта «ДиаХит» не сопровождается достоверным изменением количества активной формы каталазы по сравнению с действием окислительного стресса, тогда как добавление экстракта «Оптимал вес» приводит к снижению активной каталазы на 58 % (табл. 2). Скорость поглощения глюкозы клетками в условиях ОС увеличивается на 19 %, что свидетельствует о напряжении метаболических процессов для сохранения энергетического потенциала и гомеостаза клеток. Добавление экстракта макробиотического продукта «ДиаХит» еще большим повышением этого показателя, скорость поступления глюкозы в эритроциты возрастает на 51 % по отношению к контролю и на 27 %, добавление экстракта «Оптимал вес» не изменяет скорость поглощения глюкозы. Осмотическая резистентность достоверно не увеличивается в присутствии экстрактов добавок, можно отметить только тенденцию к повышению в условиях наличия экстракта продукта «ДиаХит».

Таким образом, наши исследования показали, что водные экстракты макробиотических продуктов питания «ДиаХит» и «Оптимал вес» не оказывают повреждающего воздействия на функциональное состояние эритроцитов человека, а в условиях окислительного стресса характеризуются защитным воздействием. Более выраженный защитный эффект наблюдается при добавлении в среду инкубации водного экстракта макробиотического продукта питания «ДиаХит».

Антиоксидантные свойства водных экстрактов макробиотического продукта «Диахит» можно улучшить увеличением процентного содержания компонента «мука семени расторопши», так как здесь много водорастворимых флавоноидов. В макробиотический продукт «Оптимал вес» можно добавить томатный порошок, который также содержит большое количество антиоксидантов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Троценко, А.С. Проблемы и перспективы использования гречихи в пищевой биотехнологии / Троценко А.С. [и др.] // Вестник ТГЭУ. – 2010. – № 2. – С. 104–116.

2. Инг Ванг. Состояние процесса производства и разработка стратегий в отношении продуктов из гречихи в Китае / Инг Ванг, Дзя Чен, Ибаили Фенг. // Вестник ОрелГАУ. – 2010. – № 4. Т. 25. – С. 9–14.

3. Лобода, А.В. Семена амаранта – перспективный источник биологически активных веществ / Лобода А.В. [и др.] // Известия ВУЗов. Пищевая Технология. – 2009. – № 1. – С. 21–23.

4. Типсина, Н.Н. Биологическая ценность продуктов переработки ячменя / Типсина Н.Н., Пуляева О.С. // Вестник КрасГАУ. – 2013. – № 8. – С. 226–229.

5. Супрунова, И.А. Мука льняная – перспективный источник пищевых волокон для разработки функциональных продуктов / Супрунова И.А., Чижикова О.Г., Самченко О.Н. // Техника и технология пищевых производств. – 2010. – № 4. – С. 23–26.

6. Цаприлова, С.В. Расторопша пятнистая: химический состав, стандартизация, применение / Цаприлова С.В., Родионова Р.А. // Вестник фармации. – 2008. – № 3 (41). – С. 3–19.

7. Кузин, Ф.К. Совершенствование технологии и производства хлебобулочного изделия на основе измельченного проросшего зерна пшеницы / Кузин Ф.К. [и др.] // Вестник ВГУИТ. 2017 Т. 79, № 1. С. 178–187.

8. Позняковский, В.М. Биологически активные добавки в современной нутрициологии / Позняковский В.М., Суханов Б.П. // Техника и технология пищевых производств. – 2009. – С. 27–34.

9. Могильный, М.П. Использование напитков из кофе в здоровом питании [Текст] / Могильный М.П. Галюкова М.К. // Новые технологии, 2013. С. 17–23.

10. Кленова, Н.А. Строение, метаболизм и функциональная активность эритроцитов человека / Кленова Н.А., Кленов Р.О / Самара: Издательство «Универс групп, 2009. – 125 с

УДК 601.4

ИЗУЧЕНИЕ ПОПУЛЯЦИЙ ЛИПЫ МЕЛКОЛИСТВЕННОЙ TILIA CORDATA MILL. В РЕСПУБЛИКЕ БАШКОРТОСТАН, ПОИСК, ГЕНОТИПИРОВАНИЕ, РАЗМНОЖЕНИЕ IN VITRO ЛИП С ПОВЫШЕННОЙ ПРОДУКЦИЕЙ НЕКТАРА.

Р.Г. Фархутдинов, Б.Р. Кулуев, Р.Р. Хисамов[1], В.Г. Корюгина, Р.Р. Хисамова

Башкирский государственный университет, Уфа, Россия,
[1] Башкирский государственный аграрный университет, Уфа, Россия

Формированию известности башкирского меда способствовала специфическая ресурсная база, представленная преимущественно насаждениями липы сердцелистной и сопутствующих ей других древесно-кустарниковых пород и трав. В Республике Башкортостан сосредоточено более 30 % насаждений липы сердцелистной, произрастающей в России (Варламов и др., 2016). Территория Республики Башкортостан отличается большой разнородностью геологического строения, климатических условий, характера распределения почв и растительного покрова. Средний состав насаждений с участием липы хотя и различен, но не значительно, например в Северной лесостепной зоне – 50 ± 5 % липы, в Предуральской лесостепной зоне 60 ± 5 % липы, а в Южной лесостепной зоне около 50 ± 5 % липы (Фархутдинов и др. 2014; Хисамов и др., 2014; Ишбирдина и др., 2015). Однако, общая нектаропродуктивность в различных природно-климатических зонах на территории республики различна (Khisamov et al., 2018). Известно, что на нектаровыделение оказывают влияние много факторов, такие как размер цветков, местоположение их в кроне, высота местности, географическое местоположение, экспозиция склонов, фенологическая стадия цветения, частота и степень отбора нектара, возраст древостоев, погодные условия и многие другие условия.

К сожалению, большая часть этих факторов не поддается регулированию и только мастерство пчеловодов позволяет максимально использовать естественную нетаропродуктивность угодий. В то же время такие показатели насаждений как полнота и освещенность деревьев, возраст древостоев поддаются регулированию и могут повысить эффективность лесных площадей с медоносными растениями. При проведении рубок ухода начатыми в молодняках можно обеспечить оптимальное размещение древостоев липы для получения максимальной их нектаропродуктивности. Возраст древостоев в определенных пределах также поддается регулированию лесоводственными приемами. При этом следует формировать разновозрастные разнополнотные насаждения липы со ступенчатость полога с тем, чтобы обеспечивалась достаточная освещенность возможно большей части крон. Как показывает практика, именно в таких насаждениях наблюдается лучшее цветение, а медосборы оказываются более устойчивыми и высокими (Султанова, 2006).

Интерес к липе сердцелистной связан в первую очередь с её большой нектаропродуктивностью (до 1000 кг/га), с высокими потребительскими качествами липового меда и, кроме того, по сравнению с другими растениями широколиственного комплекса, липа сердцелистная менее требовательна к теплу, она является стабилизирующим элементом в экосистемах как почвоулучшающая порода, хорошо растет и размножается в сложных экологических условиях. Однако, в настоящее время отсутствует информация о наличии отдельных популяций липы сердцелистной на разнородной территории Республике Башкортостан.

Проведение популяционных исследований предполагает описание жизненной формы вида у взрослого генеративного растения, учета особенностей строения вегетативных и генеративных побегов, длительность их жизни, соотношения многолетней и однолетней частей побегов, время и длительность периода цветения, характер корневой системы, указание счетной единицы (особь, побег, парциальный куст и т. д.), оценка численности ценопопуляции и т. д. Учитывая, что липа является важной медоносной древесной культурой, необходим также учет и анализ лесоводственных и лесоустроительных показателей насаждений, которые будут свидетельствовать о надобности проведения рубок ухода и т. д. (Султанова, 2006).

Популяции *Tilia cordata* Mill. слабо изучены в отношении характера генетической и морфологической изменчивости. Научные работы в области целенаправленных сравнительных молекулярно-генетических исследований популяций липы на территории республики не проводились. Изучение полиморфизма в популяциях с использованием молекулярно-генетических методов анализа ДНК является важным инструментом для оценки характера изменчивости генетической структуры

популяций у растений липы. Для выделения ДНК из сухих листьев, собранных в естественных условиях местообитаний использовали методику с использованием цетилтриметиламмоний бромида (CTAB) (Rogers, Bendich, 1985). Однако, из-за присутствия большого количества балластных веществ данная методика и некоторые другие оказались не пригодными для проведения дальнейших исследований. В связи с этим нами в настоящее время проводится модификация метода очистки растительного материала.

Известно, что секреция нектара, у липы, как и других высших растений, осуществляется специализированными секреторными образованиями флоральными нектарниками, которые расположены на цветках (Рощина, Рощина, 2012). Регуляция нектаровыделения, помимо общеизвестных внешних факторов (температура, влажность и др.), происходит на физиолого-биохимическом (фитогормоны, ферменты, трофические компоненты) и генетическом уровне. Установление участков гена ответственных за ускоренную секрецию нектара является важной задачей как для установления уровня нектаропродуктивности, так и установления взаимосвязей между растением и пчелой как опылителем (Туктарова, Фархутдинов, 2014).

Одним из важных аспектов применения молекулярной генетики является генетическая паспортизация плюсовых деревьев с помощью различных методов анализа ДНК. Такие генетические паспорта заносятся в компьютерную базу данных, что позволяет проводить генетическую инвентаризацию селекционно-семеноводческих объектов, выбраковывая ошибочно посаженные деревья, и создавать модели схем смешения плюсовых деревьев на лесосеменных плантациях (Кончиц и др., 2010).

ЛИТЕРАТУРА

Варламов А.А., Хисамов Р.Р., Стафийчук И.Д., Фархутдинов Р.Г. Кадастр медоносных ресурсов. Монография под науч. ред. А.А. Варламова. – М.: ФОРУМ 2016, – 400 с.

Фархутдинов Р.Г., Хисамов Р.Р., Онучин М.С. Анализ состояния естественных медоносных ресурсов в районе широколиственных лесов Уфимского плато. Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2014. Т. 16. № 5–5. С. 1802–1807.

Хисамов Р.Р., Кулагин А.А. Биологические ресурсы Республики Башкортостан: недревесные ресурсы леса. Уфа: Изд-во Башкир. ГПУ, 2014. 292 с.

Ишбирдина Л.М., Фархутдинов Р.Г., Хисамов Р.Р., Онучин М.С. Рекогносцировочное изучение травянистых сообществ северо-востока Башкортостана как потенциальной базы для развития лесного пчеловодства. Фундаментальные исследования. 2015. № 2–9. С. 1891–1896.

R.R. Khisamov, R.G. Farkhutdinov, F.G. Yumaguzhin, M.G. Ishbulatov, R.F. Mustafin, E.I. Galeev, A.N. Kutliyarov, Z.Z. Rakhmatullin. Honey Production Potential and Cadastral Valuation of Melliferous Resources for the Southern Urals. Journal of Engineering and Applied Sciences. 2018.V.13. I. 5. P. 4622–4629. DOI: 10.3923/jeasci.2018.4622.4629

Султанова Р.Р. Лесоводственные методы формирования высокопродуктивных липняков на Южном Урале: автореферат дис. доктора сельскохозяйственных наук: 06.03.03 / Ур. гос. лесотехн. ун-т. – Екатеринбург, 2006. – 40 с.

Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. Plant Mol. Biol.1985; 5(2) : 69–76. doi : 10.1007/BF00020088.

Рощина В.В., Рощина В.Д. Выделительная функция высших растений: Монография. – LAP Lambert Academic Publishing, 2012. – 476 с.

Туктарова Ю.В., Фархутдинов Р.Г. Миграция нетрофических компонентов по пищевой цепи *Apis millifera L*. Saarbrucken, Lambert Academic Publishing, 2014. 106 с.

Кончиц, А.П., Ковалевич, А.И., Сидор, А.И. Состав и структура базы паспортных и описательных данных генофонда лесных растений. Гомель: Институт леса НАН Беларуси, 2010. – Проблемы лесоведения и лесоводства, Вып. 70. – С. 239–246, RU/IS/BASE/406202176, 2078–3965

УДК 581.1:579.64:632.4

КОЛИЧЕСТВО АУКСИНОВ В РИЗОСФЕРЕ ЯЧМЕНЯ В УСЛОВИЯХ КОНКУРЕНТНЫХ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ *FUSARIUM CULMORUM* И *PSEUDOMONAS FLUORESCENS*

А.И. Шапошников, Н.А. Вишневская, О.К. Струнникова

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

В настоящее время высок интерес к экологически чистым биопрепаратам на основе ризосферных бактерий, повышающих урожайность сельскохозяйственных культур (Malusa et al., 2012). При этом вопрос о механизмах взаимодействия между микроорганизмами и растениями в ризосфере, о процессах регулирования жизнедеятельности растительно-микробных систем остается до сих пор недостаточно изученным и привлекает большое внимание исследователей. Одним из аспектов регулирования растительно-микробных взаимодействий является гормональный баланс в ризосфере, который связан как с гормональной активностью самого растения, так и с действием фитогормонов, продуцируемых микроорганизмами, заселяющими поверхность корней и прикорневую область – ризосферу. Продуцирование фитогормонов, витаминов и других биологически активных веществ микроорганизмами является одним из важнейших механизмов, определяющих развитие и функционирование растительно-микробных ассоциаций (Цавкелова и др., 2006; Spaepen et al., 2007).

Уже не одно десятилетие значительное внимание уделяется роли ауксинов, синтезируемых ростстимулирующими ризобактериями (PGPR – plant growth promoting rhizobactera), в стимуляции роста и питания растений, поскольку способность синтезировать фитогормон индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) широко распространена среди микроорганизмов, населяющих ризосферу растений (Frankenberger, Arshad, 1995; Spaepen et al., 2007). В результате этих исследований изучены биохимические пути и гены, ответственные за синтез ИУК, а также фенотипические эффекты экзогенных ауксинов на растения (Frankenberger, Arshad, 1995, Spaepen et al., 2007). Показан положительный эффект ауксинов, синтезируемых PGPR, на инициацию и удлинение корней, развитие боковых корней и корневых волосков, что может иметь значение для ускоренного роста, потребления питательных элементов и устойчивости к стрессам всего растения (Kazan, 2013; Ambreen and Hasnain, 2014).

Исследование потребления компонентов корневых экссудатов ячменя *Hordeum vulgare* L. сорта Белогорский фитопатогенным грибом *Fusarium culmorum* 30 и штаммом PGPR *Pseudomonas fluorescens* 2137 показало, что аминокислота L-триптофан (предшественник, необходимый для микробного синтеза ауксинов) активно утилизируется как бактериями, так и грибом (Шапошников и др., 2019). Для анализа наличия в корневых экссудатах ауксинов в стерильный вермикулит, содержащий раствор минеральных питательных элементов, суспензии макроконидий гриба (10^3 клеток/мл) и клеток бактерий (10^5 клеток/мл) (по отдельности и совместно) высаживали проклюнувшиеся стерильные семена ячменя. Через 36 часов, когда гриб и бактерии уже колонизировали корни, растения аккуратно извлекали, отмывали от вермикулита и переносили в стерильные сосуды, содержащие деионизированную воду. Растения (стерильные и заселенные микроорганизмами) инкубировали в воде сутки, после чего растворы, содержащие корневые экссудаты, очищали от микроорганизмов и корневых остатков центрифугированием. Количество ауксинов и L-триптофана в корневых экссудатах оценивали методом ультра-производительной жидкостной хроматографии (UPLC) с использование системы Waters ACQUITY UPLC H-класса (Waters, США).

Результаты хроматографического анализа ауксинов представлены в таблице. Количество ИУК в суточных корневых экссудатах ячменя в присутствии микроорганизмов в среднем было в 2–3.8 раз выше, чем в экссудатах стерильных растений. В экссудатах стерильных растений наблюдалось высокое содержание индолил-3-карбоновой кислоты (ИКК) – продукта деградации молекул ИУК, тогда как в вариантах с инокуляцией ее количество резко снижалось.

Таблица – Количество ауксинов в корневых экссудатах ячменя (мкг/г сухой биомассы растений)

Вариант	ИУК	Индолил-3-карбоновая
Стерильные растения	0.04 ± 0.01	1.6 ± 0.48
F. culmorum 30	0.15 ± 0.05	0.08 ± 0.03
P. fluorescens 2137	0.09 ± 0.03	0.09 ± 0.05
F. culmorum + *P. fluorescens*	0.09 ± 0.04	0.35 ± 0.08

В условиях конкуренции фитопатогенного гриба и *P. fluorescens* 2137 (вариант с двойной инокуляцией растений) количество ИУК в среднем соответствовало варианту с инокуляцией штаммом PGPR, а количество индолил-3-карбоновой кислоты было в 3.9–4.3 раза выше, чем при моноинокуляции. Количество L-триптофана в суточных экссудатах было самым низким в варианте с двойной инокуляцией (в 8.5 раз относительно стерильных экссудатов), что соответствует выявленной конкуренции за эту аминокислоту между *F. culmorum* и *P. fluorescens* (Шапошников и др., 2019). Гриб снижал количество L-триптофана в корневых экссудатах в 2.5 раза относительно стерильных экссудатов, а в варианте с инокуляцией растений *P. fluorescens* 2137 его количество практически оставалось на уровне стерильных экссудатов, что может быть связано с известным эффектом усиления корневой экссудации аминокислот под действием ризосферных микроорганизмов (Phillips et al., 2004).

Таким образом, заселение корней фитопатогенным грибом *F. culmorum* 30 и ризобактериями *P. fluorescens* 2137 уже через сутки вызывает увеличение количества фитогормона ИУК в корневых экссудатах ячменя. Количественная динамика ауксинов на более длительных сроках развития растительно-микробной системы в условиях конкуренции фитопатогенного гриба и PGPR, влияние микроорганизмов и их конкурентных взаимоотношений на метаболизм ауксинов в ризосфере и растительном организме требуют дальнейших исследований.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 18–016–00111.

ЛИТЕРАТУРА

Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Микробные продуценты стимуляторов роста растений и их практическое использование: обзор // Прикладная Биохимия и Микробиология. 2006. № 2. С. 133–143.

Шапошников А.И., Вишневская Н.А., Шахназарова В.Ю., Белимов А.А., О.К. Струнникова. Роль корневых экссудатов ячменя как источника питания во взаимоотношениях между *Fusarium culmorum* и *Pseudomonas fluorescens* // Микология и фитопатология. 2019. Т. 53. № 5. С. 301–308.

Ambreen A., Hasnain S. Auxins as one of the factors of plant growth improvement by plant growth promoting rhizobacteria // Polish Journal of Microbiology. 2014. V. 63. № 3. P. 261–266.

Frankenberger W.T. Arshad M. Phytohormones in soils: production and function. Marcel Dekker, Inc. N.Y. – 1995. – 503 p.

Kazan K., Auxin and the integration of environmental signals into plant root development // Annals of Botany. 2013. V. 112. P. 1655–1665.

Malusa E., Sas-Paszt L., Ciesieska J. Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers // The Scientific World Journal. 2012. Article ID 491206. doi: 10.1100/2012/491206

Phillips D.A., Fox C.T., King M.D., Bhuvaneswari T.V., Teuber L.R. Microbial products trigger amino acid exudation from plant roots // Plant Physiology. 2004. V. 136. P. 2887–2894.

Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling // FEMS Microbiology Reviews. 2007. V. 31. P. 425–448.

Talboys P.J., Owen D.W., Healey J.R., Withers P.J.A, Jones D.L. Auxin secretion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 both stimulates root exudation and limits phosphorus uptake in *Triticum aestivum* // BMC Plant Biology. 2014. V. 14. P. 51. http://www.biomedcentral.com / 1471–2229/14/51

УДК 637.5.03

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА МЯСНЫХ ПРОДУКТОВ ИЗ НИЗКОСОРТНОГО СЫРЬЯ

А.В. Зыкова, А.Н. Кирилюк, А.М. Патиева, С.В. Патиева, А.А. Тоншев

Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина, Краснодар, Россия

С давних времен человек использовал микроорганизмы для получения продуктов, но даже и не подозревал об этом. Столкнуться пришлось и с деятельностью ферментов. Наши предки использовали процессы ферментации продуктов питания, не вникая в суть происходящих биохимических превращений.

Сегодня практически ни одно производство не может обойтись без применения ферментных препаратов. При производстве продуктов питания в основном используют липолитические, пектолитические, амилопектические, оксидазные и протеолитические ферментные препараты.

Качество мясного сырья обуславливает конечные характеристики готового мясопродукта. С повышением доли соединительной ткани в продуктах, изготавливаемых из мясного сырья, снижается качество готовых продуктов, их биологическая и питательная ценность. Для устранения чрезмерной жесткости волокон мясного сырья в последнее время используют различные приемы воздействия на соединительную ткань, в частности, механические и биотехнологические способы. Использование ферментов при производстве мясных изделий позволяет улучшить органолептические показатели, а также повысить выход готового продукта. Использование различных ферментных препаратов наиболее целесообразно так как позволяет получить мясопродукты с более сочной и нежной консистенцией на основе низкосортного сырья с высоким содержанием соединительной ткани. Для размягчения мясного сырья применяют ферменты, которые оказывают влияние на белки соединительной ткани. Такими ферментами являются: пепсин, трипсин и химотрипсин. Их используют для размягчения мышечной и соединительной ткани. Также исследования показали, что больший эффект достигается при действии панкреатина и смеси трипсина, химотрипсина, липаз, амилаз. Действие этих ферментов заключается в расщеплении пептидных связей в молекулах белка до образования более простых пептидов и свободных аминокислот. Таким образом, в результате их воздействия на мясное сырье расщепляются белки как мышечной, так и соединительной ткани.

Целью нашей работы являлось изучение воздействия ферментных препаратов на качественные показатели готового мясного продукта из низкосортного сырья.

В задачи наших исследований входило изучение воздействия ферментных препаратов на показатели качества мясного сырья и готовой продукции.

Исследования проводились на базе лабораторий кафедры технологии хранения и переработки животноводческой продукции, НИИ биотехнологии и сертификации пищевой продукции КубГАУи в учебном классе УНПК «Агробиотехпереработки» КубГАУ.

Для определения выхода съедобной части свиной рульки проводили обвалку, результаты обвалки сырых свиных рулек показаны в таблице 1. После обвалки произвели измельчение мякотной части на мясорубке и отобрали пробы с каждого опытного образца. Для придания свиным рулькам нежности и сочности был выбран фермент пепсин микробиальный ренин MEITO.

Пепсин микробиальный ренин MEITO растительного происхождения, получаемый по японской технологии, содержащий 100 % химозина. В нем не содержатся генетически модифицированных организмов, а также он широко применяется в пищевой промышленности. Для определения оптимальной дозы были выработаны образцы с разным количеством пепсина, данные представлены в таблице 3.

Таблица 1 – Результаты обвалки свиных рулек

Опытные образцы	Масса рульки	Выход обваленной мякоти		Выход кости	
		масса	%	масса	%
Контроль	815,87	493,37	60,5	322,5	39,5
Образец 1	812,57	494,35	60,8	318,22	39,2
Образец 2	944,13	553,81	58,8	390,3	41,2
Образец 3	943,54	554,44	58,7	389,1	41,3
$М_{ср}$	702,1	523,99	59,7	355,03	40,3

Приём материалов статей по адресу: actbio@mail.ru

Таблица 2 – Рецептура посолочной смеси

Наименование ингредиентов	Опытные образцы		
	Контроль без фермента	$О_1$-пепсина 0,05 %	$О_2$-пепсина 0,06 %
Свиная рулька	943,5	812,57	944,13
Соль	54,5	17,8	20,7
Пепсин	-	5	6
Вода	2500	1400	1600

Можно сделать вывод о том, что разница между количественным содержанием пепсина небольшая, но на качество готового изделия повлиял положительным образом.

В результате проведенных нами исследований, были получены данные об использовании препаратов MEITO растительного происхождения в технологии производства мясных продуктов из низкосортного сырья, которые положительно повлияли на конечные характеристики готового продукта 3.

Таблица 3 – Результаты обвалки готовых рулек

Опытные образцы	Масса рульки	Выход обваленной мякоти		Выход кости		Потери при термообработке, %
		Масса	%	масса	%	
Образец 1	812,57	424,35	52,2	318,2	39,2	8,6
Образец 2	944,13	453,8	48,2	390,3	41,3	10,5
Образец 3	943,54	456,24	48,4	389,1	41,2	10,4

Анализируя полученные данные, можно сделать вывод о том, что в процессе посола ферментные препараты позволили повысить биологическую ценность низкосортного сырья на 1,9–3,7 %в сравнении с контрольными образцами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гущин В.В., Кулишев Б.В., Макеев И.И., Митрофанов Н.С. Технология полуфабрикатов из мяса птицы. – М.: Колос, 2002. – 200 с.

2. Гуринович Г.В. Биотехнологические способы производства продуктов повышенной пищевой ценности: учебник / Г.В. Гуринович. – Кемерово: ЛМТ КемТИПП, 2002. – 130 с.

3. Пилат Т.Л., Иванов А.А. Биологически активные добавки к пище (теория, производство, практика) / Т.Л. Пилат, А.А. Иванов. – М.: Авваллон, 2002. – 710 с.

4. Спиричев В.Б. Обогащение пищевых продуктов витаминами и минеральными веществами. Наука и технология / В.Б. Спиричев, Л.Н. Шатнюк, В.М. Позняковский; под общ. ред. В.Б. Спиричева -2-е изд., стер. – Новосибирск: Сиб.унив. изд-во, 2005. – 548 с.

УДК 576.3

ХАРАКТЕРИСТИКА МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЛОШАДЕЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ И ПУПОВИННОЙ КРОВИ

С.А. Васильева, Д.Г. Коровина, Е.В. Викторова, И.П. Савченкова

Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко, Москва, Россия

В последние годы большое научное внимание уделяется костно-суставным заболеваниям лошадей. Развитие воспалительных и ревматических заболеваний в суставах может привести к тяжелым дегенеративным изменениям. Высокая распространенность ортопедических патологий у лошадей и их влияние на спортивные показатели в сочетании с высокой стоимостью терапевтических процедур формируют важную задачу для ветеринарной медицины. В связи с этим разрабатываются новые методы клеточно-тканевой инженерии, направленные на стимулирование / усиление регенерации гиалинового хряща и сохранение целостности его структуры. Многообещающим

инструментом клеточной терапии являются мультипотентные мезенхимные стволовые клетки (ММСК). Они могут быть использованы для лечения большого числа ортопедических патологий, в том числе травм сухожилий и связок. Широкое терапевтическое использование данных клеток обусловлено низкой иммуногенностью, а также выраженными иммуносупрессивными свойствами против Т-лимфоцитов. Клетки с фенотипом, подобным ММСК, можно выделять из таких тканей млекопитающих как костный мозг, жировая ткань (ЖТ), плацента, периферическая кровь, пуповинная кровь (ПК) и др., однако именно ПК и ЖТ являются перспективными источниками ММСК вследствие минимально инвазивных методов получения (1, 2, 3). В связи с этим, целью представленного исследования было изучить свойства клеток, с фенотипом подобным ММСК, выделенных из ЖТ и ПК лошадей, *in vitro*.

ММСК из ЖТ выделяли по методике, описанной нами ранее (4), с помощью последовательной механической и ферментативной обработок ЖТ. Для ферментативной диссоциации ткани обрабатывали 0,01 % раствором коллагеназы II типа на основе DMEM-LG (содержание глюкозы 1 г/л, «ПанЭко», Россия) в течение 60 мин при 37ºС. ММСК из ПК были выделены нами ранее в градиенте плотности Lympholyte-H («Cedarlane», Канада) с пробирками SepMate-15 («StemCellTechnologies», США) (5,6). Клетки подсчитывали в камере Горяева и переносили в культуральные флаконы в концентрации $4{,}8\times10^4$ кл/см^2. В качестве ростовой среды для культивирования ММСК использовали питательную среду DMEM-LG, дополненную сывороткой крови плодов коров (конечная концентрация в среде – 10 %) («GE Healthcare», USA) и антибиотиками (конечная концентрация стрептомицина – 50 мкг/мл, пенициллина – 50 Ед./мл).

Сравнительный анализ свойств полученных клеточных популяций выявил, что клетки, выделенные из ЖТ и ПК, имели схожие морфологические характеристики и представляли собой два типа: мелкие округлые и более крупные узкие веретенообразные с фибробластоподобной морфологией. Клетки обладали сильной адгезией к культуральному пластику и высокой клонообразующей способностью – 90,0 % у ММСК, выделенных из ЖТ, и 92,0 % у ММСК, полученных из ПК. Время удвоения ММСК выделенных из ЖТ и ПК, варьировало от 48 до 65 ч и от 52 до 72 ч соответственно. Способность ММСК к индукционной дифференцировке в остео-, хондро- и адипогенном направлениях *in vitro* изучали с использованием наборов StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit, StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit и StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit («Gibco», США). Адипогенная дифференцировка сопровождалась появлением клеток округлой формы с липидными везикулами в цитоплазме, которые выявлялись окраской специфическим красителем жировым красным О. Окраска ММСК, выделенных из ЖТ, на специфическую активность эндогенной щелочной фосфатазы оказалась положительной на 14 сут культивирования в индукционной среде. Окрашивание ММСК, полученных из ЖТ, методом серебрения Косса выявило секрецию внеклеточного матрикса в виде фосфатов и карбонатов в клетках на 21 сут индукции. После культивирования клеток, выделенных из ЖТ, в хондрогенной среде в течение 14 сут, было обнаружено формирование многослойных скоплений с большим количеством матрикса, окрашивающихся альциановым синим, в которых визуализировались изогенные группы, подобные лакунам гиалинового хряща. На 21-е сут клетки формировали плотные микрогранулы, в которых был выявлен гликозаминогликановый матрикс. В случае хондрогенной дифференцировки ММСК, полученных из ПК, с помощью гистологических методов также было выявлено наличие клеток с морфологией хондроцитов. Таким образом, клеточные популяции, выделенные нами из ЖТ и ПК лошадей, имеют свойства и признаки, характерные для ММСК. Наши исследования продемонстрировали, что обе культуры клеток способны при индукции формировать клетки хрящевой и жировой ткани *in vitro* и могут представляют собой перспективный материал для ветеринарной медицины и сельскохозяйственной биотехнологии. Полученные культуры клеток были размножены и хранятся в криобанке лаборатории стволовой клетки ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.

Работа выполнялась в рамках НИР № 0578–2018–0006 «Создание новых клеточных систем с заданными свойствами на основе стволовых клеток млекопитающих, в том числе сельскохозяйственных животных для ветеринарии, вирусологии и биотехнологии».

ЛИТЕРАТУРА

Савченкова И.П. Создание коллекции стволовых клеток млекопитающих, в том числе сельскохозяйственных животных / И.П. Савченкова, С.А. Васильева, Д.Г. Коровина, Е.В. Викторова, И.М. Волкова, Е.А. Савченкова // В сборнике: Биотехнологии: состояние и перспективы развития. Науки о жизни Материалы международного форума. – 2018. – С. 837–838.

Коровина Д.Г. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки, выделенные из костного мозга овцы: получение и криоконсервирование / Д.Г. Коровина, И.М. Волкова, С.А. Васильева, М.И. Гулюкин, И.П. Савченкова // Цитология. – 2019. – Т. 61. – № 1. – С. 35–44.

Савченкова И.П. Мезенхимные стволовые клетки из жировой ткани кошек и собак в культуре / И.П. Савченкова, С.А. Васильева, Д.Г. Коровина, А.А. Шабейкин, А.М. Гулюкин // Сельскохозяйственная биология. – 2019. – Т. 54. – № 2. – С. 395–403.

Савченкова И.П. Методические наставления по выделению мультипотентных мезенхимных стволовых клеток из тканей взрослых особей млекопитающих, изучению их свойств и признаков / И.П. Савченкова, Л.К. Эрнст, М.И. Гулюкин, Е.В. Викторова. – М.: ООО "Издательство "Спутник+", 2010. – 22 с.

Коровина Д.Г. Пуповинная кровь лошадей как источник мультипотентных мезенхимных стволовых клеток / Д.Г. Коровина, К.П. Юров, И.М. Волкова, С.В. Алексеенкова, С.А. Васильева, Е.А. Савченкова, И.П. Савченкова // Коневодство и конный спорт. – 2015. – № 6. – С. 31–33.

Коровина Д.Г. Характеристика мультипотентных мезенхимных стволовых клеток, выделенных из пуповинной крови лошадей / Д.Г. Коровина, К.П. Юров, С.В. Алексеенкова, Е.А. Савченкова, И.П. Савченкова // Российская сельскохозяйственная наука. – 2017. – № 2. – С. 51–54.

УДК 637.344

ПЕРСПЕКТИВЫ РЕАЛИЗАЦИИ ПРИНЦИПОВ НАИЛУЧШИХ ДОСТУПНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ НА ПРИМЕРЕ ГЛУБОКОЙ ПЕРЕРАБОТКИ ВТОРИЧНОГО МОЛОЧНОГО СЫРЬЯ

А.Г. Храмцов, В.А. Диняков, А.Д. Лодыгин, С.С. Школа

Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Россия

Пути решения проблем рационального использования и переработки вторичного молочного сырья были заложены еще в период существования Союза Советских Социалистических Республик. Экономические, научно-технические, производственные аспекты жизнедеятельности хозяйствующих субъектов регулировал ряд постановлений Совета Министров СССР. Среди них можно выделить постановление № 58 от 24 января 1980 года «О мерах по улучшению использования обезжиренного молока, пахты и молочной сыворотки». [1] Документ утверждал досконально проработанный план мероприятий и мер, направленных на развитие сектора переработки вторичного молочного сырья. Диапазон решаемых в нем вопросов чрезвычайно широк и охватывает их от процессов модернизации технологических аппаратов и технологий до финансовых затрат на жилищное и культурно-бытовое строительство для работников.

Также необходимо отметить, что в разработанных программах по использованию вторичного сырья на период до 2000 года был сделан акцент на проблеме защиты окружающей среды от загрязнения отходами производства. Наиболее значимыми способами ее решения виделось внедрение безотходных и малоотходных производственных процессов; развитие материально-технической базы для сбора, хранения, заготовки, обработки и переработки отходов производства и потребления; проведение мероприятий планового, организационного, социального и экономического характера для создания необходимых условий вовлечения отходов в хозяйственный оборот, в том числе повышения роли экономических рычагов, стимулирующих увеличение использования вторичного сырья; пропаганда и воспитание советских людей в духе бережного отношения к вторичным ресурсам как к общегосударственному достоянию [2].

На сегодняшний день в нашей стране накоплен обширный опыт промышленной переработки и использования вторичного молочного сырья, отразившийся в справочнике по НДТ ИТС 45–2017 «Производство напитков, молока и молочной продукции», введенный в действие с 1 июня 2018 года. Он представляет собой комплекс наиболее приемлемых технологических решений, позволяющих заключить коллективный договор между властью, создающей условия для промышленного развития и осуществляющей экологический надзор, и бизнесом, для которого важно сохранить рентабельность и потенциал развития. [3]

В данной статье рассмотрены перспективы перехода молочной промышленности к принципам наилучших доступных технологий на примере переработки молочной сыворотки.

Молочная сыворотка – продукт с высокой биологической ценностью. Состав сыворотки определяется технологией ее получения и степенью перехода компонентов молока. В среднем в молочную сыворотку переходит около 50 % сухих веществ молока, в том числе; от 90 % до 100 % сывороточных белков; от 88 % до 99 % лактозы; от 60 % до 88 % минеральных веществ; от 20 % до 25 % казеина и от 6 % до 12,5 % жира. Такой баланс составных частей позволяет считать ее ценным промышленным сырьем, из продуктов переработки которого можно получить финансовую выгоду. Однако, не смотря на высокий экономический потенциал молочной сыворотки, далеко не все предприятия используют данный побочный продукт в производстве.

По данным, подготовленным и опубликованным Milknews совместно с «НЭО Центр», в России на дальнейшую переработку направляется только 21 % молочной сыворотки. Остальные 79 % идут либо на корм сельскохозяйственным животным либо вообще не используются и сливаются на поля или в сточные воды. И происходит это на фоне ежегодного роста производства молочной сыворотки. [4] По мнению руководителя проектов практики АПК «НЭО Центр» Е. Михалевой главные причины такого низкого уровня переработки – отсутствие мощностей и инвестиций. К ним также можно добавить либерализм экологических служб в отношении сброса сыворотки в сточные воды. И до определенного момента времени такая ситуация устраивала всех участников процесса.

Однако вступил в силу Федеральный закон 219-ФЗ о переходе промышленности на НДТ. Предприятия первой категории опасности в соответствии с ПП РФ 1029 с 2019 года будут в обязательном порядке получать комплексное экологическое разрешение. Чтобы получить разрешение будет необходимо соответствовать принципам НДТ. В свою очередь государство будет поддерживать такие предприятия льготами, субсидиями и уменьшением платы за негативное воздействие на окружающую среду. Также в помощь предприятиям разработан справочник ИТС 45–2017, в котором дана текущая характеристика отрасли на сегодняшний день, предложены оборудование, технологические процессы, способы и методы, применяемые в молочной промышленности, и приведены лучшие из них.

Для переработки молочной сыворотки современное техническое развитие предполагает использование энергоэффективных мембранных технологий – ультрафильтрации, нанофильтрации, обратного осмоса и электродиализа. Их применение позволит снизить загрязнение сточных вод, уменьшить количество отходов, снизить потребление энергоресурсов в отличии от традиционных способов. К тому же позволит получить дополнительную прибыль от глубокой переработки сыворотки.

Основными видами продукции, вырабатываемой из молочной сыворотки в РФ, являются сухая сыворотка и концентраты на ее основе. В течение последних лет отмечается динамичный рост этого сегмента. Еще один традиционный продукт из сыворотки – лактоза. Но объемы ее производства чрезвычайно малы. В настоящее время только Молочный комбинат «Ставропольский» обладает высокой материально-технической базой, отвечающей принципам НДТ, для производства молочного сахара высоких кондиций – пищевого и фармакопейного. Увеличение объемов производства лактозы – задача государственного масштаба.

Жир в молочной сыворотке находится в состоянии высокой степени дисперсности. Размер жировых шариков составляет 0,06 – 1 мкм, что способствует более легкому эмульгированию, омылению и усвояемости (94–96 %). После сепарирования в сыворотке находится остаточный жир, состоящий из маленьких жировых шариков и фрагментов мембран жировых шариков, и фосфолипидов. Удаление фосфолипидов необходимо при подготовке сыворотки для извлечения сывороточного белка путем ультрафильтрации.

Применение перспективного метода ультрафильтрации позволяет выделять сывороточные белки в нативном состоянии. Эти белки могут использоваться в составе диетических, детских, лечебно-профилактических продуктов и продуктов специального назначения. Пока производство концентратов сывороточных белков в России не развито. [5]

Не менее перспективным выглядит применение электродиализа. С его помощью решаются проблемы высокой минерализации и солоноватого вкуса. Деминерализованная сыворотка применяется в производстве мороженного, детского питания, кондитерских изделий и напитков.

Применение электродиализа в совокупности с нанофильтрацией делает возможным извлечение из сыворотки минеральных соединений. Особый практический интерес представляет перспектива выделения фосфата кальция. Хотя в целом комплекс минеральных солей сыворотки как по своему широкому спектру, так и по составу соединений представляется с биологической точки зрения наиболее оптимальным.

В молочную сыворотку переходят водорастворимые витамины, причем в подсырной сыворотке их значительно больше, чем в творожной. Стоит отметить большое количество витаминов группы В, выделение которых так же видится довольно привлекательным и перспективным направлением глубокого фракционирования молочной сыворотки.

Современный уровень развития технологий, биологическая ценность сыворотки и продуктов ее переработки, а также низкая стоимость исходной сыворотки радикально изменили представление о ней как о вторичном молочном сырье. Этому в значительной степени поспособствовало ужесточение экологических требований и норм безопасности на молочных предприятиях. Поэтому решение о переходе к принципам НДТ видится логичным и рациональным, а использование мембранных, электромембранных и ионообменных технологий обеспечит их соблюдение.

ЛИТЕРАТУРА

О мерах по улучшению использования обезжиренного молока, пахты и молочной сыворотки: Постановление Совета Министров СССР от 24 января 1980 г. № 58 // Библиотек нормативных правовых актов СССР [Электронный ресурс]. -2014-Режим доступа: http://www.libussr.ru/doc ussr/usr 6589.htm.

Пирогов Н.Л. Вторичные ресурсы: эффективность, опыт, перспективы / Н.Л. Пирогов, С.П. Сушон, А.Г. Завалко; под ред. А.Е. Юрченко. – М.: Экономика, 1987. – 199 с.

Информационное обеспечение наилучших доступных технологий пищевой промышленности: монография / А.Г. Храмцов, А.Н. Брацихин, А.А. Борисенко и [др.]. Санкт-Петербург: ГИОРД, 2019. 312 с.

Обзор Milknews совместно с «НЭО Центр». 10 графиков о состоянии рынка молочной сыворотки. [Электронный ресурс] – 2019. – Режим доступа: http://milknews.ru/analitika-rinka-moloka/rinok-moloka-v-Rossii/grafiki-syvorotka-rf.html.

ИТС по НДТ. ИТС 45–2017. Производства напитков, молока и молочной продукции. Федеральное агентство по техническому регулированию и метрологии. Москва. Бюро НДТ. 2017.

О внедрении наилучших доступных технологий в промышленности. [Электронный ресурс] Режим доступа: http://government.ru/info / 15384/

УДК 664.346

БИОЛОГИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ ПРОИЗВОДСТВА МАЙОНЕЗА

Э.И. Рахимова, А.С. Сироткин, Э.Э. Саитова

Казанский национальный исследовательский технологический университет, г. Казань, Россия

Проблема биологической безопасности продуктов питания – сложная комплексная проблема, требующая многочисленных усилий для ее решения как со стороны исследователей – биохимиков, микробиологов, токсикологов и др., так и со стороны производителей, санитарно-эпидемиологических служб, государственных органов и потребителей.

Под безопасностью продуктов питания следует понимать отсутствие опасности для здоровья человека при их употреблении как с точки зрения острого негативного воздействия (пищевые отравления и пищевые инфекции), так и с точки зрения опасности отдаленных последствий (канцерогенное, мутагенное и тератогенное действие). Иными словами, безопасными можно считать продукты питания, не оказывающие вредного, неблагоприятного воздействия на здоровье настоящего и будущих поколений.

Существующее понятие микробиологической порчи рассматривается как процесс, осуществляемый с участием микроорганизмов в сырье и пищевых продуктах, напрямую оказывающий существенное влияние на жизнь и здоровье людей. В этой связи проблема продления сроков годности продуктов питания, в том числе масложировой продукции, имеет чрезвычайно важное значение. Как известно, майонезы представляют собой эмульсии, поэтому продление срока их годности необходимо рассматривать с двух сторон: повышение микробиологической стойкости водной фазы и снижение скорости окисления жировой фазы [1].

Для повышения микробиологической стойкости майонеза используют следующие технологические приемы: повышение степени дисперсности частиц эмульсии, использование нескольких ступеней водоподготовки, повышение кислотности готового продукта, применение консервантов.

Порча продуктов питания определятся действием разнообразных факторов: физических, химических и особенно микробиологических. Основные компоненты майонеза (белки, жиры, углеводы) представляют собой хорошо усвояемые субстраты для развития микроорганизмов.

К микробиологической порче майонеза и его сырьевых ингредиентов могут быть причастны [2, 3]:

– грамотрицательные бактерии, в том числе представители родов *Pseudomonas* и др.;

– энтеробактерии: представители родов *Escherichia, Enterobacter, Proteus*;

– грамположительные спорообразующие бактерии: представители родов *Bacillus, Clostridium*, в том числе гнилостные;

– молочнокислые бактерии родов *Lactobacillus* и *Leuconostoc*;

– дрожжи рода *Torulas* и др.;

– плесневые грибы родов *Penicillium* и *Aspergillus, Cladosporium* и их метаболиты.

Рост и развитие микроорганизмов в майонезе сопровождается активным потреблением необходимых питательных веществ; при этом образуются побочные продукты метаболизма – газы, кислоты. Ферментативная активность контаминирующих микробных культур определяется, прежде всего, липазами и протеазами. Результаты нежелательной микробной деятельности проявляются в возникновении прогорклости, неприятных запахов, плесневения, увеличение кислотности, изменение внешнего вида и консистенции. Порча майонеза зависит напрямую от числа, вида и активности микроорганизмов, вида продуктов, его свойств и условий хранения (температуры, влажности, состава газовой среды), нарушений в технологии производства и взаимодействия микроорганизмов между собой в виде симбиотических, синергических и антагонистических отношений.

Важным исследовательским аспектом микробиологической порчи и обеспечения биологической безопасности майонеза является комплексная оценка отдельных групп, родов и видов микроорганизмов, их метаболитов для характеристики стабильности продуктов питания, в том числе на всех этапах продвижения к потребителю.

Ряд микроорганизмов, характеризующих стабильность майонеза при хранении и отсутствие признаков порчи, представлен в виде оценочных показателей: дрожжи и плесневые грибы (микроорганизмы порчи), бактериями группы кишечных палочек – БГКП (санитарно-показательные микроорганизмы), и бактериями группы *S.aureus* (условно-патогенные микроорганизмы кишечных палочек [4].

Микробиологическая стойкость майонеза должна оцениваться не только по перечисленным показателям, но и по результатам количественной оценки молочнокислых бактерий, развитие которых обусловливает повышение кислотности продукта, что характеризует порчу продукта, определяемую также органолептически [5]. Однако в нормативных документах именно для этих продуктов их выявление не предусмотрено. Ненадлежащая мойка и дезинфекция поверхностей оборудования способствуют росту и размножению микроорганизмов, которые объединяются в большие колонии – образовывая биопленки, бороться с которыми значительно сложнее, чем с индивидуальными микроорганизмами, поэтому важно предотвратить их образование.

Следует отметить, что среди возбудителей микробиологической порчи в качестве оценочных показателей отсутствует упоминание о бактериях рода *Clostridium и Pseudomonas*. При этом известно, что бактерии рода *Clostridium* могут вызывать разнообразные изменения в составе пищевых продуктов с образованием газов (бомбаж). Большое значение в этой связи придается лабораторным методам исследования, изложенным в ГОСТ 30425–97 «Консервы. Методы определения промышленной стерильности». Как показывают специальные лабораторные исследования, к числу психротрофных микроорганизмов, характеризующих стойкость продуктов при хранении, относятся бактерии рода *Pseudomonas*. Очевидно, что в связи с этим на *Pseudomonas spp*. было обращено внимание в МУК 4.2.1847–04 как на показатель порчи [6]. Анализ этого показателя проводится при выдаче заключения о сроках годности в масложировых продуктах с пониженной жирностью, охлажденных мясных, птичьих, рыбных полуфабрикатах.

В перечне возбудителей порчи нельзя не учитывать и некоторых других представителей мезофильной микробиоты, в частности бактерии рода *Proteus* [7]. Санитарно-показательное значение бактерий рода *Proteus* заключается в том, что они являются своеобразным «индикатором гнилостной порчи» пищевого продукта.

К санитарно-показательным микроорганизмам относятся количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ, колониеобразующих единиц – КОЕ, в г/мл) особенно при условиях хранения (18 ± 2 °С). Увеличение количества КМАФАнМ в майонезе, который по своей технологии приготовления не зависит и не связан напрямую с микробиологическими процессами свидетельствует о нарушениях температурного режима при их изготовлении, транспортировании, хранении и реализации [8]. Все это в конечном счете может привести к состоянию недоброкачественности продукта.

В настоящей работе проанализированы результаты промышленного внедрения дополнительного этапа обработки оборудования и трубопроводов в собранном виде острым паром при температуре 110 °С и давлении 0,7 ати в течение 15 минут к общепринятой схеме санитарной обработке технологического оборудования при производстве майонеза, состоящей из щелочной мойки для удаления органических соединений, кислотной мойки для растворения и удаления минеральных отложений и органических остатков, дезинфекции, способствующей увеличению срока хранения майонеза и майонезных соусов в процессе его производства вследствие стерилизации производственного оборудования.

Прежде всего, следует отметить, что во всех исследованных образцах отсутствовали представители БГКП, что положительно характеризует технологию получения экспериментальных партий майонеза. Следует отметить, что обеззараживание продукта в производственных условиях реализуется с использованием метода пастеризации при температуре 85 °С. В случае обнаружения БГКП в готовом продукте выпущенная партия не подлежит реализации. Попав с пищей в организм, БГКП могут вызвать последствия, опасные для здоровья человека [9].

Отбор образцов майонеза со стадии фасовки продукции проводился ежедневно в течение 6 дней. Образцы хранились в термостате при температуре 30 ± 2 °С в течение 9 суток с целью провоцирования микробиологических изменений, так как указанный температурный режим является наиболее благоприятным для развития микроорганизмов и позволит сделать прогноз микробиологической стабильности майонеза.

В процессе исследования образцов, полученных путем обработки оборудования острым паром, и без обработки паром не было отмечено развития плесневых грибов и дрожжей. Значения числа КОЕ не превышали 10 и соответствовали норме.

В процессе исследования сырьевых ингредиентов и образцов майонеза, полученных путем обработки оборудования острым паром, и без обработки паром не обнаружены бактерии рода *Proteus, Pseudomonas* и *Bacillus*.

В процессе исследования образцов, полученных путем обработки оборудования острым паром, не было отмечено развития молочнокислых бактерий в исследованных образцах майонеза в течение 5 суток после мойки. Изменение микробиологической картины исследуемых образцов майонеза, выработанных без включения этапа обработки острым паром во время мойки, в процессе хранения наблюдались для молочнокислых бактерий на 2-е сутки, развитие которых способствует повышению кислотности продукта и ухудшению органолептических показателей.

В целях недопущения микробиологической порчи майонеза и сырьевых ингредиентов необходимо соблюдать условия хранения и сроки годности. При производстве майонеза важно проводить микробиологический контроль показателей порчи: молочнокислых бактерий, бактерий рода *Pseudomonas, Proteus* и *Clostridium*, показателя КМАФАнМ, тем более что разработаны методики их обнаружения и идентификации в продуктах питания.

Требуется соблюдение санитарно-гигиенических условий производства, нормативов по набору производственных помещений и технологического оснащения предприятий. При проведении социально-гигиенического мониторинга за контаминацией пищевых продуктов и продовольственного сырья потенциально опасными агентами различной природы следует проводить оценку уровней загрязнения, их опасности и рисков, а также экономического ущерба в результате их порчи, установление гарантированных сроков годности.

Таким образом, в процессе исследований обращено внимание на ряд микроорганизмов и их метаболитов, играющих роль в процессах микробиологической порчи майонеза.

Предложено включить ряд дополнительных микробиологических показателей в перечень возбудителей порчи.

Предложен этап дезинфицирования технологического оборудования и трубопроводов в собранном виде острым паром, способствующий увеличению срока хранения майонеза и майонезных соусов в процессе его производства вследствие стерилизации производственного оборудования.

ЛИТЕРАТУРА

Белова, Л.В. Современные представления о порче пищевой продукции и мерах ее предотвращению / Л.В. Белова, В.В Карцев, И.М. Федотова // Профилактическая и клиническая медицина. – 2011. № 1 (38). – С. 22–25.

Шмелева, Л.И. Техническая микробиология маргарина и майонеза. – М.: Легкая промышленность, 1984. – 152 с.

Сарафанова, Л.А. Применение пищевых добавок. Технические рекомендации. 6-е изд., испр. и доп. – Санкт-Петербург, ГИОРД, 2005. – 200 с.

Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 024/2011. Технический регламент на масложировую продукцию (с изменениями на 23 апреля 2015 года): Решение Комиссии Таможенного союза от 09.12.2011 № 883.

Еремина, И.А. Микробиология продуктов растительного происхождения: Учебное пособие/ И.А. Еремина, Н.И. Лузина, О.В. Кригер. – Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2003. – 87 с.

Санитарно-эпидемиологическая оценка обоснования сроков годности и условий хранения пищевых продуктов: Методические указания МУК 4.2.1847 – 04 – М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 31 с.

Технический регламент Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» ТР ТС 021/2011: Решение Комиссии Таможенного союза от 09.12.2011 № 880.

Карцев В.В. Санитарная микробиология пищевых продуктов / В.В. Карцев, Л.В. Белова, В.П. Иванов. – СПб.: СПбГМА им. И.И. Мечникова, 2000. – 312 с.

Гусева, К. Микробиологический контроль качества майонеза в процессе хранения / К. Гусева // Масла и жиры. – 2005. – № 1 (47). – С. 4–5.

*УДК **635.21:57.085.23***

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА ЭМБИОТА НА РОСТ И РАЗВИТИЕ МИКРОЧЕРЕНКОВ КАРТОФЕЛЯ *IN VITRO*

Г.В. Филиппова, В.Г. Дарханова, Н.С. Строева

Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, Якутск, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Технологии на основе эффективных микроорганизмов (ЭМ) на сегодняшний день являются достаточно перспективными с точки зрения оптимизации минерального питания растений, восстановления плодородия почв, агроэкологии и др. Использование различных штаммов почвенных микроорганизмов позволяет воспроизводить природоподобные процессы по высвобождению из органики биодоступных водорастворимых минеральных соединений, а также способствует устранению патогенной микрофлоры [1–3]. В условиях бурно развивающегося производства по выращиванию грибов с использованием соломенного субстрата особую актуальность приобретает налаживание безотходного производства, основанного на переработке ЭМ отработанного субстрата [4]. Эффективность таких препаратов может быть обусловлена содержанием комплекса биодоступных соединений и минералов, полученных из соломы, мицелия и плодовых тел грибов. Известно, что химический состав стеблей растений и грибов включает различные макро- и микроэлементы, полисахариды, белки, жирные кислоты, биоактивные компоненты [5]. Так, получение коммерческого препарата «Эмбиота» основано на процессах разложения отходов грибоводства с помощью пяти штаммов ЭМ. В составе данного препарата содержатся: азот – 0,56 %, фосфор – 0,35 %, калий – 0,39 %, полигуматы, почвенные микроорганизмы и др.

Цель работы – исследовать влияние препарата «Эмбиота» на рост и развитие микрочеренков картофеля сорта Розара в условиях недостаточного микро- и макроэлементного состава среды произрастания *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте с учетом моделирования условий недостатка минеральных соединений использовали питательную среду по прописи Мурасиге-Скуга [6] с половинным составом микро- и макросолей (1/2 MS). Биопрепарат «Эмбиота» (ЭМБ) вносили в агаризованную среду в концентрациях 2.5; 5; 10; 25; 50 и 100 мл/л. В качестве контролей были вариант без добавления (1/2 MS) и вариант дополненный индолилуксусной кислотой (1/2 MS + ИУК) в концентрации 1 мг/л. Микрочеренки изолировали из апикальной части побегов растений-регенерантов. Каждый черенок имел одно междоузлие с листом. Микрочеренки помещали в индивидуальные биологические пробирки, для каждого варианта формировали группу из 12 шт. Развитие микрочеренков проходило при 16 часовом световом периоде, постоянной температуре 24–25 °С, освещенности 3000 люкс и влажности 70 %. Длительность культивирования составляла 60 дней. Оценивали длину главного побега, число побегов и листьев, линейные размеры самого длинного корня, число придаточных корней, воздушно-сухую массу растений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования показали, что концентрации 5 и 10 мл/л биопрепарата вызывали достоверное превышение контрольного уровня (1/2 MS) по показателям числа побегов и, соответственно числа листьев (табл. 1). Концентрации 10 и 25 мл/л оказывали действие на формирование корневой системы сравнимое с вариантом, дополненным ИУК, что выражалось в увеличении длины корней. Кроме того, отмечено угнетающее действие биопрепарата 50 и 100 мл/л. Следует отметить, что в диапазоне 2.5–25 мл/л опытных концентраций, длина главного побега и число придаточных корней не отличались от контроля (табл. 1). Массы надземной и подземной частей растений опытных вариантов в целом соответствовали их линейным размерам (табл. 2.)

Таблица 1. Средние морфометрические показатели растений-регенерантов картофеля сорта Розара.

Вариант	Длина главного побега, см.	Число побегов, шт.	Число листьев, шт.	Длина корня, см.	Число корней, шт.
1/2 MS	15.2 ± 0.5	3.5 ± 0.4	33.4 ± 4.6	8.1 ± 0.9	4.4 ± 0.7
1/2 MS + ИУК	13.9 ± 0.9	3.4 ± 0.7	34.1 ± 3.6	12.1 ± 0.5*	5.2 ± 0.6
«Эмбиота»					
2.5 мл/л	13.3 ± 1.5	4.0 ± 0.8	27.7 ± 4.5	8.2 ± 1.1	3.2 ± 0.5
5 мл/л	14.7 ± 0.7	5.2 ± 0.8*	49.4 ± 8.5*	9.5 ± 1.4	4.9 ± 0.6
10 мл/л	13.9 ± 1.2	5.0 ± 0.5*	41.7 ± 3.3*	10.9 ± 0.8*	5.3 ± 0.6
25 мл/л	15.4 ± 0.5	3.9 ± 0.4	33.2 ± 2.2	11.7 ± 1.5*	4.2 ± 0.5
50 мл/л	11.9 ± 1.0*	2.6 ± 0.3*	24.1 ± 3.2*	9.3 ± 0.8	3.6 ± 0.5
100 мл/л	8.3 ± 1.1*	1.3 ± 0.1*	13.8 ± 1.2*	7.6 ± 0.5	2.2 ± 0.3*

* – различия статистически значимы по сравнению с вариантjм 1/2 MS ($p \leq 0.05$, ANOVA, критерий Даннета)

Таблица 2. Воздушно-сухая масса растений-регенерантов картофеля, г.

Вариант	Масса надземной части	Масса корня	Отношение надземной / подземной массы
1/2 MS	0.023 ± 0.002	0.014 ± 0.002	1.64
1/2 MS + ИУК	0.028 ± 0.002*	0.027 ± 0.004*	1.04
«Эмбиота»			
2.5 мл/л	0.020 ± 0.004	0.011 ± 0.004	1.82
5 мл/л	0.031 ± 0.002*	0.018 ± 0.003	1.72
10 мл/л	0.029 ± 0.003*	0.020 ± 0.002*	1.45
25 мл/л	0.022 ± 0.002	0.014 ± 0.002	1.57
50 мл/л	0.018 ± 0.002*	0.010 ± 0.003	1.80
100 мл/л	0.007 ± 0.001*	0.003 ± 0.001*	2.33

* – различия статистически значимы по сравнению с вариантjм 1/2 MS ($p \leq 0.05$, ANOVA, критерий Даннета)

Показано, что в данных экспериментальных условиях значение такого показателя, как отношение надземной части к подземной в опытных вариантах было выше при воздействии следующих концентраций 2.5; 5; 50 и 100 мл/л, что свидетельствует об увеличении фитомассы побегов относительно массы корней. Наименьшее значение относительно контрольного варианта без добавок отмечено в варианте 10 мл/л.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, применение препарата «Эмбиота» оказывало влияние на рост и развитие микрочеренков картофеля сорта Розара в условиях культуры *in vitro*. Отмечено стимулирующее действие данного препарата в концентрациях 5 и 10 мл/л, причем наряду с высоким ростом побегов последняя вызывала более высокий рост и развитие корневой системы растений картофеля. Высокие концентрации 50 и 100 мл/л обладали выраженным ингибирующим действием. Полученные результаты исследований подтверждают эффективность применения определенных концентраций биопрепарата «Эмбиота» в условиях недостаточного микро- и макроэлементного состава среды произрастания.

ЛИТЕРАТУРА

Мотина Т.Ю., Дегтярева И.А., Давлетшина А.Я., Яппаров И.А., Алиев Ш.А., Бабынин Э.В. Биоудобрения комплексного действия на основе консорциума микроорганизмов и наноструктурных агроминералов для получения экологически безопасной продукции растениеводства // Вестник Технологического университета. Т.20. № 12. 2017. С. 122–126.

Шаблин П.А. Применение ЭМ – технологии в сельском хозяйстве. Сборник трудов: Микробиологические препараты «Байкал ЭМ1», «Тамир». Москва. 2006. С. 23–36.

Евсеева Е.А. Биотехнологические приемы получения экологически чистой высококачественной продукции (на примере технологии эффективных микроорганизмов) // Аграрный вестник приморья. № 3(11). 2018. С. 35–38

Валиев М.М., Тухватуллин Р.А. Модель безотходного высокодоходного сельскохозяйственного предприятия с применением биотехнологий // Аграрный вестник Урала. № 3(69). 2010. С. 41–43.

Кароматов И.Д., Саломова М.Ф. Медицинское значение грибов вешенки // Биология и интегративная медицина. № 9. 2017. С. 78–88.

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures // Physiologia Plantarum. 1962. V. 15. P. 473–476.

УДК 636.085

ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ КОМПЛЕКСНЫХ КОРМОВЫХ КОНЦЕНТРАТОВ

М.В. Лукьяненко, Р.В. Казарян, А.С. Бородихин, А.А. Фабрицкая

Краснодарский научно-исследовательский институт хранения и переработки сельскохозяйственной продукции – филиал ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия», Краснодар, Россия

Развитие промышленности на сегодняшний день немыслимо без применения биотехнологий, что обусловлено рядом причин. Рост населения на земном шаре неизменно ведёт к потребностям наращивания производства пищевой продукции, при этом резервы интенсификации производства, в частности, животноводческой продукции исчерпаемы при условии использования традиционных решений. Кроме этого, развитие научно-технического прогресса привело к нарушению экологического баланса с перенасыщением окружающей среды экологически вредными веществами. Так, производство растениеводческой продукции связано с рисками её загрязнения химическими веществами, применяемыми для возделывания сельскохозяйственных культур, повышения их урожайности, защиты от вредителей, а также продуктами жизнедеятельности патогенных микроорганизмов. Пути поступления экологически вредных веществ в растениеводческую продукцию – воздух, вода, почва. При производстве продукции животноводства эта ситуация усложняется тем, что поступление экологически вредных веществ в организм животных и птицы происходит не только через указанные пути, но и дополнительно с употреблением загрязнённых кормов. В результате этого продуктивность сельскохозяйственных животных и птицы снижается, что

может усугубляться некорректным применением антибиотиков, приводящих к нарушению полезной микрофлоры желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Выходом из сложившейся ситуации является применение в рационах сельскохозяйственных животных и птицы специальных кормовых добавок, направленных на нормализацию обменных процессов, профилактику барьерных органов и репродуктивной системы.

Известно, что питание, как для человека, так и для животного, выполняет четыре основные функции: энергетическую, регуляторную, строительную и удовольствия. Наиболее важной, с точки зрения нормализации обменных процессов, на наш взгляд, является регуляторная функция. Так, обогащая рацион питания сельскохозяйственных животных и птицы биологически активными веществами, участвующими в важных физиологических процессах, появляется возможность регулирования процессов, протекающих, например, в печени. Нормализация работы только одного этого органа способна многократно повысить устойчивость организма по отношению к воздействию экологически вредных веществ. Применение же в комплексе с биологически активными веществами пробиотиков, являющихся естественными антагонистами патогенной микрофлоры и продуцирующих, в том числе витамины группы В [1], оказывает тем самым положительное действие на ЖКТ, а также позволяет усилить эффект и повысить продуктивность животных и конверсию корма.

Для повышения продуктивности сельскохозяйственной птицы учёными Краснодарского научно-исследовательского института хранения и переработки сельскохозяйственной продукции – филиала ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия» была поставлена задача создания комплексного кормового концентрата (ККК), содержащего витаминно-минеральную кормовую добавку (ВМКД), обеспечивающую профилактику микотоксикозов [2], и пробиотическую добавку, обеспечивающую повышение конверсии корма.

Витаминно-минеральная кормовая добавка содержит в составе комплекс биологически активных веществ, а именно, бета-каротин, витамины Е и С, фосфолипиды и селен.

Ранее нами были получены убедительные данные, доказывающие антитоксические свойства ВМКД, позволяющие нивелировать негативное воздействие кормов, загрязнённых микотоксинами [3]. Однако, помимо нормализации работы барьерных органов, важной задачей является и повышение конверсии корма, что можно достичь введением в основной рацион (ОР) пробиотиков [4,5].

Для выбора пробиотика при разработке ККК нами были исследованы следующие пробиотические добавки, применяемые в животноводстве (таблица).

На основании результатов предварительных опытов в качестве пробиотической добавки при разработке ККК нами была выбрана добавка Бацелл-М, содержащая в составе три штамма микроорганизмов, позволяющих повысить усвояемость кормов и нормализовать деятельность ЖКТ.

В опытах на лабораторных животных нами было установлено эффективное соотношнение пробиотической добавки Бацелл-М и ВМКД, равное 1,0:1,5, обеспечивающее высокую эффективность проявления антитоксических, гепатопротекторных и антиоксидантных свойств, а также высокий прирост массы лабораторных животных.

Комплексный кормовой концентрат выявленного состава был испытан в реальных условиях на цыплятах-бройлерах и ремонтном поголовье кур-несушек, входящих в продуктивную фазу.

Данными научно-производственного опыта установлено, что содержание белка и жира в мясе цыплят-бройлеров опытной группы, получавшей с ОР дополнительно ККК, выше по сравнению с содержанием белка и жира в мясе цыплят-бройлеров контрольной группы, получавшей только ОР на 7,02 и 2,44 % соответственно, а содержание фосфолипидов в мясе цыплят-бройлеров опытной группы по сравнению с контрольной группой выше в 2,12 раза. Кроме этого, в мясе цыплят-бройлеров опытной группы отмечено более высокое содержание, по сравнению с контрольной группой, витамина А (в 2,4 раза), витамина Е (в 2,2 раза). При исследовании кулинарных свойств мяса цыплят-бройлеров установлено, что суммарная балльная оценка вареного фарша, приготовленного из мяса цыплят-бройлеров опытной группы, составила 46,0 баллов, контрольной группы – 40,5 баллов, а бульона – 39,8 и 38,0 баллов соответственно. Введение комплексного кормового концентрата в рацион молодняка кур-несушек способствует получению яиц более высокого качества, пищевой ценности и в большем количестве (на 17,1 %) по сравнению с контрольной группой. Установлено, что в яйцах, полученных от кур-несушек опытной группы, содержание жира выше, чем содержание указанных веществ в яйцах контрольной группы кур-несушек на 11,52 %, фосфолипидов – в 2,08 раза, витамина А – в 2,66 раза, витамина Е – в 2,27 раза. Содержание бета-каротина в желтке яиц от кур-несушек опытной группы в 4,4 раза выше, чем в желтке яиц от кур-несушек контрольной группы.

Таблица – Состав и основные направления действий пробиотических добавок

Наименование пробиотической добавки	Состав активной микрофлоры	Основное действие	Консистенция
Бацелл-М	*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus paracasei, Enterococcus faecium*	Повышение естественной резистентности организма животных, нормализация деятельности ЖКТ, стимуляция обменных процессов, повышение усвояемости кормов, нейтрализация поступающих с кормами токсинов, повышение продуктивности и сохранности	Порошок
Моноспорин	*Bacillus subtilis*	Улучшение усвояемости корма и повышение прироста живой массы, деградация сахарозы, мальтозы, глюкозы, продуцирование каталазы, эндоглюконазы и других ферментов (целлюлазы, целлобиазы и пектиназы), участвующих в расщеплении целлюлозы и пектиновых веществ; стимулирование развития кишечных целлюлозолитических руминококков, лактобацилл, гидролиза крахмала, активация обмена веществ в организме животных, стимулирование синтеза аминокислот и витаминов, подавление патогенной микрофлоры, усиление неспецифического иммунитета	Жидкость
Моноспорин сухой			Порошок
Пролам	*Lactobacillus delbrueckii subsp.bulgaricus, Bacillus sporothermodurans* 43с, *Lactococcus lactis subsp.lactis* 57_4, *Lactococcus lactis subsp. Lactis* 170_4-5, *Bifidobacterium animalis* 8_3	Профилактика дисбактериозов и повышение естественной резистентности сельскохозяйственных животных, птиц, рыб, нормализация деятельности желудочно-кишечного тракта, стимуляция обменных процессов в организме, повышение усвояемости кормов	Жидкость

Таким образом, создание и применение комплексных кормовых концентратов, содержащих биологически активные вещества и пробиотические добавки, представляется перспективным и заслуживает особого внимания в решении задач повышения продуктивности сельскохозяйственных животных и птицы, а также получении продукции животноводства и птицеводства более высокого качества, пищевой ценности и кулинарных свойств.

ЛИТЕРАТУРА

Ардатская М.Д. Пробиотики, пребиотики и метабиотики в коррекции микроэкологических нарушений кишечника // Медицинский совет, 2015. – № 13 – С. 94–99.

Влияние полифункциональной кормовой добавки «Тетра+» на сохранность, активность роста и показатели качества мяса кур / Р.В. Казарян [и др.] // Сборник научных трудов Ставропольского научно-исследовательского института животноводства и кормопроизводства, 2014. – Т. 2. – № 7. – С. 525–528.

Отчет о НИР. Выявить закономерности влияния инновационных кормовых добавок на продуктивность, безопасность, качество, пищевую ценность и себестоимость производства яиц и мяса кур/ Р.В. Казарян [и др.] // ФГБНУ КНИИХП, 2014. – 91 с.

Тараканов Б.В., Николичева Т.А., Манухина А.И. Микрофлора кишечника, иммунный статус и продуктивность цыплят-бройлеров при включении в рацион пробиотика микроцикола // Сельхозбиология. 2007. № 2. URL: https://cyberleninka.ru/article/n/mikroflora-kishechnika-immunnyy-status-i-produktivnost-tsyplyat-broylerov-pri-vklyuchenii-v-ratsion-probiotika-mikrotsikola (дата обращения: 24.11.2018).

Грозина А.А. Состав микрофлоры желудочно-кишечного тракта у цыплят-бройлеров при воздействии пробиотика и антибиотика (по данным t-rflp-rt-pcr) // С.-х. биол., Сельхозбиология, S-h biol, Sel-hoz biol, Sel'skokhozyaistvennaya biologiya, Agricultural Biology. 2014. – № 6. URL: https://cyberleninka.ru/article/n/sostav-mikroflory-zheludochno-kishechnogo-trakta-u-tsyplyat-broylerov-pri-vozdeystvii-probiotika-i-antibiotika-po-dannym-t-rflp-rt-pcr (дата обращения: 26.11.2018).

Перспективы применения β-каротина в производстве пищевых продуктов и кормовых добавок / Р.В. Казарян [и др.] // Известия ВУЗов. Пищевая технология. – 2018. – № 5–6. – С. 6–9.

УДК 664

НОВЫЕ ТВОРОЖНО-РАСТИТЕЛЬНЫЕ ПРОДУКТЫ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО НАЗНАЧЕНИЯ

Е.А. Пожидаева, Е.С. Попов

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Актуальным направлением развития рынка снековой продукции является появление новых ассортиментных линеек функциональных пищевых систем обогащенных природными биокорректорами, пробиотическими компонентами, такие как творожки, йогурты, фреши, суфле, чипсы, галеты [1, 2]. В связи с этим задачей экспериментальных исследований являлась разработка технологии творожных чипсов с включением растительных биологически активных веществ с последующей оценкой биопотенциала конечного продукта.

Объектом экспериментальных исследований являлся творожный продукт (чипсы), подвергнутые сушке в поле СВЧ. Опытные образцы чипсов включали творог с массовой долей жира 5,0 %, яичный порошок, вкусо-ароматический наполнитель (хлопья перца сладкого красного). В качестве растительного биокорректора в состав творожного продукта дополнительно вводили муку зародышей пшеницы обладающей высоким биотехнологическим потенциалом, обусловленным уникальным жирно-кислотным, витаминным и минеральным составом [3, 4]. Контрольным образцом являлся творожный продукт (чипсы) на основе творога с массовой долей жира 5,0 %, яичного порошка, вкусо-ароматического наполнителя подвергнутые конвективной сушке при температуре 62°С.

Процесс сушки творожного продукта исследовали при следующих параметрах: мощность электромагнитного поля варьировали в диапазоне 100–900 Вт, скорость потока воздуха составляла 0,6 м/с. Установлено, что мощность СВЧ-поля оказывает значительное влияние на процесс сушки образца творожного продукта. Установлено, что при увеличении мощности СВЧ-поля скорость процесса сушки и температура продукта увеличиваются и достигает своего максимума при 900 Вт. При данной мощности образец продукта нагревается до температуры свыше 60°С, что приводит к снижению термолабильных компонентов и соответственно, к снижению качественных характеристик готового продукта. Оптимальными параметрами для выработки творожного продукта являются следующие режимные параметры в поле СВЧ: температура 50–55 °С, мощность 750–800 Вт.

Органолептические и физико-химические показатели разработанного творожного продукта приведены в табл. 1, 2.

Таблица 1 – Органолептические показатели творожного продукта

Показатель	Характеристика
Консистенция и внешний вид	Хрустящий продукт в виде прямоугольных, круглых, овальных, пластин или изделий другой формы, толщиной не более 2 мм
Вкус и запах	Чистые, без посторонних привкусов и запахов, обусловленный привкусом внесенного наполнителя
Цвет	От белого до желтоватого оттенка, обусловленный цветом внесенного наполнителя

Таблица 2 – Физико-химические показатели творожного продукта

Наименование показателя	Значение показателя
Массовая доля жира, %	1,9
Массовая доля белка, %	13,1
Массовая доля влаги, %	5,0
Кислотность, °Т	75,0
Температура продукта при выпуске с предприятия, °С	20 ± 2

Проведенная оценка биопотенциала разработанного творожного продукта показала, что исследуемый объект является источником белка, витаминов – B_1, B_3, B_9, E, D, макро – и микроэлементов – Ca, P, Mn. Контрольный образец практически не содержал витаминов – B_3, B_9, E, а также цинка, марганца. Введение в состав опытного изделия растительного биокорректора позволило существенно повысить степень удовлетворения суточной потребности организма по сравнению с контрольным образцом, в 11,3, 20,5, 2,15, 196,0, 1,77, 23,43, 27,0 раза, соответственно, в витаминах B_1, B_9, A, D, макро – и микроэлементах – P, Zn, Mn.

Таким образом, доказана возможность применения разработанного творожного продукта с включением муки из зародышей пшеницы для покрытия физиологических потребностей организма в широком спектре биологически активных веществ. Полученные данные позволяют констатировать удовлетворение суточной потребности организма новым творожным продуктом более, чем на 20 % по белку, а также витаминам – B_1, B_3, B_9, E, D, макро- и микроэлементам – Ca, P, Mn, что позволяет отнести данный продукт к группе функциональных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Калинина, И.В. Современные подходы в технологии безопасной снэковой продукции / И.В. Калинина, А.А. Руськина // Вестник Южно-Уральского государственного университета. – 2017. – Т. 2, № 3. – С. 29–36.

2. Антипова, Л.В. Тенденции развития научных основ проектирования пищевых продуктов / Л.В. Антипова, Н.С. Родионова, Е.С. Попов // Известия вузов. Пищевая технология. – 2018. – № 1. – С. 8–10.

3. Исследование форм связи влаги в творожных продуктах методом дифференциально-сканирующей калориметрии и термогравиметрии / Е.А. Пожидаева, А.В. Илюшина, Н.В. Болотова, Е.В. Иванова // Пищевая промышленность. – 2018. – № 11. – С. 73–77.

4. Растительные нутриентные корректоры в технологии замороженных творожных полуфабрикатов / Л.В. Голубева, Е.А. Пожидаева, О.И. Долматова, Н.В. Болотова, А.В. Илюшина // Пищевая промышленность. – 2017. – № 1. – С. 38–40.

УДК 636.52/.58:57.089.36

КРИОБАНКИ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ: СОЗДАНИЕ, НАЗНАЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Н.А. Волкова, Н.А. Зиновьева, В.А. Багиров

Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, Московская область, Россия

Сохранение генетического разнообразия сельскохозяйственной птицы является одной из приоритетных задач современной биологической науки. На сегодняшний день создано достаточно большое количество пород, многие из которых занимают прочные позиции благодаря определенным продуктивным и адаптационным качествам. Однако в последние годы в мировой практике отмечается тенденция к снижению общего количества пород. Одним из путей решения данной проблемы является консервация генетических ресурсов, которая может быть осуществлена in situ (разведение и поддержание в чистоте пород и линий) или ex situ (криобанки). Последнее направление является перспективным, т. к. позволяет значительно снизить материальные затраты на содержание и разведение птицы и избежать необратимых потерь пород и генов. Кроме того криобанки биологического материала могут быть использованы для воссоздания породы, а также для поддержания малых популяций и сохранения генетического разнообразия (генов, свойств, пород) в селекционных программах. Однако в отличие от сельскохозяйственных животных для сельскохозяйственной птицы на сегодняшний день не разработано эффективных методов криоконсервации половых клеток, что связано с ее биологическими особенностями. Вместе с тем, особенности биологии развития птицы, в частности, протекание эмбриогенеза вне организма самки и короткий генерационный интервал, позволяет значительно расширить спектр биологического материала, пригодного для воссоздания и сохранения генофонда сельскохозяйственной птицы.

Генетическим материалом для криоконсервации могут служить как мужские (спермии), так и женские (яйцеклетки) половые клетки. В качестве источника генетического материала для криоконсервации могут рассматриваться: (1) спермии; (2) малодифференцированные половые клетки самцов – сперматогонии; (3) первичные половые клетки (ПЗК) эмбрионов.

В настоящее время основным генетическим материалом, используемым для создания криобанков пород и линий сельскохозяйственной птицы, являются зрелые половые клетки самцов – спермии. Данные клетки могут быть использованы для реконструкции пород через поглотительные скрещивания, однако в полученном потомстве определенный процент генов сохранится от материнской родоначальной популяции. Так, для восстановления 95 % генома породы необходимо получение пяти генераций потомков путем поглотительного скрещивания.

Ускорить процесс восстановления породы позволяет использование зародышевых (ПЗК) и малодифференцированных (сперматогонии) половых клеток, являющихся предшественниками зрелых половых клеток. Данный подход предполагает введение донорских клеток в органы-мишени (гонады эмбрионов, семенники самцов) стерильных особей-реципиентов с последующим их использованием в качестве «биореактора» по производству половых клеток донорской породы, которые могут быть использованы для получения особей восстанавливаемой породы.

Использование в качестве генетического материала ПЗК эмбрионов предполагает получение химерных особей по линии как мужских, так и женских половых клеток. На сегодняшний день доказана тотипотентность примордиальных зародышевых клеток (ПЗК): при введении донорских ПЗК в эмбрионы-реципиенты дальнейшая их дифференцировка в зрелые мужские или женские половые клетки происходит в зависимости от пола эмбриона-реципиента. При инъекции ПЗК, выделенных от одной породы, в эмбрионы-реципиенты другой породы получают химерных особей по зародышевой линии клеток. Дальнейшее скрещивание данных особей между собой позволяет получить птицу исходной донорской породы.

Сперматогонии относят к стволовым клеткам семенников самцов. В случае трансплантации данного типа клеток в семенники самцов-реципиентов наблюдается колонизация донорских клеток в семенных канальцах, которые в последующем в процессе дифференцировки образуют популяцию половых клеток с внесенной донорской генетической информацией. Семя, полученное от таких самцов реципиентов, используют для осеменения самок с целью получения особей исходной донорской породы.

Вместе с тем, эффективность используемых на сегодняшний день методов по выделению и криоконсервации зародышевых и половых клеток сельскохозяйственной птицы является относительно низкой. Кроме того, учитывая то, что все работы в данном направлении ведутся, преимущественно, на курах и перепелах, для большинства видов сельскохозяйственной птицы данные методические подходы практически не отработаны.

В этой связи нами был проведен ряд экспериментов по отработке и оптимизации отдельных этапов технологической цепочки по выделению и криоконсервации зародышевых и малодифференцированных половых клеток разных видов сельскохозяйственной птицы, в частности, кур, перепелов, уток, гусей, индеек и цесарок. Установлено, что оптимальным возрастным периодом для получения культуры эмбриональных клеток, максимально обогащенной ПЗК, является возраст эмбрионов от 5 до 6 дней для кур, до 5 дней – для перепелов, от 6 до 7 дней – для цесарок, гусей и уток. Разделение клеток разных типов с учетом их различной способности к адгезии позволило получить культуру ПЗК, максимально очищенную от других типов клеток. Высокая жизнеспособность зародышевых клеток при их криоконсервации отмечалась при использовании криозащитной среды, включающей 90 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота и 10 % криопротектора ДМСО.

Гистологические исследования возрастных особенностей сперматогенеза у самцов разных видов сельскохозяйственной птицы показали, что оптимальным возрастом для получения культуры сперматогоний служит период от 1 до 3 недель для перепелов, от 1 до 8 недель – для цесарей и от 1 недели до 3 месяцев – для селезней, индюков и гусаков. В данный возрастной период сперматогенные клетки в семенных канальцах семенников представлены, преимущественно, клетками Сертоли и сперматогониями. Высокая эффективность дезагрегации ткани семенников самцов сельскохозяйственной птицы с целью выделения сперматогенных клеток, в том числе сперматогоний, была установлена при последовательной механической и ферментативной обработке с использованием 0,25 % трипсина и 0,1 % раствора коллагеназы. Разделение клеток разных типов с учетом их различной способности к адгезии позволило получить культуру сперматогоний, максимально очищенную от других типов клеток (до 85 %). Было установлено, что оптимальной криозащитной средой для сперматогенных клеток сельскохозяйственной птицы является среда, включающая 70 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота, 20 % среды ДМЕМ и 10 % криопротектора ДМСО.

Возможность криоконсервации зародышевых и половых клеток сельскохозяйственной птицы в условиях криобанков открывают широкие возможности для использования данных типов клеток в программах по сохранению биоресурсных коллекций пород сельскохозяйственной птицы.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РНФ, проект № 16–16–04104.

УДК 664

ЭМУЛЬГИРУЮЩИЕ СВОЙСТА ПРОБИОТИЧЕСКИХ СИСТЕМ, ОБОГАЩЕННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫМИ БИОКОРРЕКТОРАМИ

Н.С. Родионова, Е.С. Попов, Н.А. Родионова

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Многочисленные соединения, жизненно необходимые человеку, по своей природе не могут синтезироваться в организме, при их недостатке возникает ряд заболеваний, а длительное их отсутствие рационе может привести к смерти. Первоисточник всех незаменимых элементов пищи, обладающих биокорректирующими свойствами (провитамины и витамины, макро- и микроэлементы, отдельные липиды и аминокислоты) в различных концентрациях идентифицированы в растительном сырье. В любом зерне выделяют белково-углеводную и липидную часть, соотношение которых варьируется в широких пределах. Липидную составляющую можно обозначить, как эндогенный аккумулятор для воспроизводства энергии в процессе прорастания, который должен быть максимально защищен от кислорода воздуха и негативных воздействий окружающей среды. Белково-углеводная составляющая как правило, выполняет функцию строительного материала в процессе прорастания. Именно в липидной составляющей любых семян максимально сконцентрированы биологически активные вещества и стабилизаторы процессов окисления (каротиноиды, токоферолы, фенольные соединения, аскорбаты, и длинноцепочечные n-стеролы). Известно, что понижение масличности зерна и снижения концентрации липидной составляющей приводит к росту в ней содержания полиненасыщенных соединений (ω-3 и ω-6 жирных кислот, стеринов, стеролов, углеводородов типа скваленов), что обусловлено необходимостью сохранности запаса энергии и его эффективности [1, 2]. Именно этой биологической ролью липидов растительных объектов объясняется их чрезвычайно высокая биокорректирующая активность для человека. Для максимальной реализации данного природой потенциала растительных жиров в организме человека необходимо обеспечение их высокой биодоступности и эффективности всасывания. Это может достигаться при комбинировании биоактивных липидных компонентов с пробиотическими культурами, которые выполняют ряд важнейших и незаменимых функций в организме благодаря синтезу микробных экзо- и эндометаболитов белковой и полисахаридной природы [3]. Перечисленные метаболиты характеризуются сложной биополимирной молекулярной структурой, формирующей их дифильные свойства, позволяющие получать устойчивые эмульсии на их основе.

С целью получения устойчивых эмульсий исследовали ферментированные молочные среды с различными консорциумами лакто и бифидобактерий: 1 – Str. thermophilus, L. Casei subsp. Rhamnosus, 2 – Str. thermophiles, B. bifidum, B. longum, B. adolescentis; 3 – Str. thermophilus, L. acidophilus, L. plantarum, L. fermentum; 4 – Str. thermophilus, L. Casei subsp. Rhamnosus, L. acidophilus, L. plantarum, L. fermentum Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium longum, Bifidobacterium adolescentis с микробным числом не ниже 9.

В качестве липидной составляющей исследовали масло зародышей пшеницы, обладающее широким спектром доказанных биокорректирующих свойств [4]. Концентрацию масла в пробиотических ферментированных системах варьировали в диапазоне 3–10 %. Эмульгирование осуществляли методом ультразвукового диспергирования при специально подобранной частоте. При обработке ультразвуком были получены эмульсии, исследование устойчивости которых осуществляли методом центрифугирования (таблица 1).

Установлено, что величины эмульгирующей способности ферментированных молочных сред находятся на уровне 87,7–91,2 %, а значения стабильности эмульсии находились на уровне 90,3–94,1 %. Полученные результаты свидетельствуют о способности ферментированных молочных сред с различными консорциумами лакто и бифидобактерий образовывать устойчивые эмульсии, что следует учитывать при определении последовательности соединения жиросодержащих компонентов рецептур в системы, содержащие данные молочные среды.

Таблица 1 – Эмульгирующие свойства ферментированных молочных сред

Наименование показателя	Ферментированные молочные среды с различными консорциумами лакто и бифидобактерий			
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4
ЭС, %	87,7	88,1	88,4	91,2
СЭ, %	90,3	91,0	91,3	94,1

Приём материалов статей по адресу: actbio@mail.ru

Таким образом, доказана эмульгирующая способность ферментированных пробиотических систем, возможность получения устойчивых эмульсий на основе масла зародышей пшеницы с концентрацией липидной фракции в диапазоне 3–10 %. Полученные эмульсии могут быть применены при производстве пищевых, косметических и кормовых продуктов биокорректирующего действия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Родионова, Н.С. Нутриентные корректоры пищевого статуса на основе продуктов глубокой переработки низкомасличного сырья: монография / Н.С. Родионова, Е.С. Попов, О.А. Соколова; Воронеж. гос. ун-т. инж. технол. – Воронеж, 2016. – 240 с.

2. Исследование форм связи влаги в творожных продуктах методом дифференциально-сканирующей калориметрии и термогравиметрии / Е.А. Пожидаева, Е.С. Попов, А.В. Илюшина, Н.В. Болотова, Е.В. Иванова // Пищевая промышленность. – 2018. – № 11. – С. 73–77.

3. Родионова, Н.С. Дифференциально-термический анализ в оценке экзополисахаридной активности консорциумов пробиотических микроорганизмов / Н.С. Родионова, А.А. Родионов, Е.С. Попов, Т.А. Разинкова // Известия Вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2018. – Т. 8. – № 4. – С. 95–105.

4. Родионова, Н.С. Теоретические аспекты разработки технологий и компонентного состава растительной комплексной пищевой системы на основе продуктов глубокой переработки низкомасличного сырья: монография / Н.С. Родионова, Т.В. Алексеева; Воронеж. гос. ун-т. инж. технол. – Воронеж, 2014. – 224 с.

УДК 633.491: 631.532/.535 (631.8/535: 581.144)

ЭФФЕКТИВНОСТЬ РИЗОСФЕРНЫХ БАКТЕРИЙ ПРИ КОИНОКУЛЯЦИИ МИКРОКЛОНОВ КАРТОФЕЛЯ IN VITRO

О.В. Ткаченко[1], К.Ю. Каргаполова[1], Г.Л. Бурыгин[1,2], Н.В. Евсеева[2], Е.Е. Костина[1], А.Ю. Денисова[1], М.А. Григорян[1]

[1] Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова, Саратов, Россия
[2] Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

Современное сельское хозяйство активно вовлекает в производство высокотехнологичные методы агробиотехнологии, в том числе метод ускоренного производства оздоровленного посадочного материала на основе микроклонального размножения *in vitro*, а также стимулирования роста растений с помощью ризосферных бактерий (PGPR). Ранее нами было показано, что бактерии *Azospirillum brasilense* Sp245 из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (http://collection.ibppm.ru/) активизируют развитие корневой системы микроклонов растений *in vitro*, стимулируют адаптацию полученных регенерантов к условиям *ex vitro*, а также способствуют увеличению урожая мини-клубней картофеля (Tkachenko et al. 2015). Также было установлено достоверное положительное влияние выделенного из ризосферы картофеля оригинального штамма *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 (Burygin et al., 2019) на морфометрические параметры микрорастений картофеля в условиях *in vitro* и *ex vitro*. При этом показано, что ростстимулирующий эффект ризосферных бактерий рода *Azospirillum* и *Ochrobactrum* при инокуляции ими микрорастений картофеля в культуре *in vitro* специфичен в отношении сроков инокуляции (Бурыгин с соавт., 2018). Можно предположить, что коинокуляция одновременно двумя штаммами ризосферных бактерий, дополняющими друг друга, может вызвать синергетический эффект на рост растения. С другой стороны, эффективность коинокуляции может осложняется в процессе межклеточных и межорганизменных взаимодействий.

Данный проект направлен на изучение влияния на микрорастения картофеля бактерий штаммов *Azospirillum brasilense* Sp245 и *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 по отдельности и в комплексе в модельных системах *in vitro* с целью усовершенствования перспективных экологически чистых агробиотехнологий.

Контрольные микрорастения картофеля сорта Невский черенковали на питательную среду Мурасиге-Скуга без гормонов и культивировали на стеллажах с люминисцентными лампами при фотопериоде 16 часов и температуре 25° С. В опытных вариантах микрорастения инокулировали суспензией бактерий (10^6 кл/мл) штамма *Azospirillum brasilense* Sp245 на 0 сутки или *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 на 15 сутки культивирования растений, или двумя штаммами в те же сроки. После 30 суток культивирования *in vitro* микрорастения высаживали в сосуды с почвой для адаптации к условиям *ex vitro*. Оценивали морфометрические параметры растений на 30 сутки культивирования *in vitro* и на 20 сутки выращивания в почве (*ex vitro*).

В результате проведенных исследований установлено, что инокулирование микрорастений штаммами ризосферных бактерий по отдельности и совместно оказывало ростостимулирующее влияние в условиях *in vitro* по параметрам: длина стебля, количество узлов на побеге, количество корней и масса побега. В варианте коинокуляции растений одновременно двумя штаммами достоверно увеличивались длина стебля и количество корней на побеге по сравнению не только с контролем, но и с инокуляцией каждым штаммом в отдельности.

В процессе адаптации микрорастений к условиям выращивания в почве было обнаружено достоверное превосходство совместного действия штаммов бактерий. В этом варианте растения на 20 сутки имели меньшую длину побега, но с большим количеством листьев, а также корневую систему большей массы. Растений, инокулированные каждым штаммом по отдельности, превосходили контрольные по длине побега и количеству листьев на нем, но масса корней и побегов при этом была ниже, чем в контроле и варианте с коинокуляцией.

Таким образом, установлен положительный эффект совместного использования бактериальных штаммов *Azospirillum brasilense* Sp245 и *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 для инокуляции микрорастений картофеля сорта Невский в культуре *in vitro*, что может быть использовано при микроклоналном размножении картофеля в системе семеноводства на оздоровленной основе.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ 19–016–00116.

ЛИТЕРАТУРА

Бурыгин Г.Л., Каргаполова К.Ю., Евсеева Н.В., Ткаченко О.В. Особенности инокуляции растений ризосферными бактериями как фактор повышения эффективности микроклонального размножения картофеля // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова – 2018. – Т. 14, № 2. – С. 12–16.

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. Biotechnol. – 2019. – V. 35(4). – P. 55.

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.

УДК 579.841.112 : 547.743.1

ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ПРЕПАРАТ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ СОСУДИСТОГО БАКТЕРИОЗА КРЕСТОЦВЕТНЫХ МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

М.А. Кузнецов, А.А. Щербаков, С.В. Савина, В.М. Скорляков, С.В. Иващенко, В.С. Муртаева

Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова

Сосудистый бактериоз крестоцветных является одним из наиболее опасных заболеваний сельскохозяйственных культур. Он поражает практически все известные растения, относящиеся к семейству крестоцветных. Его возбудитель широко распространён в природе и обладает высокой патогенной активностью [1]. В связи с этим, его диагностика, а также профилактика вызываемых им бактериозов, является актуальной задачей.

На сегодняшний день показано, что наиболее эффективным методом диагностики сосудистого бактериоза капусты является иммуноферментный анализ (ИФА). Он обладает достаточно высокой чувствительностью, позволяет выявлять наличие возбудителя при минимальной степени обсеменения и, по сравнению с другими методами, отличается простотой, что делает его удобным для массового применения.

При создании иммуноферментных диагностических систем важное значение имеет правильный выбор гипериммунной сыворотки, содержащей антитела к выявляемому возбудителю. При этом, значение имеют не только характеристики возбудителя, антигены которого используются для получения сыворотки, но и характеристики применяемого для этого адъюванта. Современные разработки в этой области позволяют получать диагностические препараты с большей эффективностью, уменьшая необходимые для этого материальные и временные затраты.

Целью работы являлось создание диагностического препарата на основе иммуноглобуллинов к клеточной стенки возбудителя сосудистого бактериоза крестоцветных. В ходе исследования решались задачи по получению препарата клеточной стенки *X. campestris*, получению гипериммунных кроличьих сывороток с применением различных адъювантов и оценке специфичности этих сывороток и применявшихся для их получения адъювантов.

Необходимое для работы количество биомассы микроорганизмов *X. campestris* B-611 и препарата дезинтегрированных клеточных мембран получали по общепринятым методикам [2, 3]. Концентрацию белков в препарате определяли спектрофотометрически по методу Лоури [4].

Гипериммунную сыворотку получали подкожной иммунизацией кроликов вдоль спины в 3–4 точки в объёме 1 мл смеси антигена и адъюванта в соотношении 1:1 с интервалом между последующими иммунизациями в 2 недели. Всего было проведено 7 иммунизаций. В контрольных группах антиген заменяли физиологическим раствором. В качестве адъювантов использовались полный адъювант Фрейнда (ПАФ) и химическая полиэлектролитная субстанция, состоящая из 0,05 %-й раствор полиазолидинамммония, модифицированного гидрат-ионами галогенов, в физиологическом растворе (ПААГ). Всего было иммунизировано 4 группы кроликов.

Чувствительность и специфичность гипериммунных сывороток изучали в непрямом твёрдофазном иммуноферментном анализе на планшетах (Linbro, США). [5]

В ИФА использовали дезинтегрированные мембраны *X. campestris*, формалинизированные клетки *Xanthomonas campestris* B-611 (получен из коллекции ризосферных бакбактерий ИБФРМ РАН), *Pseudomonas aeruginosa ATCC-9027 (P. aeruginosa)* (получен из ВКПМ ФГУП ГосНИИГенетика), *Yersinia pseudotuberculosis III (Y. pseudotuberculosis), Yersinia enterocolitica 66–82 (O:3) (Y. enterocolitica), Escherichia coli 1027 (E. coli)* (получены из ГКПМ ФГУЗ РосНИПЧИ "Микроб" Роспотребнадзора).

Иммунизация кроликов дезинтегрированными мембранами *X. campestris* позволила получить сыворотки крови с высоким титром специфических антител. Максимальный титр специфических антител в крови обеих опытных групп иммунизированных животных составил 1:409600, однако следует отметить, что количество антител достигало максимального уровня при использовании в качестве адъюванта ПААГ на месяц раньше, чем полного адъюванта Фрейнда. В контрольных группах высоких титров специфических антител не отмечено, что свидетельствует о стимулирующем влиянии адъювантов на антителогенез только в сочетании с антигеном.

В процессе иммунизации также наблюдалось отсутствие абсцессов в местах введения комплекса антиген + ПААГ и наличие данных образований при использовании ПАФ.

При оценке специфичности полученных гипериммунных сывороток крови отмечены их неспецифичные реакции с *P. aeruginosa* и представителями семейства *Enterobacteriaceae* в титрах 1:800–1:1600. Однако положительные титры специфических антител *X. campestris* на порядок выше положительных титров антител к другим видам бактерий.

Таким образом, можно сделать выводы о том, что:

– Препарат дезинтегрированных мембран *X. campestris* может быть использован для получения гипериммунных сывороток с высоким содержанием специфических антител и конструирования на его основе иммуноферментных тест-систем для диагностики сосудистого бактериоза крестоцветных;

– При иммунизации кроликов дезинтегрированными мембранами *X. campestris* в качестве адъюванта эффективно использовать 0,05 %-й раствор полиазолидинамммония, модифицированного гидрат-ионами галогенов.

– Использование в качестве адъюванта 0,05 %-го раствора полиазолидинамммония, модифицированного гидрат-ионами галогенов, позволяет уменьшить сроки проведения иммунизации и уменьшить затраты на получение диагностической гипериммунной сыворотки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е.С. Мазурин, Ф.С. Джалилов, А.Н. Игнатов, Ю.А. Варицев – Усовершенствование диагностики заражённости семян капусты возбудителем сосудистого бактериоза методом иммуноферментного анализа. // Известия ТСХА, выпуск 1, 2009 год

2. Рысмухамбетова, Г.Е. Экзополисахариды ксантомонад и клебсиелл: физико-химические, биологические свойства и перспективы применения [Текст]: автореф. дис. на соиск. учён. степ. канд. биол. наук / Рысмухамбетова Гульсара Есенгильдиевна; Саратовский ГАУ им. Н.И. Вавилова. – Саратов, 2007. – 151 с.

3. Иващенко, С.В. Применение мембранных белков в диагностике иерсиниозов [Текст] / С.В. Иващенко // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. – 2013. – № 2. – С. 17–18.

4. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall // J. Biol. Chem. – 1951. – V. 193, № 1. – P. 265–275.

5. Hornbeck, P. Enzyme-linked immunosorbent assays / P. Hornbeck // Current Protocols in Immunology. – 1991. – P. 2.1.2–2.1.22.

УДК 615.453.3

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО МАРМЕЛАДА, СОДЕРЖАЩЕГО БАВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

В.А. Доценко, Д.А. Алиева

Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия
ЗАО «Висма», Черкесск, Россия

Рациональное питание является одним из главных условий сопротивляемости человеческого организма неблагоприятным факторам окружающей среды. В последние годы в России осуществляется ряд мер по расширению объема производства продуктов питания безопасных и полезных для различных групп населения. Безопасность пищевых продуктов является актуальной проблемой здравоохранения, значение которой возрастает с каждым годом. Правительства различных стран во всем мире наращивают усилия по улучшению безопасности пищевых продуктов, что связано с ростом числа проблем в этой области и с возрастающей обеспокоенностью потребителей.

Мармелад относится к кондитерским изделиям и является самым распространенным и любимым большинством категорий потребителей. В его состав входят студнеобразователи, фруктово-ягодное пюре, соки, кислоты, красители, ароматизаторы и т. д. Проанализировав различные научные публикации, мы пришли к выводу, что ассортимент мармеладных изделий расширяется, так как предлагаются все новые сырьевые ресурсы и технологии.

С целью повышения пищевой ценности мармелада, не содержащего достаточного количества витаминов представляется целесообразным вводить в него различные биологические активные добавки. Особый интерес представляют БАВ из растительного сырья.

Цель исследования – разработка технологии получения лечебно-профилактического мармелада, содержащего БАВ из растительного сырья.

В ходе исследования решались следующие задачи:

– обоснование состава и выбора рецептурных компонентов;

– исследование влияния рецептурных компонентов на процесс студнеобразования желейной массы;

– определение показателей качества изделий.

Проанализировав различные рецептурные композиции получения желейного мармелада, разработана наиболее эффективная и экономически выгодная технология.

В качестве сырья использовали: агар-ага, пектин и различные витаминизированные компоненты и биологически активные вещества из растительного сырья.

Например, яблочное пюре, содержащее витамины С, В1, В2, Р, Е, каротин, калий, железо, марганец, кальций, пектины, сахара, органические кислоты и другие добавки, проявляющие биологическую активность. Яблоки способствуют нормализации деятельности желудочно-кишечного тракта и пищеварительной системы. В составе яблочного пюре содержится от 5 до 50 мг % хлорогеновой кислоты, которая способствует выведению из организма щавелевой кислоты и, кроме того, нормализации функции печени.

Проблема изыскания новых высокоэффективных биологически активных веществ по сей день не теряет своей актуальности. Несмотря на то, что изучение биологически активных веществ, их структуры, механизма действия, влияния на организм человека и природные объекты проводятся уже на протяжении нескольких веков, нерешенных вопросов, требующих пристального внимания ученых, остается все еще достаточно много.

Подавляющее число БАД разрешены для применения у детей только старше 12-ти летнего возраста. В то же время многие заболевания начинают формироваться в раннем детском возрасте, и именно на этом этапе развития целесообразна активная профилактика патологических состояний, одним из эффективных методов которой является применение биологически активных веществ. Педиатры констатируют факты увеличения заболеваний среди детей и подростков, многие из которых приобретают хронический характер. В качестве профилактических и лекарственных мер часто прибегают к использованию биологически активных добавок, которые призваны компенсировать недостаток необходимых веществ в организме.

Доказана тесная взаимосвязь между региональными особенностями и изменениями в обмене макро- и микроэлементов и течением гастроэнтерологических заболеваний у детей; нарушение сердечного ритма и проводимости у людей, проживающих в условиях повышенного уровня диоксида серы; снижение иммунитета, рост аллергических состояний и т. д.

Значение региональных техногенных и природно-климатических факторов в формировании здоровья наглядно продемонстрировано в многочисленных исследованиях. Безусловно, использование БАД может позволить практическим врачам эффективно проводить целенаправленную коррекцию дисбаланса макро- и микроэлементов у людей различных возрастных групп с учетом региональных особенностей.

Методы извлечения БАВ из растительного сырья являются основными вопросами при разработке и изготовлении БАД к пище на основе растительного сырья. От реализации отработанной технологии зависит количество извлекаемых из сырья БАВ и их состав, себестоимость полученной субстанции и соответственно изготовленного на ее основе препарата.

Биологически активные вещества: ферменты, витамины и гормоны – жизненноважные и необходимые компоненты человеческого организма. Находясь в малых количествах, они обеспечивают полноценную работу органов и систем. Ни один процесс в организме не обходится без участия тех или иных ферментов. Эти белковые катализаторы способны не только осуществлять самые удивительные превращения веществ, но и делают это исключительно быстро и легко, при обычных температурах и давлении. Можно предположить, что дальнейшее бурное развитие энзимологии уже в недалеком будущем принесет самые неожиданные возможности контроля над процессом старения, удлинит период высокой творческой активности человека.

Проведенные исследования позволили предложить технические решения и рецептурные композиции, улучшающие физико-химические, вкусовые и органолептические показатели лечебно-профилактического мармелада.

ЛИТЕРАТУРА

Методы диагностики заболеваний по содержанию микроэлементов в органах и тканях. Тутов Н.Д., Лазурина Л.П. Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. 2001. № 3. С. 35–39.

Влияние новых комплексных соединений железа в составе полимерных форм на моделированное воспаление. Тихонова Я., Самофалов А., Артюшкова Е., Калуцкий П., Лазурина Л. Современные проблемы науки и образования. 2012. № 6. С. 550.

Изучение биологической активности комплексных соединений металлов с некоторыми антимикробными средствами. Басарева О.И., Заикин А.В., Хапчаева Д.А., Костров С.В., Букреева Е.В., Калуцкий П.В., Лазурина Л.П. Курский научно-практический вестник Человек и его здоровье. 2007. № 4. С. 5–11.

Роль комплексных соединений металлов в становлении металло-лигандного гомеостаза и донозологической диагностике. Лазурина Л.П.автореферат дис… доктора биологических наук / Моск. мед. акад. Москва, 1995.

УДК 638.178

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ НАПИТКИ НА ОСНОВЕ НАТУРАЛЬНОГО МЁДА И ПИЩЕВОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Л.А. Хасанова, З.М. Хасанова, В.Н. Саттаров, Г.А. Аюпова, Р.И. Якупова, И.В. Такиуллина, И.З. Галикеева, Г.М. Гареева, Г.Р. Рахимова, З.З. Назарова, А.З. Амакасова, Р.Т. Ахметьянов, Г.Т. Ахметьянова, Т.А. Кущ, З.Н. Сулейманова, Л.А. Сулейманова, З.Ю. Ибрагимова, Н.В. Калинина, З.Н. Кашапова, Э.М. Ялазюк, А.М. Давлетшина, А.А. Ахлякова, Р.Р. Даукаева, Э.Ю. Страхова, И.М. Гумеров

Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы, Уфа, Россия

Очевидно, что здоровое питание определяется не только энергетической ценностью потребляемых продуктов, но и их обеспеченностью биологически активными веществами. Наиболее доступными и массовыми оздоровительными продуктами, содержащими биологически активные вещества для российского потребителя, могут стать напитки на основе меда и растительного сырья (пищевые и лекарственные растения, плоды и ягоды), которые, как известно, являются источниками физиологически значимых и чрезвычайно ценных для организма человека макро- и микроэлементов, витаминов и витаминоподобных веществ, органических кислот, гликозидов, каротиноидов, флавоноидов, терпенов, фенольных соединений, и позволяют создавать напитки широкого спектра действия: тонизирующие, антистрессовые, диетические, диабетические, улучшающие работу отдельных систем (сердечнососудистой, опорно-двигательной, пищеварительной, выделительной) и органов.

На базе лаборатории биотехнологии и физиологии растений и научно-образовательной лаборатории производства и оценки качества биотехнологической продукции кафедры биоэкологии и биологического БГПУ им. М. Акмуллы осуществляется разработка функциональных напитков из натурального башкирского полифлорного меда, пряно-ароматических, пищевых и лекарственных растений, плодов и ягод, в основу которых положена ранее разработанная технология получения безалкогольных бионапитков из натуральных мёда и яблочного уксуса, а также экологически чистой артезианской воды.

Следует отметить, что натуральные мёд и яблочный уксус, богатые такими биологически активными веществами, как углеводы, витамины, ферменты, органические кислоты, минеральные соединения и обладающие мощными антиоксидантными свойствами, способны активизировать обмен веществ, блокировать свободные радикалы, стимулировать иммунную систему, предотвращать заболевания сердечнососудистой системы, желудочно-кишечного тракта, замедлять процессы старения [5; 6].

Будучи традиционными продуктами питания для россиян, а в ряде случаев единственным и незаменимым источником биологически активных веществ, мёд, плоды и ягоды издревле активно использовались в приготовлении распространённых на Руси сбитней, медовух и других напитков брожения. Данное пищевое сырьё в качестве доступного и недорогого и по сей день находит своё широкое применение в отечественной пищевой и фармацевтической промышленности [1; 2; 6].

Необходимо подчеркнуть, что основным недостатком медовых напитков брожения является их «тяжелый вкус», чему способствует высокая температура брожения, недостаток аминного азота в медовом сусле, длительный цикл производства, что в свою очередь приводит к накоплению побочных продуктов брожения в высоких концентрациях и в последующем отражается на органолептических характеристиках напитков, снижая их приятный вкус, освежающее действие и пищевую ценность. Напитки из натуральных меда и яблочного уксуса в качестве основы для производства функциональных напитков выгодно отличаются от классических медовых напитков брожения, поскольку в них, как и в случае кваса, преобладает молочнокислое, а не спиртовое брожение [3; 4; 7].

В результате проведённых исследований осуществлена разработка рецептур и предложена технология приготовления напитков функционального назначения с использованием мёда, яблочного уксуса и экологически чистой артезианской воды в качестве основы, а также пряно-ароматических *(Elettária cardamómum, Illicium anisatum, Syzygium aromaticum, Zingiber officinale)*, пищевых и лекарственных (*Achillea millefolium, Aloe vera, Aronia melanocarpa, Chamaenerion angustifolium, Lonicera caerulea, Orthília secunda, Ribes nigrum, Thymus vulgaris, Trifolium pretense, Trigonella foenumgraecum, Glycyrrhiza glabra*) растений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Апитерапия сегодня / Успехи апитерапии: Материалы XIV Всероссийской научно-практической конференции (28–30 мая 2009 г.), г. Рыбное. – Рыбное: НИИП, 2009. – Т.14. – 237 с.

2. Ишемгулова Н.З. Рациональное использование биологических ресурсов Башкортостана для производства экологически безопасной продукции пчеловодства: дисс… канд. биол. наук: 03.00.32. – Уфа, 2006. – 229 с.

3. Помозова, В.А., Мирошников А.М., Киселёва Т.Ф., Жеребятьева Н.Н. Производство сброженных слабоалкогольных напитков // Пиво и напитки, 2002. – № 1. – С. 46 – 48.

4. Помозова, В.А. Новые виды медовых напитков // Пиво и напитки, 2001. – № 2. – С. 74–75.

5. Хасанова З.М., Хасанова, Л.А. Технология экопродуктов (натурального сидра и яблочного уксуса) из яблочного сырья Республики Башкоростан – Уфа: Изд-во БГПУ им. М. Акмуллы, 2017. – 184 с.

6. Хасанова З.М., Хасанова Л.А., Байматов В.Н., Саттаров В.Н., Маннапов А.Г. Эконапиток на основе башкирского мёда и яблочного уксуса // Пчеловодство, 2017. – № 8. – С. 51–53.

7. Яковлева, И.Н. Мёд: применение для производства напитков, свойства и характеристики (Часть 1) // Индустрия напитков, 2005. – № 6(42). – С. 66–69

УДК 578.1, 579.64

БИОКОНТРОЛЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БОЛЕЗНЕЙ РАСТЕНИЙ С ПОМОЩЬЮ БАКТЕРИОФАГОВ

К.А. Мирошников[1], А.П. Кабанова[1], М.М. Шнейдер[1], Д.М. Васильев[2], А.Н. Игнатов[2]

[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия
[2] ООО Исследовательский центр «ФитоИнженерия», Рогачёво, Московская область, Россия

Пектолитические энтеробактерии (*Pectobacterium* spp. и *Dickeya* spp.), вызывающие чёрную ножку и мягкую гниль, приводят к значительным потерям семенного и товарного картофеля, как в период сезона вегетации, так и при хранении урожая. Использование бактериофагов (бактериальных вирусов) считается перспективным методом биологического контроля бактериальных фитопатогенов. Поскольку бактериофаги имеют высокую специфичность по отношению к определённым группам штаммов целевых бактерий, нами была проведена точная диагностика и дифференциация коллекции из ок. 200 изолятов бактерий – возбудителей мягкой гнили картофеля в Центральной России. На основании генетического профилирования методами RAPD, BOX-PCR, MLST, а также полногеномного секвенирования, штаммы *Pectobacterium* и *Dickeya*, наиболее распространенные в патогенезе, разделяются на 17 генетических групп. Представители каждой группы, преимущественно совпадающие с таксономическим распределением *Pectobacterium* и *Dickeya*, имеют одинаковую фагочувствительность. Проведённая систематизация позволила рационализировать селекцию специфических бактериофагов. Сконструированная унифицированная накопительная культура позволяет эффективно выделять целевые бактериофаги из объектов окружающей среды (инфицированные ткани растений, почва, поливная и сточная вода). В ходе представленного проекта была создана коллекция из 60 полностью охарактеризованных бактериофагов, совокупный инфекционный диапазон которых покрывает все распространенные в Цетральной России пектолитические энтеробактерии. Анализ геномов бактериофагов выявил наличие генов, кодирующих структурные белки с полисахарид-деполимеризующей и полисахарид-деацетилирующей активностью. Это предполагает, что первичным рецептором на поверхности бактерий, определяющими специфичность бактериофагов, являются поверхностные полисахариды.

Были разработаны экспериментальные препараты (коктейли) бактериофагов, которые показали высокую эффективность против патогенов *Pectobacterium* и *Dickeya in vitro* и в биологических моделях.

Проект поддержан грантом РНФ № 16–16–00073

ЛИТЕРАТУРА

Kabanova A, Shneider M, et al. Genomic characteristics of vB_PpaP_PP74, a T7-like *Autographivirinae* bacteriophage infecting a potato pathogen of the newly proposed species *Pectobacterium parmentieri*. (2018) Arch Virol. 163(6) : 1691–1694. doi: 10.1007/s00705–018–3766–1.

Kabanova AP, Shneider MM, et al. Host Specificity of the *Dickeya* Bacteriophage PP35 Is Directed by a Tail Spike Interaction With Bacterial *O*-Antigen, Enabling the Infection of Alternative Non-pathogenic Bacterial Host. (2019) Front Microbiol. 2019 9:3288. doi: 10.3389/fmicb.2018.03288.

Воронина М.В., Бугаева Е.Н., и др. Характеристика бактериофага PP16 *Pectobacterium carotovorum* subsp. carotovorum, перспективного для биоконтроля мягкой гнили картофеля (2019) Микробиология 88 (4) : 458–469. doi: 10.1134/S0026261719040118

УДК 664.8

ПЕКТИН КАК ПРИРОДНЫЙ БИОПОЛИМЕР В СОСТАВЕ ФРУКТОВО-ОВОЩНЫХ НАПИТКОВ

Ш.Г. Алиев

Азербайджанский технологический университет, г. Гянджа, Азербайджан

Биотехнология сегодня развивается бурными темпами. Как наука, она изучает внедрение производственных процессов, в основе которых лежит практическое использование микроорганизмов, всевозможных биологических систем. Активно развивается направление биологически активных соединений, получаемых с помощью микроорганизмов и культивируемых эукариотических клеток. Сюда входят ферменты, витамины, а также гормоны и антибиотики.

Используемая для обогащения человеческого организма биологически активными веществами и признанная каждым производителем оптимальной форма продуктов – это форма продуктов в виде фруктовых и овощных соков, биологическая ценность которых определяется максимальной сохранностью полезных веществ при переработке продукта. Натуральные соки богаты витаминами и микроэлементами. Они очень полезны для организма человека, укрепляя его иммунную систему и положительно влияя на все органы и системы.

С другой стороны, проведенные исследования указывают на то, что вещества с пектинами (биополимеры) [1] являются хорошими пребиотиками. Также была определена эффективность использования природных пектинов, содержащихся в овощах и фруктах.

Кроме того, необходимо учитывать, что природно-экологические пектины обладают комплексообразующей способностьюи имеют большое значение с точки зрения замены химических методов экологическими. Пектиновые вещества, проникая в пищеварительный тракт, присоединяют тяжелые металлы, предотвращая повторную резорбцию металлов, и выводят их из организма.

В настоящее время для расширения ассортимента продуктов в производстве соков на основе фруктово-овощного сырья усиливается внимание к производству безалкогольных напитков в виде соков, нектаров и фруктовых пюре.

Вышеуказанные безалкогольные напитки, являясь оптимальными пищевыми продуктами, обогащают организм человека биологически активными веществами. Во всем мире год от года потребление такого рода напитков возрастает. Выбирая безалкогольный напиток на основе сока, потребитель обращает внимание главным образом на его функциональные свойства. Такие напитки должны оказывать на организм человека профилактическое и оздоровительное воздействие, их использование должно рождать у потребителя положительные эмоции.

Для формирования высоких вкусовых характеристик напитков целесообразно выбирать фруктово-овощные соки и пюре, богатые витаминами и минералами. В связи с этим были проведены исследования для определения целесообразности добавления дополнительно в образцы пектина, а также для определения воздействия видов пектиновых веществ и их доз на развитие полезных бактерий (бифидобактерий) и кисло-молочных микроорганизмов.

Азербайджан обладает очень выгодными почвенно-климатическими условиями для выращивания овощей и фруктов. На приусадебных участках населения и фермерских хозяйствах широко распространена тыква [2]. В южных районах Азербайджана и на побережье Черного моря в большом количестве выращиваются апельсины [3,4]. Эти продукты являются экологически чистыми, так как для их выращивания не используется никаких лекарственных препаратов. Однако промышленным методом из них как различные пищевые продукты, так и соки производятся, можно сказать, в незначительном количестве. Из анализа опубликованных литературных материалов и проведенной исследовательской работы было выяснено, что фруктовые соки должны быть богаты простыми сахарами, органическими кислотами, витаминами, минеральнымивеществами [5,6]. С этой точки зрения основная цель нашей исследовательской работы – производство качественного сока с добавлением пектиновых веществ, используя тыкву и апельсин.

В качестве объекта исследования для производства пектинового сока был использован представитель бахчевых овощей – тыква сорта Palov-kod 268 – в ферментированное тыквенное пюре был добавлен апельсиновый сок, а также оно было обогащено пектиновыми веществами. Была дана технологическая схема приготовления пектин-содержащего напитка на основе овощей-фруктов и былапроведена их переработка для приготовления сока. В процессе переработки был приготовлен сок из ферментированного пюре тыквы, апельсинового сока, сахара, сухого молока, дрожжей и 1 и 2 % жидких пектиновых веществ, добавленныхв воду. Было определено содержание кисло-молочных бактерий и бифидобактерий в составе приготовленных соков. Опытные образцы в лабораторных условиях были посеянынасредеи помещены в анаэростат для определения содержания как кисломолочных бактерий, так ибифидобактерий (ЕСК/гр, единица создания колоний на 1 гр.). В приготовленных соках был проведен лабораторный анализ кисло-молочных бактерий и бифидобактерий. Результаты анализов показали соответствие соков ГОСТу 10444.11–89 и была отмечена возможность проведения их промышленных испытаний.

Кроме этого, было приготовлено 10 образцов соков в различных пропорциях и на основе полученных результатов была проведена органолептическая оценка приготовленных образцов. Соки оценивались дегустацией по 10-балльной системе [7]. Был определен химический состав сока, получившего самый высокий балл.

Было проверено качество и пищевая безопасность приготовленной рецептуры и технологии для внедрения в производство. Органолептические показатели приготовленного раствора приводятся ниже.

Вкус и запах нежный и гармоничный, в использованном апельсиновом соке и тыквенном пюре приятный запах, посторонних вкусов и запахов нет, цвет соответствует цвету использованного апельсинового сока и тыквенного пюре – оранжевый, густота полужидкая, нежная. Были определены физико-химические показатели приготовленных напитков.

Приготовленные пектиновые напитки содержат полезные бактерии (бифидобактерии). Результаты исследования показывают, что уровень содержания бифидобактерий в образце напитка высок. И эти результаты подтверждают экспериментальную информацию о потенциале бифидобактерий тыквенного пюре. Таким образом, результаты исследований дают основание говорить о хороших пробиотических свойствах приготовленных напитков.

При слабом контроле экологии питаниячеловеческому организму может быть нанесен серьезный урон. Поэтому для проверки пищевых продуктов наличие вредных веществ они должны быть подвергнуты санитарно-эпидемиологическому анализу. Только в этом случае можно удостовериться в безопасности продукта.

Приготовленные напитки отвечают принятым требованиям по основным критериям безопасности и могут быть использованы для питания как взрослых, так и детей, а также для лечебно–профилактического питания.

Таким образом, в результате проведенного исследования было выяснено, что пектиновый фруктово-овощной (тыква и апельсин) напиток по своей питательности отличается от других соков. Во время дегустации напиток был оценен в 8,2 балла.

ЛИТЕРАТУРА

1. Донченко, Л.В. Пектин: основные свойства, производство и применение / Л.В. Донченко, Г.Г. Фирсов. – М.: ДеЛипринт, 2007. – 276 с.
2. Абасов И. Сельское хозяйство Азербайджана. Баку: Наука., 2010, 592 стр.
3. Пашаев Ф.А. Каталог районированных сортов сельскохозяйственных культур по Азербайджанской республике на 1998 год. Баку, 1997. с 11.
4. Ахундзаде И.М. Цитрусовые растения в Азербайджане. Баку, Издательство Шарг, 1990, с. 3–75.
5. Набиев А.А., Мослемзаде Биохимия пищевых продуктов. Баку, Наука, 2008, 444 с.
6. 207. Третяков Н.И. Физиология и биохимия сельскохозяйственных растений. М.: Колос, 2002, 362.
7. Микаилов В.Ш. Дегустация продуктов питания. Баку, Кооперация, 2012, 348 с.

УДК 615.241.3 + 615.275.4 + 615.322 + 612.084

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПИЩЕВЫЕ ИНГРЕДИЕНТЫ АДАПТОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ И ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ

В.А. Шипелин, Ю.С. Сидорова, В.К. Мазо

ФИЦ питания и биотехнологии, Москва, Россия

Повышение когнитивного потенциала человека и способность к адаптации организма в условиях повышенных стрессорных воздействий, включая физические и / или эмоциональные нагрузки, представляют собой особый интерес с позиции их коррекции питанием, адекватным повышенным энергетическим тратам и потребностям в макро- и микронутриентах и минорных биологически активных веществах (БАВ) адаптогенной направленности [1, 2]. Практическая реализация этого направления предполагает разработку, производство и поступление на потребительский рынок функциональных пищевых продуктов, содержащих в своём составе функциональные пищевые ингредиенты (ФПИ) с доказанной в комплексных физико-химических и физиологических исследованиях in vitro и in vivo эффективностью.

В настоящее время в ряде европейских стран, США и странах Юго-Восточного региона постоянно совершенствуются технологии получения специализированных пищевых продуктов, в том числе адаптогенной направленности, и расширяется их ассортимент за счет включения в их состав в качестве ФПИ растительных адаптогенов. Для получения ФПИ адаптогенной направленности интенсивно исследуются и находят применение киноа, спаржа, шпинат, зеленый чай и многие другие растительные пищевые источники, а также ряд лекарственных растений: Индийский женьшень, Женьшень, Родиола Розовая, Серпуха Венценосная, Левзея Сафлоровидная, Китайский Лимонник, Аралия Маньчжурская, Элеутерококк колючий, Заманиха Высокая [3–5].

Оценка адаптогенных свойств БАВ, входящих в состав ФПИ, с позиции доказательной медицины требует проведения доклинических исследований in vivo, включающих изучение действия БАВ на физическую выносливость, когнитивные функции и адаптационный потенциал лабораторных животных. Моделирование in vivo условий, в некоторой степени воспроизводящих сценарии профессиональной деятельности лиц с особыми (повышенными) нагрузками (в том числе, спортсменов различных видов спорта), с вредными условиями труда и / или проживающих и работающих в неблагоприятных климатических условиях (Арктика, Крайний Север и районы, приравненные к ним), является актуальной задачей [6].

Необходимым этапом является верификация моделей стрессорного воздействия путем выявления основных биомаркеров стресс системы (кортикостерон, катехоламины, простогландин Е2) в крови и моче стрессированных животных. Для оценки адаптогенных свойств могут быть использованы модели истощающей физической нагрузки и иммобилизации в эксперименте на крысах самцах линии Вистар. Модель истощающей физической нагрузки может быть реализована с использованием теста «Беговая дорожка», который используется для принудительных упражнений и точной оценки развития усталости у грызунов. Для определения степени физической выносливости животных используют такие параметры как пройденное расстояние, количество ударов током и общее время, проведенное в контакте с шоковой зоной при разных уровнях заданной сложности (скорость, угол наклона, интенсивность аверсивного стимула) [7]. Метод иммобилизации используют при моделировании острого и хронического стресса. Иммобилизационный стресс у крыс вызывают помещением их на определенное время в пластиковые проветриваемые цилиндры, препятствующие движению [8]. Оценка уровней биомаркеров стресс системы организма (кортикостерон, катехоламины, простогландин Е2) в крови и моче в динамике, вместе с исследованием показателей антиоксидантного статуса животных, позволяют оценить степень нагрузки и подобрать оптимальные условия моделирования истощающей физической нагрузки и иммобилизации для последующей оценки адаптогенного действия БАВ в эксперименте [9].

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

1. Liao LY, He YF, et al. A preliminary review of studies on adaptogens: comparison of their bioactivity in TCM with that of ginseng-like herbs used worldwide. *Chin Med.* 2018; N13:57.

2. Provino R. The Role of Adaptogens in Stress Management. *Aust J of Med Herb.* 2010; vol.22, N2:41–49.

3. Martin J.S. The Effects Of A Novel Red Spinach Extract On Graded Exercise Testing Performance. *Med Sci Sports Exerc*. 2016; vol.48, N5:247.

4. Foucault A-S., Even P., et al. Quinoa extract enriched in 20-hydroxyecdysone affects energy homeostasis and intestinal fat absorption in mice fed a high-fat diet. *Physiol Behav*. 2014; 128:226–31.

5. Володин В.В. Экдистероидсодержащие растения: ресурсы и биотехнологическое использование / С.О. Володина, И.Ф Чадин, В.В. Володин. Екб: УрО РАН, 2007. 127 с.

6. Ray A., Gulati K., et al. Stress, Adaptogens and Their Evaluation: An Overview. *J Pharma Reports* 2016; 1:2

7. Bilski J., Mazur-Bialy A.I., et al. Moderate exercise training attenuates the severity of experimental rodent colitis: the importance of crosstalk between adipose tissue and skeletal muscles. *Mediators Inflamm*. 2015; 2015:605071.

8. Samarghandian S., Azimi-Nezhad M., et al. Anti-oxidative effects of curcumin on immobilization-induced oxidative stress in rat brain, liver and kidney. Biomed Pharmacother. 2017; 87:223–229.

9. Яременко К.В. Оптимальное состояние организма и адаптогены / К.В. Яременко. СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2008. 129 с.

УДК 631.147

МЕТОДЫ БИОТЕХНОЛОГИИ В ПРОИЗВОДСТВЕ ПИТЬЕВОГО КИСЕЛЯ ОБОГАЩЕННОГО БЕЛКОМ АМАРАНТА

О.Н. Ожерельева, М.М. Данылив

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Развитие в последние годы теории адекватного питания, а также неблагоприятные условия, в которых пребывает значительная часть населения России, выдвинуло специфические требования к расширению ассортимента пищевых продуктов. Создание пищевых продуктов, в частности напитков, на основе растительного сырья, обогащенных белком, является одним из путей решения проблемы сбалансированности питания. Учитывая вышеизложенное, представляет научный и практический интерес изучить возможность и целесообразность создания питьевых киселей обогащенных белком растительного происхождения, а именно разработка и исследование технологии производства питьевого киселя на основе амарантовой муки. Для решения перечисленных задач был проведен анализ состава и свойств амарантовой муки как сырья для питьевых плодово-ягодных киселей, определена пищевая ценность ферментированной и неферментированной амарантовой муки и возможность ее использование при производстве питьевого киселя; определены органолептические, физико-химические и микробиологические характеристики питьевого киселя на основе амарантовой муки.

Выбор амарантовой муки в качестве источника белка обусловлен ее уникальным аминокислотном составом, а также высоким содержанием витаминов, макро- и микроэлементов и других биологически активных веществ, определяющих разнообразные лечебно-профилактические свойства амарантовой муки (сквален, фитостеролы, фосфолипиды и др.). Разработаны несколько рецептурных смесей кисельных напитков на основе ферментированной амарантовой муки с применение фруктово-ягодных и овощных добавок (апельсин, тыква, лимон, абрикос). Ферментативную обработку муки амаранта проводили цитопектопротеолитическим ферментным препаратом. Доза фермента составила 0,03 % от массы ферментируемого продукта.

Главным показателем, характеризующим кисель, является его консистенция, обусловленная входящим в рецептуру крахмалом. Наличие в амарантовой муке крахмала дает возможность использовать ее в качестве альтернативы картофельному и кукурузному крахмалу. Для улучшения органолептических показателей в опытные образцы киселя добавляли фруктовые и овощные добавки, а для повышения пищевой ценности – муку амаранта. Органолептическая оценка готовых киселей позволила выявить оптимальную дозировку муки амаранта, которая не дает постороннего привкуса и запаха, консистенция продукта также оставалась неизменной. Увеличение массы муки более 4 г привело к появлению слишком явного постороннего привкуса, запаха и ухудшило консистенцию продукта. Был проведен сравнительный анализ пищевой ценности традиционного киселя и киселя на основе амарантовой муки. В продукте значительно увеличилось содержание белка, пищевых волокон, а также благодаря внесению муки амаранта, богатого железом, и фруктово-овощных компонентов содержание этого микроэлемента возрастает на 58 %. Практически в 7 раз увеличивается содержание магния и почти в 3 раза фосфора. За счет содержания в амарантовой муке и фруктово-ягодных добавках витаминов группы В порция готового киселя с этим сырьем удовлетворяет суточную потребность в витаминах: В1 – на 31 %, В2 – на 10 %. Таким образом, подтвердив экспериментальным путем полученные расчётные данные, можно с уверенностью назвать разработанный напиток функциональным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ауэрман, Л.Я. Технология хлебопекарного производства Текст./: учебник для вузов/ Л.Я: Ауэрман; под общ. ред. Л.И.'Пучкфвой. 9-е изд., перераб. и доп. – СПб.: Профессия, 2002. -416 с.

2. Ожерельева О.Н., Кисель, как современный функциональный напиток текст / О.Н. Ожерельева, О.С. Корнеева, Е.О. Асанова, Материалы V Международной научно-технической конференции «Инновационные технологии в пищевой промышленности: наука, образование и производство» [Электронный ресурс] : сборник материалов, 16 ноября 2018 г. / Воронеж. гос. ун-т инж. технол., ВГУИТ, 2018. – 453–456 с.

УДК 631.147.636.3

ПОЛУЧЕНИЕ ГИБРИДОВ ДОМАШНИХ ОВЕЦ С ДИКИМИ РОДСТВЕННЫМИ ВИДАМИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В СЕЛЕКЦИИ

А.Н. Ветох, Б.С. Иолчиев, Н.А. Волкова, В.А. Багиров

Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, п. Дубровицы, Московская область, Россия

В настоящее время в ходе длительной целенаправленной селекции созданы многочисленные породы сельскохозяйственных животных, адаптированные к разным природно-климатическим условиям. Для совершенствования существующих и создания новых пород требуется наличие генетического разнообразия. Под воздействием экономических факторов происходит сужение генетического разнообразия, коммерческие породы вытесняют локальные, которые адаптированы к определенным природно-климатическим условиям. С целью повышения продуктивности локальных пород во многих странах и регионах проводится поглотительное скрещивание, что приводит к их утрате. Территория Российской Федерации отличается разнообразием природно-климатических зон. При этом разведение одной породы во всех природно-климатических зонах невозможно. Для использования кормовых ресурсов отдельных природно-климатических зон необходимо создание селекционных форм с высокими адаптационными характеристиками для данных зон.

Для создания новых пород и селекционных форм возможно использование генетических ресурсов дикой фауны, особенно приспособленных к суровым природно-климатическим условиям. Достижения биотехнологии, в том числе вспомогательной репродуктивной технологии, позволяют использовать генетические ресурсы дикой фауны более эффективно как для сохранения, так и для создания новых селекционных форм с использованием отдаленной гибридизации. В ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста» более десяти лет проводятся эксперименты по гибридизации домашнего мелкого рогатого скота с дикими сородичами в рамках ex situ сохранения редких и исчезающих видов. Для сохранения некоторых видов рода *Ovis* создан криобанк их генеративной плазмы. Часть генетического материала, сохраняемого в данном криобанке, используется для получения межвидовых гибридов.

Нами были получены и изучены межвидовые гибриды от скрещивания самок овец романовской породы с самцом архаром. От 5 овцематок было получено 15 гибридных ягненка: 7 самцов и 8 самок. Количество молодняка в приплоде варьировало от 2 до 4 ягнят. От одной овцематки была получена двойня, от трех овцематок – тройни и от одной овцематки – 4 ягненка (таблица). Следует отметить относительно низкую сохранность гибридного молодняка по сравнению с показателями, установленными для исходной материнской породы (романовской). Сохранность гибридного молодняка в возрасте 6 дней составила 53,3 %, что было на 24 % ниже по сравнению с данным показателем, установленным для молодняка романовской породы.

Таблица. Получение и сохранность животных при разных типах скрещивания

Схема скрещивания	Осеменено маток/ получено ягнят, гол	Количество маток с числом ягнят в приплоде, гол				Сохранность ягнят в возрасте 6 дней, %
		1 ягненок	2 ягненка	3 ягненка	4 ягненка	
♀ романовская порода х ♂архар	5 / 15	0	1	3	1	53,3
♀ романовская порода х ♂ романовская порода	5 / 13	0	2	3	0	77,0

Живая масса полученных гибридных ягнят в возрасте 6 дней варьировала от 2,1 до 3,8 кг и составила в среднем 2,98 ± 0,25 кг. Средняя высота в холке данных животных достигала 34,8 ± 0,9 см, высота в крестце – 33,8 ± 1,0 см, высота спины – 30,8 ± 0,9 см, косая длина туловища – 25,5 ± 1,5 см, длина тела – 30,9 ± 0,9 см, обхват пясти – 4,7 ± 0,1 см, ширина груди – 6,8 ± 0,5 см, ширина крестца – 7,4 ± 0,4 см, глубина груди – 12,5 ± 0,7 см.

Результаты исследования показывают, что при использовании архара для гибридизации с романовской породой, сохраняется высокая плодовитость, характерная для романовской породы, что позволяет рассматривать использование генетического ресурса диких сородичей рода *Ovis* для получения высокопродуктивных селекционных форм, отличающихся высокими адаптационными качествами.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект № 18–16–00079.

УДК 664

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ПЛОДОВО-ЯГОДНОГО СЫРЬЯ И ПРОДУКЦИИ ИЗ НЕГО

Н.К. Романова, С.В. Китаевская

Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, Россия

Защитить продукты от окисления можно при помощи искусственных антиоксидантов, но целесообразнее использовать природные. Смесь природных антиоксидантов как правило действует более эффективно благодаря синергетическому эффекту. Это позволяет увеличить срок действия и эффективность вносимых в продукт антиоксидантов, поскольку смеси имеют более высокие антиокислительные свойства. Плоды плодовых и ягодных культур являются источником биологически активных природных веществ антиоксидантного действия, повышающих устойчивость организма человека к неблагоприятным факторам внешней среды, к радиации.

К антиоксидантам растительного происхождения относятся фрукты и ягоды, содержащие фенолпроизводные компоненты, флавоноиды, которые относятся к классу растительных полифенолов и обладают широким спектром биологического действия [1].

Одним из наиболее богатых антиоксидантыми компонентами сырьем ябляются ягоды черной смородины. Черная смородина значительно превосходят большинство культур по содержанию аскорбиновой кислоты и фенольных (Р-активных) веществ в ягодах. Как известно аскорбиновая кислота обладает наиболее высокой антиоксидантной активностью, тем самым ягоды черной смородины имеют определяющую ценность. Обладая высокими технологическими качествами, смородина черных сортов является хорошим сырьем для переработки, и, следовательно, прекрасным источником витаминов в зимне-весенний период.

Авторами Борисовой А.В., Макаровой Н.В. [2] проведена проверка антиоксидантной активности в замороженных ягодах красной и черной смородины, вишни методом инверсионной вольамперометрии. Установлено, что наибольшая антиоксидантная активность наблюдается у образца черной смородины – 50,458 ммоль/ л · экв.; у красной смородины антиоксидантная активность ниже более чем в 2,5 раза и составляет 17,782 ммоль/ л · экв.; вишни – 23,399 ммоль/ л · экв.

Антиоксидантные свойства объясняются химическим составом образцов плодово-ягодного сырья и особенно высоким содержанием антоцианов, токоферолов, каратиноидов и флавоноидов, которые отвечают за красно-фиолетовый и красный окрас данных ягод.

Таким образом, плодово-ягодное сырье обладает не только высокой биологической ценностью, но и высокими антиоксидантными характеристиками и может быть широко использовано в лечебно-профилактических целях. А учитывая тот факт, что данное плодово-ягодное сырье в замороженном виде сохраняет свой химический состав практически в полном объеме в продолжительном периоде времени [3], можно говорить о том, что данные ягоды могут быть источником природных антиоксидантов в течение года.

Ягоды черной смородины имеют пищевое и лечебное значение, так как в них содержится большое количество пектиновых, дубильных, красящих, азотистых веществ, различных органических кислот, витаминов (С, группы B_1, B_2, К и Р), сахаров и полифенолов, обладающих Р-витаминной активностью, микроэлементами, фитонцидами и эфирными маслами. Многие из этих веществ являются биологически активными, обеспечивают укрепление иммунитета и оказывают антиоксидантную защиту человеческому организму. Пектин в частности помогает снизить уровень холестерина в крови, стабилизирует окислительно-восстановительные процессы, способен выводить из тканей пестициды, соединения тяжелых металлов, радиоактивные вещества.

Также ингибитором свободных радикалов служит янтарная кислота и ее соли. Янтарная кислота обладает выраженной способностью связывать свободные радикалы, ингибировать процессы перекисного окисления липидов биомембран и, таким образом, уменьшать интенсивность окислительных процессов в организме, защищать клетки и мембраны от разрушительных воздействий. Сукцинаты также благодаря своему антиоксидантному действию ингибируют рост и развитие опухолей, предупреждают деление злокачественных клеток [4].

В работе определяли антиоксидантную активность плодово-ягодного пюре из яблок и ягод черной смородины и мармелада, приготовленного из этого сырья, с использованием янтарной кислоты и ее солей в концентрации 0,01–0,1 % от массы сырья. Определение антиоксидантной активности образцов проводили методом, предложенным авторами W. Lertittikul, S. Benjakul, M. Tanaka [5]. Исследования показали, что наиболее высокой антиоксидантной активностью обладал образец представляющий собой плодово-ягодное пюре состоящее из смеси яблок и черной смородины из которого готовили мармелад. Кроме того, высокими показателями отличались образцы с сукцинатом кальция и янтарной кислотой

Опираясь на полученные данные можно прийти к выводу, что выбранное сырье действительно обладает повышенным содержание антиоксидантов, что и приводит к высоким результатам gj антиоксидантной активности. А такие дополнительные ингредиенты как пектин, лимонная, янтарная кислота и ее соли дополнительно способствуют этому, проявляя синергический эффект.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вакуленко Н.В. Применение антиоксидантов для защиты пищевых продуктов / Н.В. Вакуленко, М.Г. Редько // Современные достижения в исследовании натуральных пищевых добавок. – Краснодар: КубГТУ, 2014. – С. 264–268.

2. Борисова, А.В. Влияние длительности хранения на химический состав и антиоксидантные показатели свежих и замороженных овощей / А.В. Борисова, Н.В. Макарова // Известия ВУЗов. Пищевая технология. – 2013. – № 2–3. – С. 36–37.

3 Куракина А.Н. Функциональные ингредиенты в производстве кондитерских изделий / А.Н. Куракина, И.Б. Красина, Н.А. Тарасенко, Е.В. Филипова // Фундаментальные исследования. – Краснодар: Изд. КубГТУ. – 2015. – № 6. – С. 468–472.

4. Биологическая роль и метаболическая активность янтарной кислоты [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://cyberleninka.ru/article/n/biologicheskaya-rol-i-metabolicheskaya-aktivnost-yantarnoy-kisloty, свободный. – Проверено 29.05.19.

5. Lertittikul W / Characteristics and antioxidative activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein-glucose model system as influenced by pH / W. Lertittikul, S. Benjakul, M. Tanaka // Food Chemistry. – 2007. – V. 100. – № 2. – P. 669–677.

УДК 635.658

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЙ В СОЗДАНИИ НОВЫХ СОРТОВ ЧЕЧЕВИЦЫ

Г.Н. Суворова

Федеральный научный центр зернобобовых и крупяных культур, Орел, Россия

Интерес к чечевице как к пищевой бобовой культуре растет во всем мире, о чем свидетельствует ежегодное увеличение ее производства во многих странах, включая Российскую Федерацию. Но урожайность чечевицы остается сравнительно низкой, составив в 2017 году 1,1 т/га в мире, и 1,2 т/га в России. Низкая урожайность обусловлена биологическими особенностями культуры, недостаточной биомассой и площадью листовой поверхности, низкорослостью, полегаемостью и, как следствие, низкой технологичностью. Если история потребления чечевицы насчитывает несколько тысячелетий, то целенаправленная ее селекция в России началась в 20-е, а в мире в 80-е годы прошлого века. Основным методом селекции был отбор из местных популяций, затем гибридизация лучших отобранных линий. Замена местного материала селекционными сортами привела к сужению генетического разнообразия культурного вида *Lens culinaris* Medik.

Повысить биологический потенциал культурной чечевицы можно используя зародышевую плазму дикорастущих видов, многие из которых более устойчивы к болезням и неблагоприятным внешним воздействиям. На данный момент известны 6 дикорастущих таксонов рода *Lens*, с которыми культурная чечевица совместима в большей или меньшей степени. В случае несовместимых комбинаций используется метод культуры изолированных семяпочек для преодоления постзиготической несовместимости. Работы по межвидовой гибридизации проводятся в Испании, Индии; в Канаде развернуты селекционные программы по внедрению гена устойчивости к антракнозу в геном культурной чечевицы от дикорастущего вида *L. ervoides* (Brign) Grande.

Селекционная работа с использованием дикорастущих видов проводилась нами в несколько этапов. На первом этапе стояла задача получения межвидовых гибридов. При скрещивании культурной чечевицы с совместимым видом *L. orientalis* (Boiss) Hand. – Mazz. нами использовался метод проращивания семян F_1 на питательных средах *in vitro*, что позволило преодолеть период покоя семян, признак унаследованный от дикорастущего образца, и повысить выход гибридных растений. При гибридизации с видом *L. tomentosus* Ladiz., в меньшей степени совместимым с культурным видом, мы использовали культуру изолированных семяпочек с последующей регенерацией побегов и растений. На втором этапе проводился многократный отбор в ряде последующих поколений до получения стабильных нерасщепляющихся линий. На следующем этапе, в случае необходимости, проводили возвратные скрещивания, где в качестве рекуррентного родителя служил культурный вид.

В результате межвидовой гибридизации, с использованием некоторых биотехнологических приемов и в сочетании с методами классической селекции нами созданы высокоурожайные линии чечевицы, рекомбинантные по признакам окраски цветка, семенной кожуры и семядолей. Растений лучших селекционных линий по морфотипу были близки к культурному виду, унаследовав некоторые положительные характеристики от дикорастущих видов.

В 2017 году в Государственный реестр селекционных достижений допущенных к использованию включен сорт чечевицы Восточная. Сорт выведен путем многократного индивидуального отбора на семенную продуктивность из гибридной популяции (*L. culinaris* Рауза×*L. orientalis* ILWL7). Семена нового сорта мельче по размеру чем стандарта Рауза. С мелкосемянностью сорт приобрел новые качества – высокое число семян в бобе, устойчивость к растрескиванию бобов и осыпанию на корню. Результаты RAPD-анализа показали наличие в геноме сорта Восточная ДНК дикорастущего вида *L. orientalis*. Восточная является первым в мире сортом чечевицы, выведенным с участием зародышевой плазмы дикорастущего вида.

УДК 637.17:615.857.061.1

ПОЛУЧЕНИЕ КАРОТИНСОДЕРЖАЩИХ ПИЩЕВЫХ ДОБАВОК ДЛЯ ОБОГАЩЕНИЯ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

А.В. Черкасова[1], Л.П. Бессонова[2], Л.В. Антипова[1]

[1] Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия
[2] Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии Российской академии сельскохозяйственных наук, Воронеж, Россия

Большинство природных каротиноидов обладают антиканцерогенными, антимутагенными и иммуномодулирующими свойствами. Бета-каротин является биологически активным веществом, снижающим окислительный стресс клеток организма, а следовательно уменьшает риск развития таких заболеваний как атеросклероз, фотодерматоз, аллергических реакций на ультрафиолетовое излучение и др. В связи с этим, разработка природных БАД, основным действующим веществом которых является бета-каротин, является перспективным и актуальным направлением развития российского рынка пищевых ингредиентов. В настоящее время в связи с введением санкций против РФ рядом стран, положение дел с включением в рацион питания населения каротинсодержащих БАД ухудшилось, так как существенно выросли цены на препараты бета-каротина зарубежного производства, а отечественное производство практически отсутствует. [2]

Для ликвидации негативных последствий для здоровья россиян дефицита бета-каротина (составляет 40–60 %) нами предложена технология получения натуральных каротинсодержащих БАД (патент РФ № 2574904). В качестве источников каротиноидов в работе были использованы морковь и яичный желток, тыква и яичный желток. Эти источники являются доступными, морковь и тыква возделываются повсеместно на территории РФ, наблюдается также рост объемов производства яиц. Помимо бета-каротина, данные сырьевые источники богаты аминокислотами, витаминами и минералами. Отлично дополняют друг друга, в желтке куриного яйца содержатся все незаменимые аминокислоты, морковь отличается повышенным содержанием витамина А (5,01 г.), витамина K_1 (13,2 мкг), а тыква – витамина С (9,0 мг).

При разработке каротинсодержащих БАД нами был учтен факт, что каротиноиды относятся к жирорастворимым соединениям, что является некоторым ограничением их использования в производстве продуктов питания. Компанием DSM Nutritional Products разработана и запатентована технология, которая позволяет получить водорастворимые формы жирорастворимых соединений, что

расширяет возможности их использования, где растворителем является вода. В соответствии с данным изобретением активная субстанция (внутренняя фаза) внедряется в матрицу-носитель, которая защищает ее от влаги, кислорода, влияния перекисей, активных форм металлов. В результате изменяются физические характеристики (растворимость, дисперсность), повышается механическая устойчивость.

При разработке каротинсодержащих БАД мы руководствовались данным решением и использовали в качестве активной субстанции каротиноиды, а в качестве матрицы-носителя – яичный желток, который содержит природное биологически активное соединение фосфатидилхолин (лецитин), относящееся к фосфолипидам.

По данным компании DSM Nutritional Products, чем грубее внутренняя фаза (в нашем случае – морковь или тыква), тем менее устойчивой будет эмульсия. Для улучшения качества эмульсий, сырьевые источники, содержащие каротиноиды, рекомендуется предварительно обрабатывать на пару. Данный вид термической обработки делает их более мягкими, что не только повышает устойчивость эмульсий, но и способствует повышению усвояемости каротиноидов. Яичный желток варили 1,5–2,0 ч при Т = 60 °С до получения консистенции, при которой он хорошо взбивается и эмульгируется.

В ходе серии экспериментов было установлено оптимальное соотношение компонентов рецептурного состава каротинсодержащих БАД: 72 г. сваренной на пару моркови или тыквы, 17 г. термически обработанного яичного желтка, 20 г. сахарного песка, 1,5 г лимонной кислоты. Затем смесь по приведенной рецептуре подвергалась сублимационной сушке, были получены БАД в виде порошка [3]

На следующем этапе экспериментальных исследований БАД были использованы для обогащения ими творожного продукта и молочного напитка. [1] Были установлены корреляционные зависимости между количеством вносимых компонентов рецептурного состава молочных продуктов и содержанием в них бета-каротина, построены профили предсказанных значений и функции желательности, проведена комплексная оценка обогащенных молочных продуктов. Установлено, что у обогащенных БАД молочных продуктов повышается биологическая ценность. На основании выполненных исследований разработан комплект технической документации на БАД и молочные продукты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бессонова, Л.П. Качество молочных продуктов как гарантия повышения конкурентоспособности [Текст] / Л.П. Бессонова, А.В. Черкасова // Молочная промышленность. 2015. № 4. С. 22–24.

2. Дадали, В.А. Каротиноиды. Биодоступность, биотрансформация, антиоксидантные свойства [Текст] / В.А. Дадали, В.А. Тутельян, Ю.В. Дадали, Л.В. Кравченко // Вопросы питания. – 2010. – Т.79. – № 2. – С. 4 – 18.

3. Ширикова, А.В. Получение препарата бета-каротина для окрашивания и витаминизации кисломолочных продуктов [Текст] / А.В. Ширикова, А.В. Черкасова, А.С. Шахов, Л.П. Бессонова // Материалы студенческой научной конференции за 2014 год. – Воронеж, 2015 г. – С. 115.

УДК 640

ОЦЕНКА РИБОНУКЛЕАЗНОЙ АКТИВНОСТИ КОЛЛЕКЦИИ ЭНДОФИТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Е.Р. Сарварова, Е.А. Черепанова, Р.М. Хайруллин, И.В. Максимов

[1]Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение «Уфимский федеральный исследовательский центр» РАН, Уфа, Россия

Вирусные инфекции вызывают значительное снижение урожайности сельскохозяйственных культур. К сожалению, на современном этапе отсутствуют эффективные и экологически безопасные средства борьбы с вирусными болезнями. Одним из перспективных способов защиты растений от вирусов могут быть биопрепараты на основе живых микроорганизмов, которые вырабатывают широкий спектр ферментов, например внеклеточные рибонуклеазы [1], противовирусное действие которых давно известно [2]. На основе генов внеклеточных рибонуклеаз бактерий рода *Bacillus* созданы трансгенные растения картофеля, рапса и табака, проявившие высокий уровень вирусоустойчивости [3]. В малых дозах бациллярные РНКазы оказывают стимулирующее действие на рост и физиологическую активность растений [4]. Штаммы вирусов картофеля X и M, подвергшиеся обработке бациллярными РНКазами in vitro теряют способность к инфицированию [5].

Соответственно, поиск среди природных изолятов микроорганизмов, в особенности эндофитной природы, может пополнить арсенал биопрепаратов новыми штаммами, характеризующимися антивирусной активностью.

Основываясь на поставленной цели, нами проведен скрининг РНКазной активности коллекционных образцов эндофитных бактерий из лаборатории биохимии иммунитета растений ИБГ УФИЦ РАН (http://ibg.anrb.ru/naychnaya-deyatelnost/bioresyrs/kollekciya-simbioticheskix-mikroorganizmov/). Оценку РНКазной активности изолятов и депонированных штаммов микроорганизмов проводили на чашках Петри с добавлением в питательную среду Luria Bertani коммерческой дрожжевой РНК (Sigma, США). Активность РНКазы определяли по формированию зоны гало вокруг бактериальной колонии. Кроме того, образцы выращивали на жидкой среде LB для последующей оценки активности РНКаз спектрофотометрически. Всего оценено 130 изолятов, среди которых 35 штаммов рода *Bacillus*, 8 – рода *Pseudomonas*, 63 – рода *Enterobacter*, 25 – находятся на стадии идентификации.

Выявлено, что ряд коллекционных линий, относящихся к родам *Pseudomonas* и *Enterobacter* не обладала РНКазной активностью. С другой стороны, практически все представители рода *Bacillus* вырабатывали в среду культивирования РНКазу. Средний размер гало при культивировании на твердой среде LB в мм: от 1 до 13 мм. Оценка содержания РНКаз в культуральном фильтрате показала, что штаммы бактерии *Bacillus*, хотя и вырабатывали этот фермент, но активность его варьировала от 2 до 6 ед./мг белка. Из наиболее лучших продуцентов РНКаз следует остановиться на коллекционном штамме *B. thuringiensis* (до 6 ед. / мг белка) и коммерческом штамме – *B.subtilis* 26Д, основы препарата Фитоспорин, (до 3.8 ед. /мг белка). Штаммы с высокой РНКазной активностью могут представлять интерес для создания противовирусных биопрепаратов для защиты растений от вирусных болезней.

Работа выполнена в рамках совместного международного гранта РНФ и Департамента науки и техники (DST) правительства Индии № 19–46–02004.

ЛИТЕРАТУРА

1. Знаменская Л.В., Скворцова М.А., Каюмов А.Р., Новые секретируемые рибонуклеазы из *Bacillus subtilis* и *Bacillus intermedius*. // Вестник нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. 2001. № 1. С. 60–65.

2. Hartley R.W. Barnase and Barstare // Ribonucleases: structures and Functions / Ed by G. D'Alessio and J.F. Riordan. Academic Press, 1997. P. 51–100.

3. Колпаков А.И., Куприянова-Ашина Ф.Г., Лещинская И.Б. Зависимость влияния РНКазы Bacillus intermedius на рост пекарских дрожжей от концентрации экзогенного фермента // Микробиология. 2000. Т. 69. С. 478–482.

4. Kurinenko B.M., Bulgakova R. Sh., Davydov R.E. Effect of ribonuclease from Bacillus intermedius on human blood lymphocytes // FEMS Immunol. Med. Microbiol. 1998. V. 21. P. 117–122.

5. Reifman G.V. The enzymatic activity in the leaves of plants affected by viruyses and the therapeutic action ribonuclease. Selskokhozyaistvennaya Biol., 1979, vol. 14, no. 2, pp. 217–219.

УДК 577.151.52

КЛОНИРОВАНИЕ И ГОМОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *BGL1*, КОДИРУЮЩЕГО Β-ГЛЮКОЗИДАЗУ *PENICILLIUM VERRUCULOSUM*, ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НОВОГО ФЕРМЕНТА

П.В. Волков, А.М. Рожкова, А.П. Синицын

ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биохимии им. А.Н. Баха

Штамм микроскопического гриба *Penicillium verruculosum* на протяжении последнего десятилетия используется для получения и изучения комплексных ферментных препаратов (ФП) [1], основой которых является собственный целлюлолитический комплекс ферментов, включающий высокоактивные целлобиогидролазы (КФ 3.2.1.91), эндо-β-1,4 – глюканазу (КФ 3.2.1.4, GH5) и β-глюкозидазу (КФ. 3.2.1.21, БГЛ). Биохимические свойства первых двух целлюлаз к настоящему времени изучены и описаны в работе [2], а исследование физико-биохимических свойств, ранее не изученной, грибной БГЛ *P.verruculosum* представляет собой весьма актуальную фундаментальную задачу, поскольку БГЛ является не только ключевым ферментом любого целлюлазного комплекса, но и потенциальным биокатализатором с новыми свойствами.

На первом этапе исследования ген *bgl1*, состоящий из 2443 п.о., был амплифицирован с помощью ПЦР и методом независимого лигирования клонирован в вектор pXEG под контролем сильного промотора гена *xylA*, кодирующего ксиланазу А гриба *P.canescens*. Полученной конструкцией pXylA-BGLB1 были трансформированы протопласты штамма – реципиента RN3–11–7 гриба *P.canescens*. В результате первичной селекции был отобран рекомбинантный штамм *P.canescens* PC1, значение целевой активности БГЛ по синтетическому субстрату ПНФГ и целлобиозе в культуральной жидкости (КЖ) которого составило 150 и 270 ед./мл, что превосходило значения подобных активностей в КЖ штамма-реципиента *P.canescens* в 300 раз. На основе КЖ *P.canescens* PC1 был получен лиофильно высушенный ферментный препарат (ФП).

На втором этапе исследования из ФП PC1 методами хроматографии (анионообменная хроматография – Source 15Q → гидрофобная хроматография – Source 15ISO → гель-фильтрация Superdex 75) был получен очищенный рекомбинантный фермент БГЛ *P.verruculosum* с массой 90 кДа и pI 3,75. Установлено, что фермент проявляет максимальную активность в кислой области pH (4,6) и при температуре 65° С. Период полуинактивации при 60° С составляет 87 мин. Для рекомбинантной БГЛ был определен конкурентный тип ингибирования глюкозой со значением Ki, составившим 0,2 мМ. Полученные данные позволяют сделать вывод о довольно сильном ингибировании фермента в сравнении с другими изученными грибными БГЛ [3], что негативно сказывается на процессе ферментативного гидролиза микрокристаллической целлюлозы и других целлюлозосодержащих субстратах. Поэтому дальнейшие исследования будут направлены на делецию гена *bgl P.verruculosum* в хромосоме гриба и клонировании высокоспецифичной БГЛ с минимальной степенью ингибирования.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (номер гранта 18–29–07070)

ЛИТЕРАТУРА

1. Синицын А.П., Осипов Д.О., Рожкова А.М., Бушина Е.В., Доценко Г.С., Синицына О.А., Кондратьева Е.Г., Немашкалов В.А., Матыс В.Ю., Кошелев А.В., Окунев О.Н. Получение высокоэффективных ферментных комплексов целлюлаз и гемицеллюлаз для гидролиза растительного сырья на основе штамма Penicillum verruculosum // Биотехнология. – 2013. – № 5. – С. 50–53.

2. Волков П.В, Рожкова А.М., Правильников А.Г., Андрианов Р.М., Доценко Г.С., Беккаревич А.О., Кошелев А.В., Окунев О.Н., Зоров И.Н., Синицын А.П. Получение ферментных препаратов на основе рекомбинантных штаммов *Penicillium canescens* с высокой способностью к гидролизу растительного сырья // Прикладная биохимия и биотехнология. – 2012. – № 1, С. 66–74.

3. Короткова О.Г., Семенова М.В., Морозова В.В., Зоров И.Н., Соколова Л.М., Бубнова Т.М., Окунев О.Н., Синицын А.П. Выделение и свойства грибных бета-глюкозидаз // Биохимия. – 2009. – № 5, С. 699–709

УДК 637

ПРИМЕНЕНИЕ ЗАЩИТНЫХ КУЛЬТУР ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ СМЕТАННЫХ ПРОДУКТОВ

О.И. Долматова, В.С. Крикунова

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия,

Сметана является традиционным русским продуктом. Однако недостаток молочного сырья в России усиливает интерес специалистов пищевой отрасли к разработке и совершенствованию технологий молокосодержащих продуктов. Такой подход позволяет производить продукты, близкие по своим свойствам к традиционным молочным продуктам, но выгодно отличающиеся низкой себестоимостью, а также обладающие функциональной направленностью [1, 2].

Известно, что молочные продукты имеют ограниченный срок годности. Развитие посторонних микроорганизмов в них предотвращают следующие технологические факторы: повышение качества сырья; использование консервантов; высокотемпературные технологические операции, применение защитных культур и другие. Для расширения рынка сбыта необходимо повысить показатели качества продукта [3, 4].

В работе использовали защитные культуры AiBi, которые вносили совместно с заквасочными. Технологический процесс производства сметанного продукта проводили по традиционной схеме получения сметаны.

Защитные культуры представляют собой альтернативные биологические средства защиты кисломолочных продуктов от развития нежелательной микрофлоры. Механизм работы защитных культур заключается в следующем: Lactobacillus plantarum продуцирует плантацин (бактериоцин), лактолин, изомеры молочной кислоты (L и D), конъюгированную линолиевую кислоту (CLA), перекись водорода (H_2 O_2), монооксид азота (NO); Lactobacillus casei продуцирует казеицин (бактериоцин) и молочную кислоту. Бактериоцины – это антибиотикоподобные вещества белковой природы. Основное накопление бактериоцинов происходит в конце логарифмической, начале стационарной фазы. Однако активное накопление биоцинов происходит и при охлаждении продукта. Поэтому необходимо учитывать суммарное проявление антагонизма защитных культур во время активной фазы сквашивания, охлаждения и некоторого времени хранения продукта, а также на стадии длительного хранения [5].

Расфасованный сметанный продукт в стаканчики по 100 г., упакованный в отдельную коробку отправляли на хранение на 40 сут. Отбор проб для анализов производили каждые 10 сут.

Изучены органолептические, физико-химические и микробиологические показатели образцов сметанных продуктов, содержащих защитные культуры и контрольного образца свежевыработанных, а также при хранении. Доказано, что внесение защитных культур в состав сметанного продукта приводит к более стабильному и длительному сохранению показателей качества и безопасности продукции, увеличению их срока годности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мельникова, Е.И. Молочно-растительный экстракт люпина – сырье для функциональных продуктов питания [Текст] / Е.И. Мельникова, Е.В. Богданова, М.И. Бурцева, С.С. Иванов // Пищевая промышленность. – 2014. – № 5. – С. 70–72.

2. Голубева, Л.В. Творожные продукты с компонентами растительного происхождения [Текст] / Л.В. Голубева, О.И. Долматова, Т.А. Найденкина, Е.И. Зыгалова // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. – 2015. – № 2(64). – С. 103–107.

3. Голубева, Л.В. Фруктозо – глюкозный сироп «Одуванчиковый» [Текст] / Л.В. Голубева, О.И. Долматова, Г.М. Смольский, Е.И. Бочарова // Пищевая промышленность, 2010. – № 8. – С. 28.

4. Голубева, Л.В. Изучение качества спреда «Ореховый» [Текст] / Л.В. Голубева, О.И. Долматова, Л.И. Василенко, Р.И. Игдисамова, М.Н. Якушева // Пищевая промышленность. – 2013. – № 2. – С. 70.

5. Белкова М.Д. Повелевать временем – принцип работы защитных культур AiBi® [Текст] / М.Д. Белкова // Переработка молока. – 2015. – № 5. – С. 14–16.

УДК 633.81:631

ФОРМИРОВАНИЕ ВЫСОКОТЕХНОЛОГИЧНОЙ ЭФИРОМАСЛИЧНОЙ ОТРАСЛИ В АГРОПРОМЫШЛЕННОМ КОМПЛЕКСЕ РЕСПУБЛИКИ КРЫМ

В.С. Паштецкий[1], Н.В. Невкрытая[1], В.С. Власова[1,2], Л.А. Хасанова[2], З.М. Хасанова[2]

[1] Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма, Симферополь, Россия
[2] Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы, Уфа, Россия

Производство качественной отечественной продукции из местного эфиромасличного сырья в рамках государственной политики импортозамещения является одной из актуальных задач развития, как экономики Российской Федерации, так и Республики Крым.

В настоящее время в Российской Федерации практически отсутствует отечественное эфиромасличное сырьё, при этом ежегодный импорт в Россию эфирных масел колеблется от 300 до 470 т, а их производных – от 13 до 30 тыс. т [6; 7]. Увеличение импорта эфирных масел в связи с существующей и всевозрастающей потребностью в них ставит вопрос формирования высокотехнологичной эфиромасличной отрасли в агропромышленном комплексе Российской Федерации и, в частности, на территории Республики Крым, где традиционно возделывались и перерабатывались эфиромасличные культуры.

По своим почвенно-климатическим характеристикам крымский полуостров является благоприятным для качественного выращивания эфироносов, что предполагает получение и производство в больших объемах ценной эфиромасличной продукции [1; 3]. Такие благоприятные условия позволяют получать хороший урожай, как традиционных эфиромасличных культур (шалфей, роза, лаванда, кориандр), так и более прихотливых в выращивании, но перспективных (иссоп, мята, полынь таврическая).

Как известно, эфирные масла и продукты, получаемые из эфиромасличного сырья, находят широкое применение в парфюмерно-косметическом, ликероводочном, фармацевтическом, лакокрасочном производствах, успешно используются в пищевой промышленности. Большинство эфиромасличных растений одновременно являются и лекарственными, находя соответствующее применение, как в народной, так и в официальной медицине, а также в ветеринарии [2 – 7].

В СССР площадь под возделывание эфироносов составляла 250 тыс. га, заготавливалось более 240 тыс. т сырья, из которого вырабатывалось около 1,4 тыс т эфирных масел, из них на экспорт шло 120 т. Крым производил 60 % общесоюзного объема лавандового эфирного масла, 52 % – эфирного масла шалфея и 30 % – розового масла. Выращиванием эфироносов в Крыму занимались 28 хозяйств, в том числе 7 специализированных совхозов-заводов, 13 колхозов и 8 совхозов, в Симферополе находилось НПО «Эфирмасло», в структурным подразделением которого был Всесоюзный НИИ эфиромасличных культур, машиностроительный завод, государственное специализированное конструкторское бюро и сеть семеноводческих совхозов [1; 3; 6; 7].

В настоящее время возделыванием эфиромасличных культур в Республике Крым постоянно занимаются не более двух десятков сельскохозяйственных предприятий Бахчисарайского, Белогорского, Симферопольского районов и города Алушта. На сегодня площадь сельскохозяйственных угодий под шалфей составляет 1,3–1,4 тыс. га, лаванду – 2,5–2,7 тыс. га, кориандр – 13 тыс. га, плодоносящую розу – 70–80 га, незначительно представлены кориандр, фенхель, укроп и полынь крымская, тогда как в конце 80-х – начале 90-х гг. прошлого столетия площадь под розу составляла 1,3–1,4 тыс. га, шалфей – 4 тыс. га, лаванду – 5 тыс. га [5; 6].

В основе формирования высокотехнологичной эфиромасличной отрасли в Российской Федерации и, в частности, на территории Республики Крым, должен быть комплекс мероприятий от начальных этапов возделывания до глубокой переработки эфиромасличных культур с использованием инновационных биотехнологий с целью получения качественной и конкурентоспособной на рынке продукции глубокой безотходной переработки эфиромасличного сырья.

ЛИТЕРАТУРА

1. Назаренко Л.Г., Афонин А.В. Эфироносы юга Украины. – Симферополь: Таврия, 2008. – 144 с.

2. Невкрытая Н.В., Мишнев А.В. Актуальные направления биохимических исследований эфиромасличных растений. – Таврический вестник аграрной науки, 2018. – № 4(16). – С. 101–123.

3. Паштецкий В.С., Невкрытая Н.В., Мишнев А.В., Назаренко Л.Г. Эфиромасличная отрасль Крыма. Вчера, сегодня, завтра: 2-ое издание, дополненное. Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2018 320 с.

4. Паштецкий В.С., Невкрытая Н.В., Мишнев А.В. История, современное состояние и перспективы развития эфиромасличной отрасли // Аграрный вестник Урала, 2017. – № 11 (165). – С. 37–46.

5. Паштецкий В.С., Невкрытая Н.В., Мишнев А.В., Назаренко Л.Г. Эфиромасличная отрасль Крыма. Вчера, сегодня, завтра. – Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2017. – 244 с.

6. Полякова Н.Ю. Современное состояние эфиромасличной отрасли в Крыму // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия «Экономика. Информатика», 2017. – Т. 43. – № 16 (265). – С. 75–79.

7. Черкашина Е.В. Экономика и организация рационального использования и охраны земель эфиромасличной и лекарственной отрасли в Российской Федерации: автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора экономических наук. – Москва, 2014. – 39 с.

УДК 637

БИОТЕХНОЛОГИЯ ТВОРОЖНОГО ПРОДУКТА С ПРОЛОНГИРОВАННЫМИ СРОКАМИ ГОДНОСТИ

О.И. Долматова, О.В. Викторова

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Творожные продукты самая динамичная группа молочных товаров по росту потребления в России. Для расширения ассортиментной линейки молочных продуктов применяют различные вкусовые компоненты и добавки [1–3].

Однако сроки годности продуктов с наполнителями могут уменьшаться относительно аналогичных без добавок.

В последние годы защитные культуры нашли применение в молочной промышленности.

Защитные культуры общепризнаны как безопасные микроорганизмы-антагонисты, которые подавляют рост патогенной и прочей нежелательной микрофлоры, не оказывая влияния на органолептические свойства продукта.

Принцип действия защитных культур основан на двух механизмах: борьбе за выживание и выделении микроорганизмами в процессе жизнедеятельности антогонистических веществ.

В работе использовали защитные культуры AiBi, которые вносили совместно с заквасочными [4].

Технологический процесс производства творожного продукта проводили по традиционной схеме. В качестве наполнителя вносили фитокомпоненты.

Для фитопрепаратов характерна малая токсичность и низкая вероятность аллергических реакций. Это можно объяснить тем, что растительные компоненты человек много веков потреблял в пищу и до сих пор растительная пища входит в рацион человека. Вещества растительного происхождения не приносят вреда организму. Существенным плюсом является то, что к фитотерапии нет явных противопоказаний.

В готовый творожный продукт вносили наполнитель в виде порошка перемолотых трав. Совместимость наполнителя с творогом разной массовой доли жира определяли сенсорно по следующим показателям: внешний вид, консистенция, цвет, запах и вкус.

Творожный продукт обладал приятным вкусом, имел белый с мелкими вкраплениями наполнителя цвет, мягкую мажущуюся или рассыпчатую консистенцию в зависимости от массовой доли жира продукта.

Изучены органолептические, физико-химические и микробиологические показатели образцов творожных продуктов, содержащих защитные культуры и контрольного образца свежевыработанных, а также при хранении.

Доказано, что внесение защитных культур в состав творожного продукта приводит к более стабильному и длительному сохранению показателей качества и безопасности продукции, увеличению их срока годности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Голубева, Л.В. Творожные продукты с компонентами растительного происхождения [Текст] / Л.В. Голубева, О.И. Долматова, Т.А. Найденкина, Е.И. Зыгалова // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. – 2015. – № 2(64). – С. 103–107.

2. Голубева, Л.В. Фруктозо – глюкозный сироп «Одуванчиковый» [Текст] / Л.В. Голубева, О.И. Долматова, Г.М. Смольский, Е.И. Бочарова // Пищевая промышленность, 2010. – № 8. – С. 28.

3. Голубева, Л.В. Изучение качества спреда «Ореховый» [Текст] / Л.В. Голубева, О.И. Долматова, Л.И. Василенко, Р.И. Игдисамова, М.Н. Якушева // Пищевая промышленность. – 2013. – № 2. – С. 70.

4. Белкова М.Д. Повелевать временем – принцип работы защитных культур AiBi® [Текст] / М.Д. Белкова // Переработка молока. – 2015. – № 5. – С. 14–16.

УДК 612.392.72

РАЗРАБОТКА НАПИТКОВ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО НАЗНАЧЕНИЯ НА ОСНОВЕ ЯБЛОЧНОГО СЫРЬЯ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН

Л.А. Хасанова[1], З.М. Хасанова[1], А.Р. Саттаров[1], С.А. Хасанов[1], К.И. Насыкова[1], Р.А. Шафиков[2], И.О. Чанышев[2]

[1] Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы, Уфа, Россия
[2] Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Уфа, Россия

Государственная политика в области здорового питания населения Российской Федерации предполагает развитие производства пищевых продуктов с выраженной биологической активностью, антиоксидантными, иммунокоррегирующими, шлаковыводящими свойствами. К таковым, в частности, относятся напитки функционального назначения на основе яблочного сырья.

Традиционные для России яблоки, являющиеся для населения бесценным источником физиологически значимых макро и микроэлементов, витаминов и других биологически активных веществ, как нельзя лучше удовлетворяют требованиям, предъявляемым к сырью для производства функциональных напитков [1; 2].

В лаборатории биотехнологии и физиологии растений, научно-образовательной лаборатории производства и оценки качества биотехнологической продукции кафедры биоэкологии и биологического образования Башкирского государственного педагогического университета им. М. Акмуллы изучались физико-химические и органолептические характеристики яблок башкирских сортов и натуральных яблочных соков из них на соответствие стандартам качества ГОСТ 25555.0–82 «Продукты переработки плодов и овощей» с целью последующего использования яблочного сырья для производства функциональных напитков, обеспечивающих профилактику авитаминозов, дефицита макро- и микроэлементов в организме человека.

Исследование органолептических и физико-химических характеристик (содержание сухих веществ, сахаров, титруемых кислот, аскорбиновой кислоты) в плодах яблок сортов *Башкирский красавец, Бельфлер башкирский, Буляк, Бузовьязовское, Пепин, Сеянец Титовки* Кушнаренковского селекционного центра Башкирского научно-исследовательского института сельского хозяйства, а также в соках из них, показало соответствие исследованного яблочного сырья ГОСТ 25555.0–82 и ГОСТ 32097–2013.

В результате проведённых экспериментов по разработке рецептур и биотехнологии безалкогольных напитков предложен напиток функционального назначения на основе местного натурального яблочного сырья, обогащённый кальцием и магнием с целью профилактики авитаминозов, дефицита макро- и микроэлементов в организме человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хасанова З.М., Хасанова, Л.А. Технология экопродуктов (натурального сидра и яблочного уксуса) из яблочного сырья Республики Башкоростан – Уфа: Изд-во БГПУ им. М. Акмуллы, 2017. – 184 с.

2. Хасанова З.М., Хасанова Л.А., Байматов В.Н., Саттаров В.Н., Маннапов А.Г. Эконапиток на основе башкирского мёда и яблочного уксуса // Пчеловодство, 2017. – № 8. – С. 51–53.

УДК 57.044

ВЛИЯНИЕ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО НА СКОРОСТЬ ДЫХАНИЯ МИТОХОНДРИЙ ЛЕТАТЕЛЬНЫХ МЫШЦ ШМЕЛЕЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ ПЕСТИЦИДОВ IN VITRO

Сыромятников М.Ю.[1], Попов В.Н.[1,2]

[1] Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия
[2] Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Метиленовый синий (МС) – органический основной тиазиновый краситель, который получил широкое распространение в медицине в качестве лекарства от малярии, метгемоглобинемии и при отравлении цианидом (Schirmer et al., 2011). МС проявляет свойства редокс-компонента электрон-транспортной цепи за счет того, что может окислять NADH и переносить электроны на цитохром с. Этот эффект известен как альтернативный транспорт электронов (Wen et al., 2011). Согласно классической теории, МС принимает электроны от NADH и переносит на цитохром с. Ранее было неоднократно показано, что МС улучшает митохондриальный метаболизм (Poteet et al., 2012; Atamna et al., 2008). Было высказано предположение, что МС может увеличить скорость митохондриального

дыхания за счет стимулирования активности I, III и IV комплекса электрон-транспортной цепи (Atamna et al., 2008). Таким образом, метиленовый синий потенциально может обладать протекторными свойствами от действия пестицидов, способных ингибировать дыхание митохондрий. Целью данного исследования явилась изучение влияния МС на митохондрии летательных мышц шмелей in vitro при действии пестицидов.

Было произведено выделение митохондрий из летательных мышц шмелей и оценена скорость дыхания митохондрий на субстрате малат + пируват (дыхание опосредованное комплексом I электрон-транспортной цепи) при добавлении АДФ, пестицидов (имидоклоприд, ротенон, дельтаметрин, дифеноконазол, малатион, метрибузин, пенконазол, циперметрин и эсфенвалерат) и МС. Добавление митохондрий и вышеперечисленных компонентов в ячейку оксиграфа осуществлялось в следующей последовательности: 1. митохондрии, 2. АДФ, 3. Пестицид, 4. МС. Результаты действия пестицидов и МС на дыхание митохондрий представлены в таблице 1.

Таблица 1. Влияние пестицидов и МС на дыхание митохондрий летательных мышц шмелей.

Пестицид	+ АДФ (нмоль O_2/мин/мг белка)	+ Пестицид (нмоль O_2/мин/мг белка)	+ МС (нмоль O_2/мин/мг белка)
Имидоклоприд	124,1	118,4	114,7
Ротенон	133,3	7,7	17,7
Дельтаметрин	128,3	29,4	39,7
Дифеноконазол	121,6	14,7	31,4
Малатион	125,7	21,3	28,1
Метрибузин	123,9	28,4	36,4
Пенконазол	120,8	17,1	28,5
Циперметрин	126,2	26,9	32,8
Эсфенвалерат	122,4	21,4	26,4

Имидоклоприд не оказал влияние на скорость дыхания митохондрий. Ротенон оказал резко выраженный ингибиторный эффект на дыхание митохондрий летательных мышц шмелей, скорость дыхания уменьшилась в 17,7 раза с 133,3 нмоль O_2/мин/мг белка до 7,7 нмоль O_2/мин/мг белка. Последующее добавление МС при этом увеличило скорость дыхания в 2,3 раза. Дельтаметрин оказал менее выраженный ингибирующий эффект, дыхание митохондрий уменьшилось в 4,3 раза, МС после этого простимулировал дыхание, оно увеличилось в 1,4 раза. Дифеноконазол уменьшил дыхание в 8,2 раза, последующее добавление МС ускорило дыхание в 2,1 раза. Малатион и метрибузин уменьшили дыхание в 5,9 и 4,3 раза соответственно, добавление МС ускорило дыхание в 1,3 раза для обоих пестицидов. Пенконазол также оказал ингибирующий эффект на дыхание митохондрий (дыхание уменьшилось более чем в 6 раз), а добавление МС ускорило дыхание в 1,7 раза. Циперметрин и эсфенвалерат сократили скорость дыхания митохондрий летательных мышц шмелей в 4,9 и 5,7 раза соответственно. Последующее добавление МС ускорило дыхание митохондрий в 1,2 раза.

Таким образом, показано, что МС может стимулировать дыхание митохондрий летательных мышц шмелей при действии на них пестицидов. Механизм такого действия МС пока ещё не ясен. Требуются дальнейшие исследования в этом направлении. В целом, полученные результаты позволяют предположить, что МС может выступать как антидот при токсическом действии пестицидов на поллинаторов.

Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации для молодых ученых (проект МК3173.2019.11).

ЛИТЕРАТУРА

1. Schirmer R.H., Adler H., Pickhardt M., Mandelkow E. (2011) "Lest we forget you–methylene blue…". Neurobiol Aging 32:2325.e7–16.

2. Wen Y., Li W., Poteet E.C., Xie L., Tan C., Yan L.J., Ju X., Liu R., Qian H., Marvin M.A., Goldberg M.S., She H., Mao Z., Simpkins J.W., Yang S.H. (2011) Alternative mitochondrial electron transfer as a novel strategy for neuroprotection. J Biol Chem 286:16504–16515.

3. Poteet E., Winters A., Yan L.J., Shufelt K., Green K.N., Simpkins J.W., Wen Y., Yang S.H. (2012) Neuroprotective actions of methylene blue and its derivatives. PLoS One 7:e48279.

4. Atamna H., Nguyen A., Schultz C. et al. (2008) Methylene blue delays cellular senescence and enhances key mitochondrial biochemical pathways. FASEB J 22:703–712.

Секция 2. Медицинская биотехнология и биофармацевтика

УДК 573.6.086.83 + 577.21

РАЗРАБОТКА РАНЕВОГО ПОКРЫТИЯ НА ОСНОВЕ РАСТВОРИМОЙ ФОРМЫ КОМПОНЕНТОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА

Р.Д. Мустафина[1], И.Р. Гильмутдинова[2], П.С. Еремин[2]

[1] ФГАОУ Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

[2] Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии, Москва, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Лечение ран консервативными методами не всегда может приводить к ожидаемым результатам. Доступные на российском рынке на данный момент раневые покрытия, или повязки, обладают множеством недостатков, например, прилипание повязок к ране, в результате чего происходит деформация возобновленного кожного покрова, а сам процесс перевязки становится болезненным для пациентов [1, 2]. На зарубежном рынке имеются аналоги, соответствующие требованиям регенеративной медицины, однако, они либо достаточно дорогие, либо труднодоступны для российских медицинских учреждений. При большой площади повреждения кожи широко используются биопластические материалы, основой которых являются продукты децеллюризированной дермы (свиной или донорской человека) [3, 4]. Такие продукты обладают следующими существенными недостатками: высокая стоимость и высокий риск развития нежелательных явлений. Исходя из вышесказанного, встает вопрос разработки новых современных раневых покрытий, способствующих более эффективному лечению и регенерации кожных покровов [5, 6].

Одним из перспективных направлений регенеративной медицины является получение биоматериалов на основе внутриклеточного матрикса для использования их в комбустиологии, травматологии и пластической хирургии [7]. При разработке подобных материалов наибольший интерес представляют комбинации из таких компонентов, как коллаген, эластин и гиалуроновая кислота, так как они являются одними из основных компонентов кожи и других соединительных тканей человека [8]. Коллаген составляет основу соединительной ткани организма, в том числе и дермы, и обеспечивает ее прочность и эластичность [9]. Эластин, как и коллаген, обеспечивает механическую прочность тканей, помогает органам восстанавливать исходные размеры после деформаций и обеспечивает контакты между клетками [10]. Гиалуроновая кислота также является одним из основных компонентов внеклеточного матрикса, отвечает за вязкость жидкостей в организме, эластичность и регенерацию тканей [11]. Идеальное покрытие должно отвечать ряду требований, предъявляемых современной медициной, таких как: создание оптимальной микросреды для регенерации кожи, удаление избытка раневого экссудата, предотвращение повторного заражения раны, стабильность, адгезивность и т. д. [5, 12]. При этом, покрытие должно обладать биосовместимостью и не должно вызывать аллергических и цитотоксических реакций [13, 14].

Цель работы создание нового биопластического материала на основе растворимой формы компонентов внеклеточного матрикса для использования его в качестве раневого покрытия, отвечающий всем требованиям современной медицины.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В нашей работе использовали следующие компоненты: коллаген, эластин и гиалуроновая кислота, в пропорции, равной соотношению в дерме взрослого человека: коллаген 70–90 %, гиалуроновая кислота 5–26 %, эластин 1–25 %. Для стабилизации биопленки в жидкой среде материал подвергали фотохимической сшивке. Фотохимическую сшивку осуществляли с помощью источника

ультрафиолетового излучения (λ < 230 нм, расстояние от источника излечения до биоматериала 30 см). В процессе разработки материала подбирали: технологию получения гидрогеля, время воздействия на гидрогель ультрафиолетовым излучением для формирования фотохимической сшивки будущего биоматериала.

Сухие вещества смешивали в пропорции: коллаген – 70 %, гиалуроновая кислота – 9 %, эластин – 21 %. Добавляли дистиллированную воду и, с помощью лопастной мешалки с подогревом (37° С), мешали на средней/ максимальной скорости 5 – 10 минут. Жидкость разливали по железным и гидрофобным поддонам. Оставляли в ламинарном шкафу под ультрафиолетовым излучением на 6–17 часов с дальнейшим выдерживанием при комнатной температуре в течение 7–18 часов.

Для оценки физических свойств, материал разрезали на образцы одинаковых размеров, помещали в чашки Петри, заливали 0,9 % раствором NaCl и визуализировали под микроскопом. Далее материалы переносили в CO_2 инкубатор (37° С, 5 % CO_2) и наблюдали в течение 5-ти суток.

Для оценки цитотоксичности и биосовместимости материала на исследуемые образцы сажали клетки исходя из концентрации 15×10^3 кл/см^2, выдерживали 30 минут, заливали ростовой средой (DMEM L/g, 10 % FBS). Помещали в CO_2 инкубатор (37° С, 5 % CO_2). Визуализировали с помощью флуоресцентного микроскопа на 5-ые сутки культивирования. Клетки окрашивали с помощью ДНК-красителя Хехст.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Образец биоматериала, полученного путем смешивания смеси при средней скорости и при 17 часах фотохимической сшивки, характеризовался ломкостью, хрупкостью, гладкостью (Рис. 1). Цвет насыщенный карамельный. Пор не наблюдалось. Сильно прилипал к железным поддонам. Его хрупкость объясняется тем, что образец сильно пересох под источником ультрафиолетового излучения, а отсутствие пор недостаточной скоростью смешивания. Образец материала оставался стабильным при комнатной температуре, но при 37° С деградировал в течение часа.

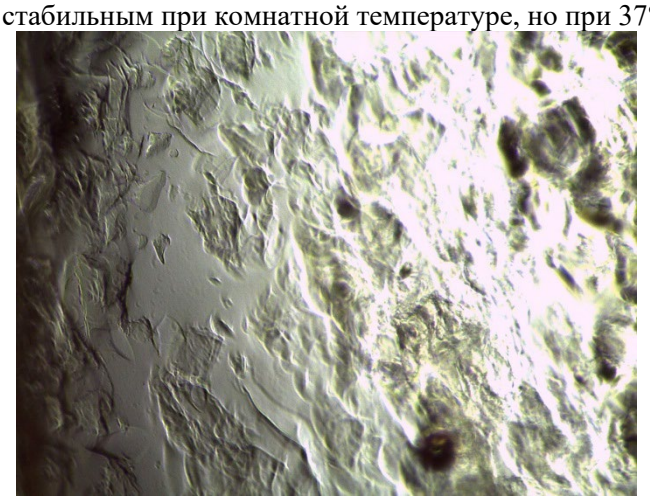


Рис. 1. Биоматериал «А». фотохимическая сшивка 17 часов. Световая микроскопия×50

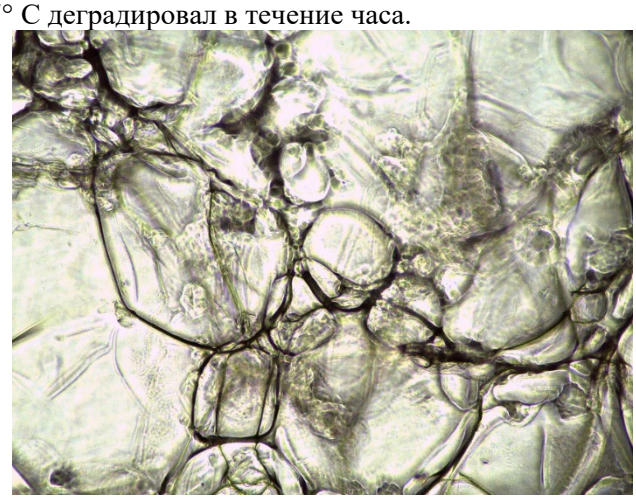


Рис. 2. Биоматериал «Б». фотохимическая сшивка 6 часов. Световая микроскопия×50

Опытным путем были подобраны оптимальные условия для получения биоматериала. Было решено проводить фотохимическую сшивку в течение 6-ти часов, а также смешивать вещества на максимальной скорости, для образования пузырьков воздуха, которые при сшивке образовывали пористую структуру материала. К тому же были использованы поддоны с гидрофобной поверхностью во избежание прилипания материала ко дну. После 6-ти часовой фотохимической сшивки материал оставляли подсыхать в ламинарном шкафу в течение 18 часов. Полученный материал имел светло-желтый цвет, высокую пористость, эластичность и не ломался при сгибании (Рис. 2). Хорошо отходил от гидрофобных поверхностей. По истечении 5-ти суток находящийся в CO_2 инкубаторе биоматериал деградировал на 10–15 %. При оценке цитотоксичности и биосовместимости материала наблюдался высокий рост клеточных культур как на чашках Петри, так и на самом биоматериале.

ВЫВОДЫ

Был разработан новый биопластический материал на основе растворимой формы внеклеточного матрикса, а именно коллагена, эластина и гиалуроновой кислоты. Материал пластичен, нецитотоксичен и биосовместим, стабилен в течение нескольких суток при 37° С. Высокая пористость может способствовать высокому газообмену между кожей и внешней средой, создавая при этом оптимальное микроокружение для клеток, которые способствуют росту трехмерной структурированной ткани. Таким образом, полученный биоматериал отвечает всем требованиям, предъявляемым к современным тканеинженерным конструкциям, что создает предпосылку к его использованию в таких областях медицины, как комбустиология, пластическая хирургия и травматология.

Работа выполнена при финансовой поддержке фонда «УМНИК–18 (в)» (договор № 14612ГУ/2019 от 23.07.2019)

ЛИТЕРАТУРА

1. Современный комплексный подход к лечению больных, пострадавших от ожогов / А.А. Алексеев [и др.] // Сборник научных трудов III съезда комбустиологов России. 15–18 ноября 2010 г. – М., 2010. – С. 150–151.

2. Алексеев А.А., Бобровников А.Э. Местное консервативное лечение ожогов: рекомендации для врачей. М.: Мед. информ. агентство; 2015. 112

3. Christopher A. Carruthers, Christopher L. Dearth et al. // Histologic Characterization of Acellular Dermal Matrices in a Porcine Model of Tissue Expander Breast Reconstruction. // Tissue Eng Part A. 2015. 21(1–2): 35–44;

4. Алексеев А.А. Малютина Н.Б., Тюрников Ю.И. Перспективные возможности эффективного лечения пограничных и мозаичных ожогов II–III степени // Комбустиология, 2016. № 56–57. [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://combustiolog.ru/number_journal/nomer-56–57. 2016 / (дата обращения: 23.12.2016).

5. I.S. Vinnik, N.M. Markelova, N.S. Solov'eva, E.I. Shishatskaia, M.N. Kuznetsov, A.P. Zuev // The Current Dressings for Wound Care in the Treatment of Purulent Wounds // Novosti Khirurgii. 2015 Sep-Oct; Vol 23 (5): 552–558;

6. Современные раневые покрытия в местном лечении ран различного генеза / Д.В. Шаблин [и др.] // Фундам. исследования. – 2013. – № 12–2. – С. 361–65;

7. Булай П.И. Биологические комплексы для заживления ожогов // Современные подходы к разработке эффективных перевязочных средств: Матер. междунар. конф. – М., 1995. – С. 116–117.

8. Лившиц В.С. Полимерные покрытия на раны и ожоги (обзор) // Хим-фарм. журнал. – 1988. – Т. 22, № 7. – С. 790–798.

9. Смирнов С.В. Биологическая повязка на основе коллагена типа I с тромбоцитарным фактором роста в лечении ожоговых ран IIIа степени // Здоровье столицы. – 2006. – М.: ГЕОС, 2006. – 197 с 10. Хилькин А.М. Коллаген и его применение в медицине. – М.: Медицина, 1976. – С. 183–185.

11. Р.Т. Нигматуллин, Р.З. Кутушев // Применение эластинового биоматериала в восстановительной хирургии стенок глаза // Практическая медицина 6(98). Ноябрь 2016; с 119–121.

12. Still J.M., Law E.J. Decreasing length of hospital stay by early excision and grafting of burns // Belcher South Med. J. – 1996. Vol. 89. – P. 578–582;

13. Гофельд, А.М. К вопросу об оптимальных условиях для "выхаживания" тканей в ожоговой ране / А.М. Гофельд, М.А. Гофельд, Т.Н. Бобродина // Тезисы докладов международного хирургического конгресса "Раны, ожоги, повязки". – Тель-Авив. – 1998. – С. 62. 5. К 14. Севастьянов В.И. Кирпичников М.П. БИОСОВМЕСТИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ // М., 2011, С. 47–54;

УДК 616–006.66

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ CA-125 И MISRII – ПОВЕРХНОСТНЫХ МАРКЕРОВ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЯИЧНИКОВ

А.Я. Рак, А.В. Трофимов, А.М. Ищенко

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Рак яичников является самой смертоносной онкогинекологической патологией [1]. Это заболевание по праву называют «тихим убийцей», поскольку чаще всего оно развивается бессимптомно [2]. К моменту постановки диагноза у пациенток уже выявляется обширное, быстро прогрессирующее асцитное поражение брюшной полости [2], поэтому крайне важно выявить рак яичников на самых ранних стадиях. Этому способствует проведение иммуногистохимического анализа после первичного скрининга на онкомаркеры, которое позволяет не только подтвердить наличие опухолевых клеток, но и оценить морфологию опухоли. Известно, что гиперэкспрессия муцина CA-125 наблюдается более чем в 85 % случаев опухолей яичника [3], а рецептора антимюллерова гормона II типа (MISRII) – в 75 % [4]. По этой причине наиболее информативной представляется параллельная детекция данных поверхностных маркеров. Более того, показано, что взаимодействие некоторых специфических антител с MISRII способно индуцировать в опухолевых клетках проапоптотический сигнальный каскад, и таким образом, ряд антител к этому маркеру может быть использован не только для детекции, но и для терапии онкопатологии [5]. В данной работе была исследована возможность использования ранее полученных мышиных моноклональных антител против трансмембранных белков CA-125 и MISRII для проведения иммуногистологического анализа присутствия этих маркеров на клетках аденокарциномы яичника.

В исследовании использован гистологический материал, предоставленный ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, и ранее полученные в лаборатории мышиные моноклональные антитела. Образцы опухолевой ткани фиксировали 10 % нейтральным забуференным формалином, затем проводили по спиртам и заключали в парафин по стандартной методике. Из полученных блоков были изготовлены срезы толщиной 5 мкм, которые монтировали на предметные стекла, депарафинизировали, промывали водой и затем в течение часа обрабатывали блокирующим раствором (2 % бычьего сывороточного альбумина в 20 мМ фосфатном буфере, pH 7,4). Далее на 1,5 ч вносили раствор первичных антител в блокирующем буфере (5 мкг/мл). После трехкратной отмывки фосфатным буфером, содержащим 0,05 % Твин-20, срезы обрабатывали раствором GAM-Px – антител козы против Fc-фрагмента иммуноглобулинов IgG мыши (Sigma, США), конъюгированных с пероксидазой хрена (в разведении 1:4000). Спустя 1 ч срезы отмывали, споласкивали водой и проявляли окрашивание раствором диаминобензидина (0,05 %) в фосфатном буфере с добавлением 1 % диметилсульфоксида и 1 % перекиси водорода.

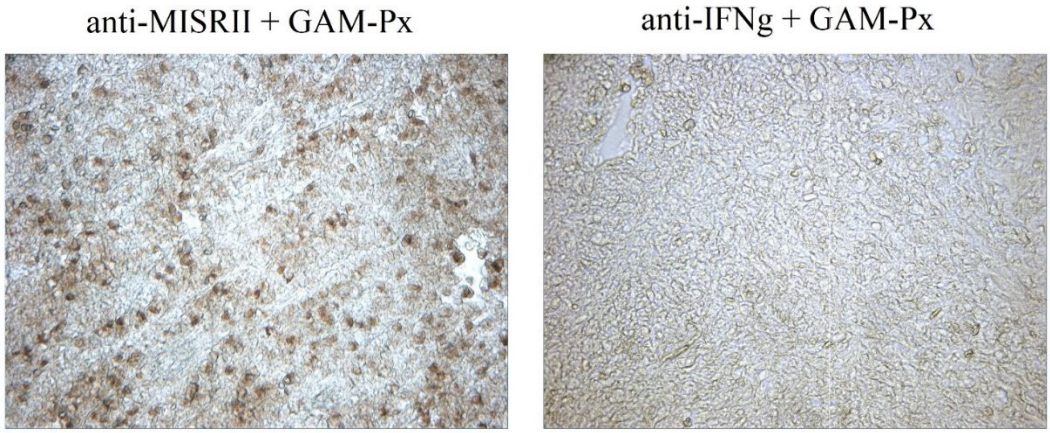


Рисунок 1. Иммуногистологический анализ срезов аденокарциномы яичника, обработанных антителами против поверхностных маркеров MISRII и CA-125 (слева) и в качестве негативного контроля – антителами против гамма-интерферона и интерлейкина-6 человека (справа)

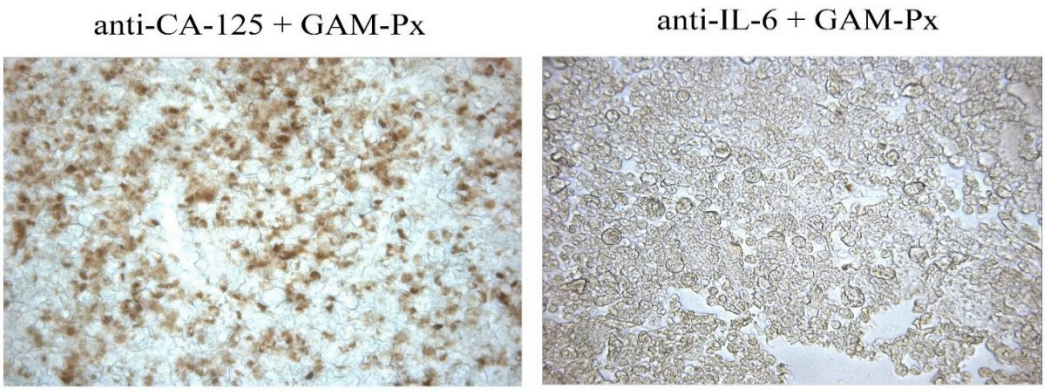


Рисунок 1. Продолжение

Результаты иммуногистохимического анализа представлены на рисунке 1. Видно, что окрашивание контрольных срезов (обработаны первичными антителами против гамма-интерферона и интерлейкина 7 человека) является отрицательным. В то же время с помощью антител против MISRII и CA-125 на срезах выявлены диффузно локализованные опухолевые клетки. Интенсивность неспецифического фонового окрашивания при этом является низкой.

Таким образом, полученные нами мышиные моноклональные антитела против поверхностных маркеров MISRII и CA-125 могут быть использованы для иммуногистохимической диагностики онкогинекологических заболеваний и характеристики морфологии опухолей.

ЛИТЕРАТУРА

Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics, 2019 //CA: a cancer journal for clinicians. – 2019. – Vol. 69. – №. 1. – P. 7–34.

Barnholtz-Sloan J.S. et al. Ovarian cancer: changes in patterns at diagnosis and relative survival over the last three decades //American journal of obstetrics and gynecology. 2003. Vol. 189. №. 4. P. 1120–1127.

Van der Burg M.E., Lammes F.B., Verweij J. CA 125 in ovarian cancer //The Netherlands journal of medicine. – 1992. – Vol. 40. – №. 1–2. – P. 36–51.

Bakkum-Gamez J.N. et al. Müllerian inhibiting substance type II receptor (MISIIR): a novel, tissue-specific target expressed by gynecologic cancers //Gynecologic oncology. 2008. Vol. 108. №. 1 P. 141–148.

Estupina P. et al. The anti-tumor efficacy of 3C23K, a glyco-engineered humanized anti-MISRII antibody, in an ovarian cancer model is mainly mediated by engagement of immune effector cells // Oncotarget. – 2017. – Vol. 8. – №. 23. – P. 37061–37079.

УДК 57.043; 577.34

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ НА РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

М.В. Улитко[1,2], Т.Р. Султанова[1], Р.А. Вазиров[1], С.Ю. Соковнин[1,3], В.Г. Ильвес[3]

[1] Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, г. Екатеринбург, Россия
[2] Институт медицинских клеточных технологий, г. Екатеринбург, Россия
[3] Институт электрофизики УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Одним из основных методов лечения онкологических заболеваний является лучевая терапия. Механизм радиационного воздействия основан на структурно-метаболических изменениях клеток, приводящих к нарушению их функций, подавлению пролиферативной активности и разрушению опухолевой ткани [1]. Однако ионизирующее излучение вызывает изменения не только в опухоли, но и в окружающих ее нормальных тканях, что приводит к необходимости поиска способов снижения повреждающего воздействия на здоровые клетки при сохранении положительного лечебного эффекта от лучевой терапии.

Одним из самых перспективных и стремительно развивающихся направлений является нанобиотехнология. Маленькие размеры, а также большая удельная поверхность наночастиц повышает их реакционную и каталитическую активность. Это открывает широкие перспективы для применения наноматериалов во многих областях медицины [2, 3]. Значительный интерес для исследования представляют наночастицы диоксида церия (CeO_2), проявляющие ферментоподобные свойства, за счёт чего они способны оказывать цитопротекторное, а в некоторых случаях, цитотоксическое действие на клетки. Кроме того, наночастицы CeO_2 могут проявлять радиопротекторные свойства по отношению к здоровым клеткам, защищая их от радиационно-индуцированного окислительного стресса, поддерживая высокий уровень дегидрогеназной активности, снижая количество апоптотических клеток и уровень активных форм кислорода, что позволяет в перспективе использовать эти наночастицы в медицинской сфере при радиотерапии опухолевых заболеваний [4–6].

В данной работе исследуется влияние наночастиц CeO_2 на радиочувствительность культур нормальных и опухолевых клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводились на культуре дермальных фибробластов человека, выделенной из биоптата кожи в Институте медицинских клеточных технологий, г. Екатеринбург и на клеточной культуре карциномы шейки матки человека HeLa, полученной из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН, г. Санкт-Петербург. Клетки помещали в 96-луночные планшеты в посевной дозе 2×10^5 кл/мл и культивировали 24 часа в CO_2 инкубаторе Sanyo (Panasonic) MCO-18AC при температуре 37° С в атмосфере с 5 % CO_2, 95 % влажности с использованием питательной сред Игла DMEM (Биолот, Россия) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Биолот, Россия) и гентамицина в дозе 50 мкг/мл. Для морфологических исследований клетки культивировались на покровных стёклах в 6-луночных планшетах.

Исследовали радиомодифицирующие свойства мезопористого нанопорошка CeO_2, полученного методом испарения импульсным электронным пучком в газе низкого давления на установке НАНОБИМ-2 в Институте электрофизики УрО РАН. Синтезированные нанопорошки имеют размер зерен от 3 до 5 нм и высокую удельную поверхность до 190 $м^2$/г., при этом размер агломератов достигал 300 – 1000 нм. Для получения стабильной суспензии наночастиц использовали стабилизатор цитрат натрия. Водные растворы наночастиц CeO_2 вносили в клеточные культуры в конечных концентрациях 0,05 мкг/мл и 0,1 мкг/мл.

Облучение образцов проводилось на установке для рентгенотерапии Xstrahl 300 (100–320 кэВ) с источником излучения ^{60}Co в Свердловском областном онкологическом диспансере. Образцы подвергались облучению с энергией 150 кэВ, мощность поглощенной дозы в образце составляла 62 сГр/мин. Контроль поглощенной дозы проводился с использованием термолюминесцентных дозиметров ТЛД-500 [7] и цветовых дозиметров СО ПД (Э) – 1/10 [8]. Облучение образцов проводилось в дозах 5 Гр, 10 Гр и 15 Гр. Расхождение поглощенной дозы в объёме образцов не превышало 2 %.

Для оценки биологического эффекта экспериментального воздействия через 72 часа определяли морфометрические показатели и жизнеспособность клеток. Оценку жизнеспособности проводили с помощью стандартного МТТ-теста [9] с использованием автоматического спектрофотометрического планшетного сканера Tecan Infinite M200 PRO. Перед морфометрическим исследованием клетки фиксировали на стеклах и окрашивали по Романовскому-Гимза, после чего с помощью микроскопа Axio lab. A1 и программы ImageJ определяли площадь клеток и ядер, вычисляли ядерно-цитоплазматический индекс. Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы STATISTICA 10. Вычислялось среднее арифметическое, стандартное отклонение и ошибку среднего. Для оценки значимости различий между контрольными и экспериментальными образцами клеток использовали критерий Манна-Уитни. При вероятности ошибки (p) < 0,05 различия между средними значениями считали достоверными.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе эксперимента выявлены различия в воздействии наночастиц CeO_2 на нормальные и опухолевые клетки. В то время как наночастицы не оказали токсического действия на дермальные фибробласты, в клетках линии HeLa наблюдается нарушение морфофункционального состояния, что может являться следствием оксидазоподобной активности наночастиц в закисленной среде опухолевых клеток и усиления окислительных процессов.

При облучении нормальных фибробластов при добавлении наночастиц CeO_2 в концентрации 0,05 мкг/мл наблюдается повышение жизнеспособности клеток при дозах облучения 5 Гр и 10 Гр, что свидетельствует о проявлении радиопротекторных свойств наночастиц CeO_2 (рис. 1).

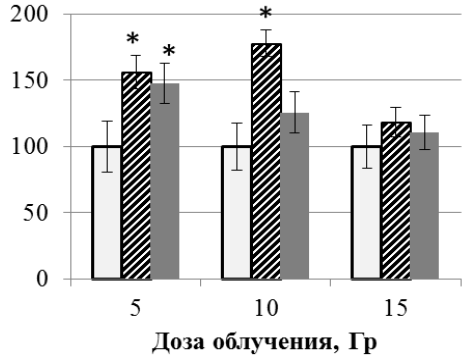


Рис. 1. Влияние облучения на жизнеспособность клеточной культуры дермальных фибробластов человека после введения наночастиц CeO2

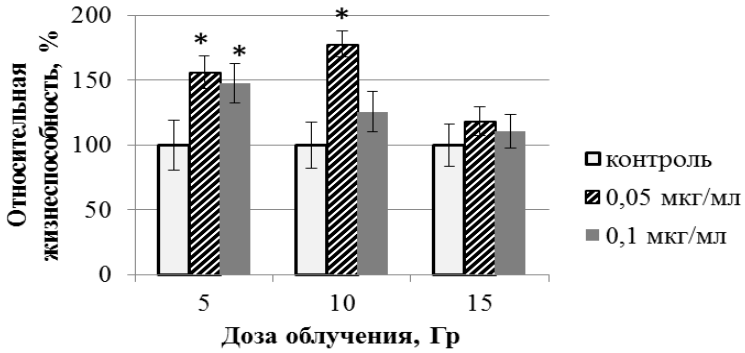


Рис. 2. Влияние облучения на жизнеспособность клеточной культуры дермальных фибробластов человека после введения наночастиц CeO2

Примечание * – различие с контролем достоверно ($p < 0,05$)

Облучение в дозах 5 Гр и 10 Гр на фоне введения наночастиц CeO_2 приводит к снижению ядерно-цитоплазматического отношения за счёт уменьшения размеров ядра и увеличения площади цитоплазмы клеток (рис. 2) и появлению в культуре удлиненных клеток веретенообразной формы, свидетельствующем о дифференцировке фибробластов в более зрелые фиброциты (рис. 3).

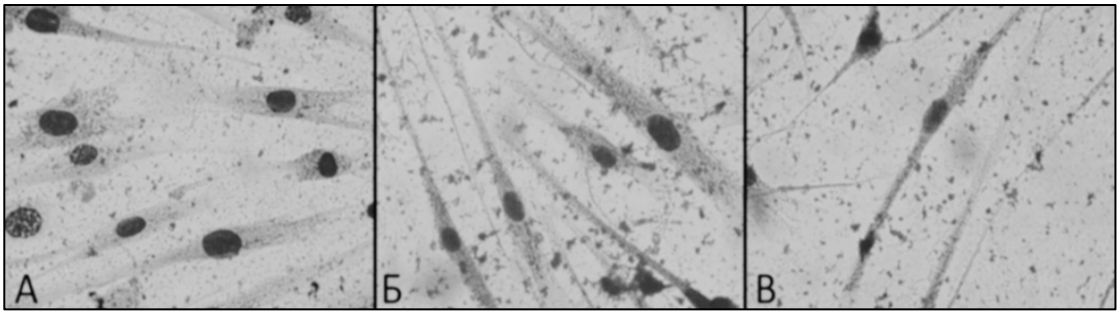
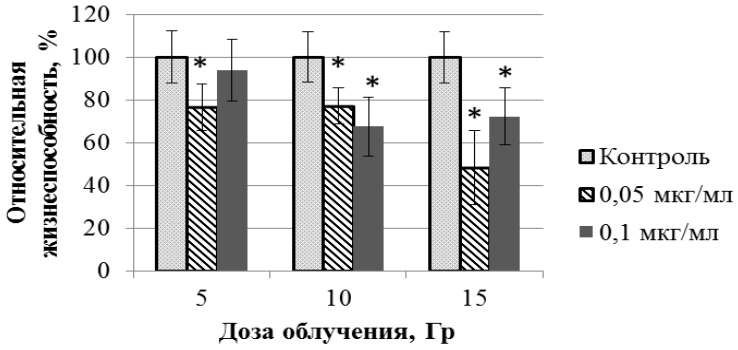


Рис. 3. Воздействие облучения 5 Гр на морфологию дермальных фибробластов при добавлении наночастиц CeO2, ув. 400: А) Без наночастиц CeO2; Б) 0,05 мкг/мл; В) 0,1 мкг/мл



*Примечание: * - различие с контролем достоверно (p<0,05)*

Рис. 4. Влияние облучения на жизнеспособность клеточной культуры HeLa после введения наночастиц CeO2

При облучении опухолевых клеток HeLa на фоне введения наночастиц CeO_2 наблюдается снижение их жизнеспособности, что говорит о радиосенсибилизации опухолевых клеток (рис. 4). Ядерно-цитоплазматическое отношение клеток HeLa при облучении увеличивается за счёт уменьшения площади цитоплазмы, при этом наблюдается фрагментация и пикноз ядер, свидетельствующие об апоптозе клеток (рис. 5).

Таким образом, в ходе эксперимента выявлены различия влияния наночастиц диоксида церия на морфофункциональное состояние нормальных и опухолевых клеток и их чувствительность к действию ионизирующего облучения. Наночастицы диоксида церия не влияют на жизнеспособность дермальных фибробластов человека, однако оказывают цитотоксический эффект в отношении клеточной культуры HeLa.

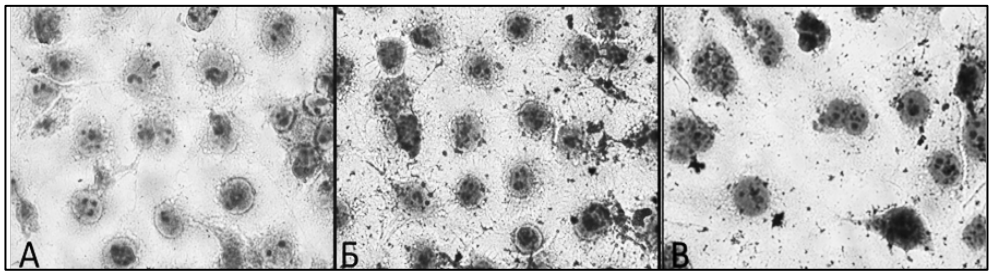


Рис. 5. Воздействие облучения 5 Гр на морфологию клеток HeLa при добавлении наночастиц CeO2, ув. 400: А) Без наночастиц CeO2; Б) 0,05 мкг/мл; В) 0,1 мкг/мл

Установлены особенности радиомодифицирующего действия наночастиц диоксида церия по отношению к нормальным и опухолевым клеткам. На фибробласты человека данные наночастицы оказали радиопротекторное действие, повысив их жизнеспособность после облучения и ускорив при этом дифференцировку фибробластов в более зрелые формы – фиброциты. Радиозащитные свойства могут быть следствием антиоксидантной активности частиц, которая позволяет инактивировать возникающие под действием ионизирующего облучения свободные радикалы и перекись водорода. На опухолевые клетки наночастицы CeO_2 действуют как радиосенсибилизаторы, поскольку в кислой среде клеток HeLa их антиоксидантная активность снижается, и процессы окисления усиливаются.

Уникальные ферментоподобные свойства наночастиц диоксида церия в сочетании с их низкой токсичностью позволяет найти им эффективное применение в радиотерапии. Дальнейшее исследование механизмов действия наночастиц диоксида церия на живые системы может дать толчок для развития новых эффективных способов лечения пациентов с различными онкологическими заболеваниями.

ЛИТЕРАТУРА

C. Michael, Joiner Albert van der Kogel, Basic clinical radibiology, 4th edition A Hodder Arnold Publication, 2009. P. 375. 12.

AshaRani P.V. et al. Approaches to safe nanotechnology. Managing the health and safety concerns associated with engineered nanomaterials // DHHS (NIOSH). 2009. № 125. – 104 p.

Зиганшин А.У., Зиганшина Л.Е. Наночастицы: фармакологические надежды и токсикологические проблемы // Казанский медицинский журнал. – 2008. – Т. 89, № 1. – С. 1–7.

Wason M.S., Zhao J. Cerium oxide nanoparticles: potential applications for cancer and other diseases // American journal of translational research. – 2013. – V. 5, № 2. – P. 126–131.

Colon J. et al. Protection from radiation-induced pneumonitis using cerium oxide nanoparticles // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. – 2009. – V. 5, № 2. – P. 225–231.

A.L. Popov et al. Radioprotective effects of ultra-small citrate-stabilized cerium oxide nanoparticles RSC Advances, 2016, 6, 106141–106149

C. Reuven, W.S. Stephen, McKeever, Theory of thermoluminescence and related phenomena, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 1997.

Милинчук В.К., Клиншпонт Э.Р., Тупиков В.И. Основы радиационной стойкости органических материалов. М.: Энергоатомиздат, 1994. С. 256.

T. Mosmann, J. Immunol. Meth., 1983, 65, 55.

УДК 615.45

ОСОБЕННОСТИ ФОРМОВОЧНОГО РАСТВОРА БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ ПОЛИМЕРОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ СИСТЕМ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

А.В. Черкас[1,2], Е.Б. Аронова[1], Е.Н. Бражникова[2]

[1] Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия
[2] ООО «Инмед, Санкт-Петербург, Россия

Электроформование – передовая технология, которая успешно применяется для производства волокон от нескольких нанометров до нескольких микрометров и предлагает множество преимуществ в новых системах доставки лекарственных веществ [1]. Высокое отношение поверхности к объему волокон может улучшить такие процессы, как связывание и пролиферация клеток, загрузка лекарств и массоперенос [2]. Одной из наиболее важных областей электроформования является область доставки активных веществ с контролируемым высвобождением, начиная от антибиотиков и противораковых агентов и заканчивая макромолекулами, такими как белки и ДНК [3]. Свойства электроформованных волокон можно контролировать, изменяя параметры процесса (например, приложенное напряжение, скорость потока раствора и расстояние между заряженным капилляром и электродом) или свойства раствора полимера (например, концентрацию, молекулярную массу, вязкость, поверхностное натяжение, летучесть растворителя, электропроводность и диэлектрическая проницаемость раствора полимера). Однако многие переменные, влияющие на процесс получения нановолокон, взаимозависимы. Оптимизированный процесс электроформования – это процесс, в котором данные параметры остаются постоянными и получаемые нановолокна соответствуют требуемым физико-химическим свойствам. Активную фармацевтическую субстанцию вводят в полимерные волокна путем смешивания, модификации поверхности или образования эмульсии [4].

В данном исследовании изучены свойства растворов сополимера L-лактида и ε-капролактона при разном соотношении компонентов и растворителей, подобраны оптимальные технологические условия получения нановолокон и проведена оценка электроформованного материала.

В работе использовали следующие реактивы: сополимер L-лактида и ε-капролактона производства PURAC (Нидерланды), метилен хлористый квалификации «ХЧ» (ЗАО «Экос-1, Москва) и пропиловый спирт квалификации «ИМП» (ЗАО «ВЕКТОН, Санкт-Петербург). Все реактивы использовали без дополнительной очистки и обработки. Процесс электроформования осуществляли на установке NS Line 1WS500U Series с подключенным климатическим модулем NS AC 150 (Чехия). Снимки СЭМ получали на приборе Phenom G2 pro (Нидерланды). Диаметр волокон измерялся при помощи программного обеспечения “FiberMetric” (Phenom-World, Нидерланды). Электропроводность определяли кондуктометром SevenMulti и датчиком электропроводности Mettler Toledo (Швейцария). Значения динамической вязкости получали ротационным реометром Anton Paar RheolabQC (Австрия) с использованием измерительной системы с двойным зазором DG42.

Важным параметром, определяющим интенсивность и производительность процесса электроформования, является концентрация перекрывания полимерных клубков [5–6]. Для определения этой величины была измерена зависимость динамической вязкости сополимера L-лактида и ε-капролактона от концентрации (рисунок 1). Изменение наклона кривой при концентрации равной 6,6 масс. % соответствует перекрыванию макромолекул. Следовательно, электроформование следует проводить при концентрациях сополимера выше 7 масс. %. Кроме этого, важно заметить, что зависимость вязкости от концентрации носит не линейный характер, а параболический и описывается следующим уравнением:

$$f(x) = 0,088x^2 - 1,242x + 4,473 \quad (1)$$

где x – концентрация, а f(x) – вязкость.

Погрешность полученных измерений составила 0,07.

Данные по электропроводности говорят о ее незначительном росте с увеличением содержания сополимера (рисунок 2), из чего следует, что при исследуемой рецептуре формовочного раствора показатель электропроводности не играет решающую роль.

Исследуя морфологию образцов электроформованного материала, полученных из формовочных растворов с одинаковой концентрацией сополимера L-лактида и ε-капролактона, при одинаковых технологических условиях, но при разном соотношении растворителей, была выявлена зависимость диаметра волокон от системы растворителей. При помощи программы FiberMetric установлено, что уменьшение содержания пропилового спирта в системе растворителей гарантирует уменьшение диаметра волокон. На рисунке 3 представлены микрофотографии электроформованных волокон в порядке уменьшения их диаметра.

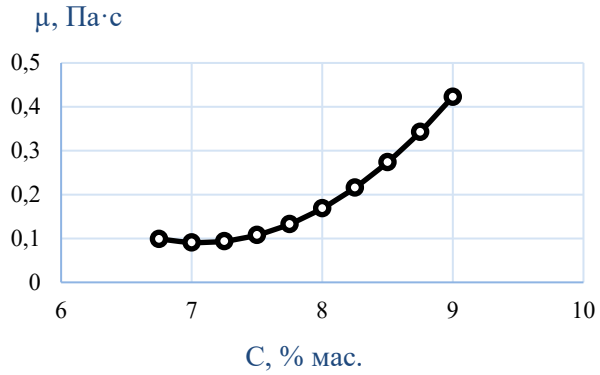


Рисунок 1 – Зависимость динамической вязкости формовочного раствора от концентрации сополимера L-лактида и ε-капролактона при 20 °С

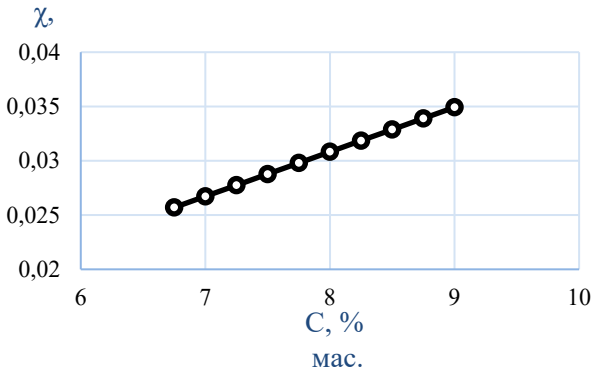


Рисунок 2 – Зависимость электропроводности от концентрации сополимера L-лактида и ε-капролактона при 20 °С

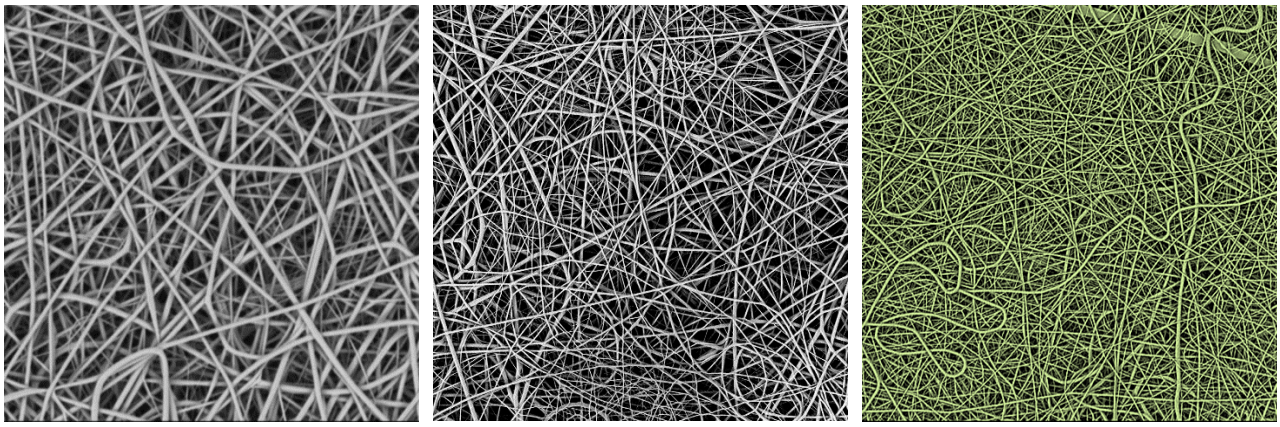


Рисунок 3 – Зависимость диаметра электроформованных волокон сополимера L-лактида и ε-капролактона от соотношения растворителей

Из совокупности имеющихся результатов можно заключить, что материал, отвечающий требованиям к функциональным свойствам системы доставки лекарственных веществ, можно получить из сополимера L-лактида и ε-капролактона, растворенного в хлористом метилене и пропиловом спирте. Рекомендуется добавлять активную фармацевтическую субстанцию и вести дальнейшую разработку лекарственных форм с раствором, в рецептуре которого содержится наименьшее количество пропилового спирта, при этом концентрация сухого вещества выше 7 %.

ЛИТЕРАТУРА

Матвеев А.Т., Афанасов И.М. Получение нановолокон методом электроформования. М.: Изд-во МГУ, 2010. 84 с.

Филатов Ю.Н. Электроформование волокнистых материалов (ЭФВ-процесс) / Под ред. В.Н. Кириченко. – М.: Под ред. профессора В.Н. Кириченко. – Москва, 2001. – 231 с.

Ramakrishna S. An introduction to electrospinning and nanofibers. / // New Jersey, London, Singapore, Beijing, Shanghai, Hong Kong, Taipei, Chennai: World Scientific. – 2005. – 384 p.

Anthony L. Science and technology of polymer nanofibers // New Jersey: A John Wiley & Sons, Inc. 2008. 404 p.

Shin Y.M., Hohman M.M., Brenner M.P., Rutledge G.C. Experimental Characterization of Electrospinning: The Electrically Forced Jet and Instabilities // Polym. – 2001. – V. 42. P. 9955–9967.

Kebarle P., Peschke M. On the mechanisms by which the charged droplets produced by electrospray lead to gas phase ions. // Analytica Chim. Acta. – 2000. – V. 406. P. 11–35.

УДК 57.043: 615.32: 615.244

ДИНАМИКИ УДАЛЕНИЯ ВОДЫ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СБОРА ЖЕЛЧЕГОННОГО ДЕЙСТВИЯ ПРИ ИНФРАКРАСНОМ ОБЛУЧЕНИИ ПРИ 105° С

В.Н. Зеленков[1,2], А.А. Лапин[3], Е.В. Ферубко[1], Т.Д. Даргаева[1]

Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, Москва, Россия

[2] Всероссийский научно-исследовательский институт овощеводства – филиал Федеральный научный центр овощеводства, Московская область, Россия

[4] Казанский энергетический университет, Казань, Россия

Применение лекарственных растений имеет широкие перспективы использования особенно в комплексном лечении заболеваний гепатобилиарной системы, так как они обладают низкой токсичностью, мягкостью действия и редким возникновением аллергических реакций [1, 2]. Нами разработан состав желчегонного средства: цветки бессмертника песчаного (Helichrysum arenarium L.), цветки пижмы обыкновенной (Tanacetum vulgare L.), плоды шиповника (Rosa sp.), листья крапивы двудомной (Urtica dioica L.), листья мяты (Mentha piperita L.), корни солодки (Glycyrrhiza glabra L.).

Настительные сборы характеризуются конечными показателями по остаточной влажности, которые являются статическими показателями качества при стандартизации при высушивании исходных компонентов. Конечная остаточная влажность в соответствии с XIV изд. Государственной Фармакопее Российской федерации не должна превышать 13 % [3]. Изучение закономерностей изменения остаточной влажности в процессе последующего досушивания сборов, вплоть до практически до абсолютно сухого образца, на наш взгляд, позволяет в динамике оценить закономерности взаимосвязи воды со специфичностью химического состава лекарственного сбора, несмотря на всю его многокомпонентность.

Цель данной работы – изучение особенностей обезвоживания растительного сбора желчегонного действия при инфракрасном облучении при 105° С.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследований использовали сбор для лечения заболеваний гепатобилиарной системы следующего состава: цветки бессмертника песчаного – 300 г., цветки пижмы обыкновенной – 100 г., плоды шиповника – 100 г., листья крапивы двудомной – 100 г., листья мяты – 50 г., корни солодки – 50 г. и входящие в него растения. Исходное сырье измельчали и смешивали в кофемолке с последующим просевом через сито диаметром 1–2 мм. Для анализа брали пробы по 2,5 г. Растения взяты из биологической коллекции ФГБНУ ВИЛАР.

Динамики обезвоживания получали, определяя массу образцов во времени сушки при непрерывном взвешивании на анализаторе влажности MX-50 (A&D Company, Япония). Сушку проводили при 105ºС с использованием инфракрасного излучателя. Проведение эксперимента после начала сушки проводили в контролируемом режиме с использованием автоматической записи данных по остаточной влажности образцов (с временным шагом в 10 сек) на компьютере, с последующей их обработкой. В построении графиков изменения остаточной влажности во времени использовали до 50 экспериментальных измерений. Исходное сырье измельчали и смешивали в кофемолке с последующим просевом через сито диаметром 1–2 мм. Для анализа брали пробы по 2,5 г.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 приведена динамика сушки при 105ºС сбора желчегонного действия. Кривую обезвоживания можно описать логарифмической зависимостью остаточной влажности от времени обезвоживания, что апроксимируется с достоверностью 0,9826, т. е. с высокой надежностью. Однако, это не дает понимание сущности процесса удаления воды, поскольку сглаживание участков кривой при удалении воды, по-разному связанной с исследуемым материалом, сглаживает и переход от одного временного участка удаления воды с определенным значением энергии связи с химическими компонентами и порошкообразной структурой материала образца к другому участку, с другим энергетическим уровнем взаимодействия воды с другими химическими компонентами в структуре порошкообразного образца. Наши исследования по изучению динамик обезвоживания растительных образцов различной природы, показали [3. 4], что кривые обезвоживания можно описать 4-мя прямолинейными участками и уравнениями линейной регрессии с высокой степенью апроксимации.

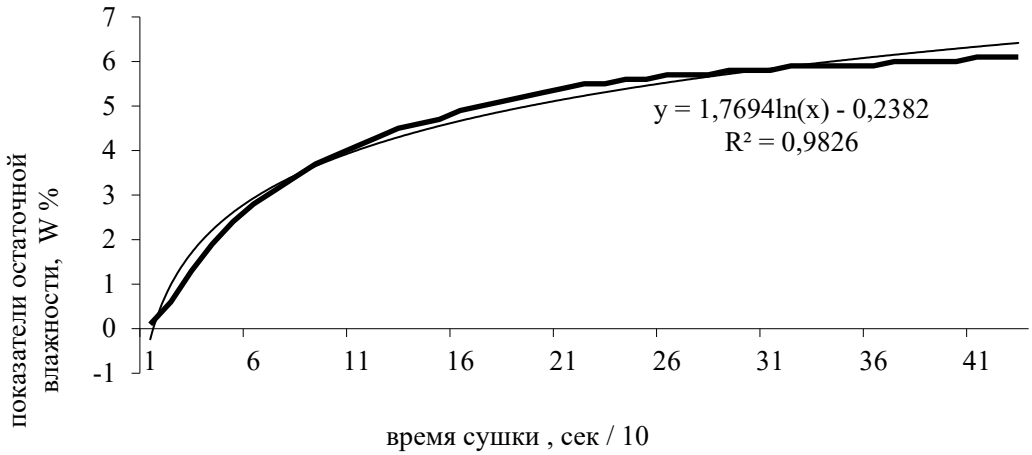


Рисунок 1 – Динамика ИК-сушки лекарственного сбора желчегонного действия при 105 °С

Анализ кривой обезвоживания исследуемого растительного сбора желчегонного действия позволил также выделить 4 линейных участка на приведенной кривой, переходы между которыми являются переходами от одного энергетического уровня удаления воды к другим уровням, более высоким по энергии связей воды в структуре и физико-химической сущности исследуемого растительного материала (рис. 2). Каждый участок со 2-го по 4-й извлечен из кривой обезвоживания для удобства анализа и сравнения с единым отсчетом времени начиная от нулевой точки оси ординат.

Наклон каждого участка соответствует тангенсу угла наклона участка с временной осью ординат и в уравнении линейной регрессии соответствует коэффициенту а первого члена уравнения.

Как видно из рис. 2 наблюдается высокая достоверность апроксимации результатов обезвоживания 4-мя линейными участками с соответствующими уравнениями линейной регрессии, характеризующими скорости обезвоживания на каждом участке (тангенс угла наклона линейного участка к оси времени) и достоверность соответствия этой модели экспериментальным данным.

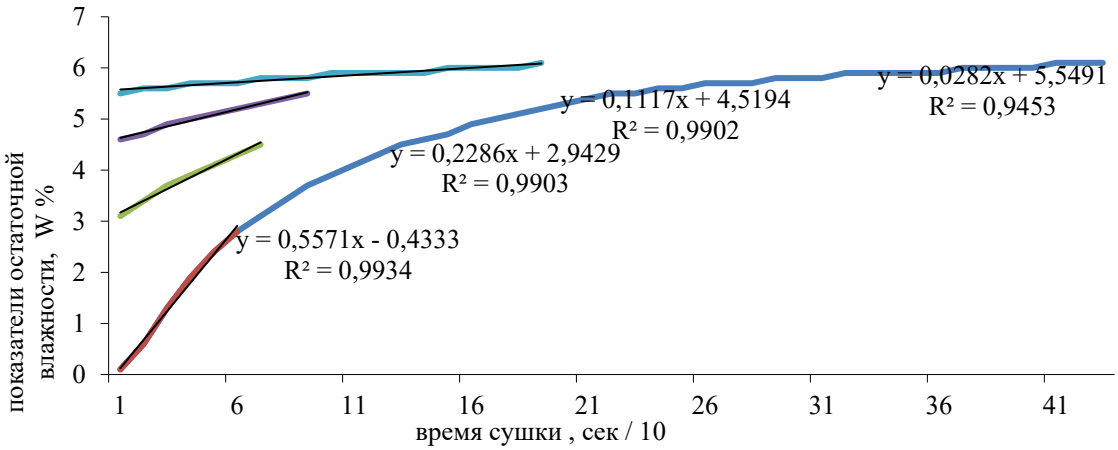


Рисунок 2 – Динамика ИК-сушки при 105° С лекарственного сбора желчегонного действия с разбивкой кривой на 4 прямолинейных участка

Для первого, второго и третьего участков сушки достоверность апроксимации экспериментальных результатов уравнениями линейной регрессии составила 0,9934, 0,9903, 0,9902, соответственно, а для 4-го участка – 0,9453. Снижение достоверности для 4-го участка обезвоживания, вероятно, связано с тем, что несмотря на длительность времени нахождения образца при 105° С, недостаточно подведенной энергии для полного и абсолютного удаления воды из образца по причине ее сильного химического взаимодействия с молекулами некоторых химических соединений в которых молекулы воды образуют прочные химические связи и входят в состав структур химических соединений, например моносахаров и органических кислот, для которых требуются температуры более 105° С для полного удаления воды.

Количественные характеристики динамики обезвоживания растительного сбора можно отобразить диаграммой их влагосодержания и скоростей обезвоживания (рис. 3, 4) на основе расчетов по линейным участкам удаления воды.

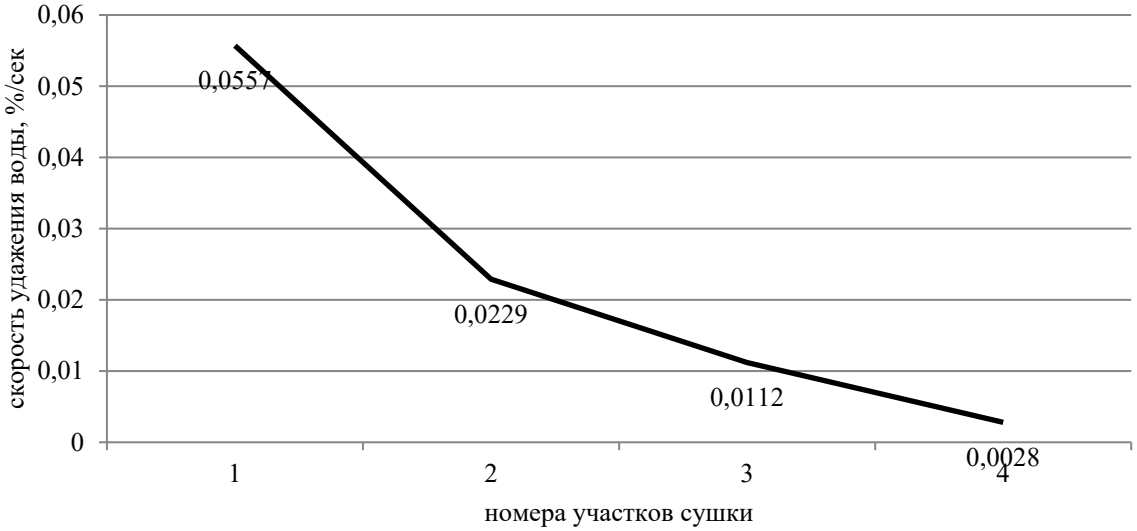


Рисунок 3 – Диаграмма скоростей удаления воды по участкам ИК-сушки лекарственного сбора желчегонного действия при 105° С

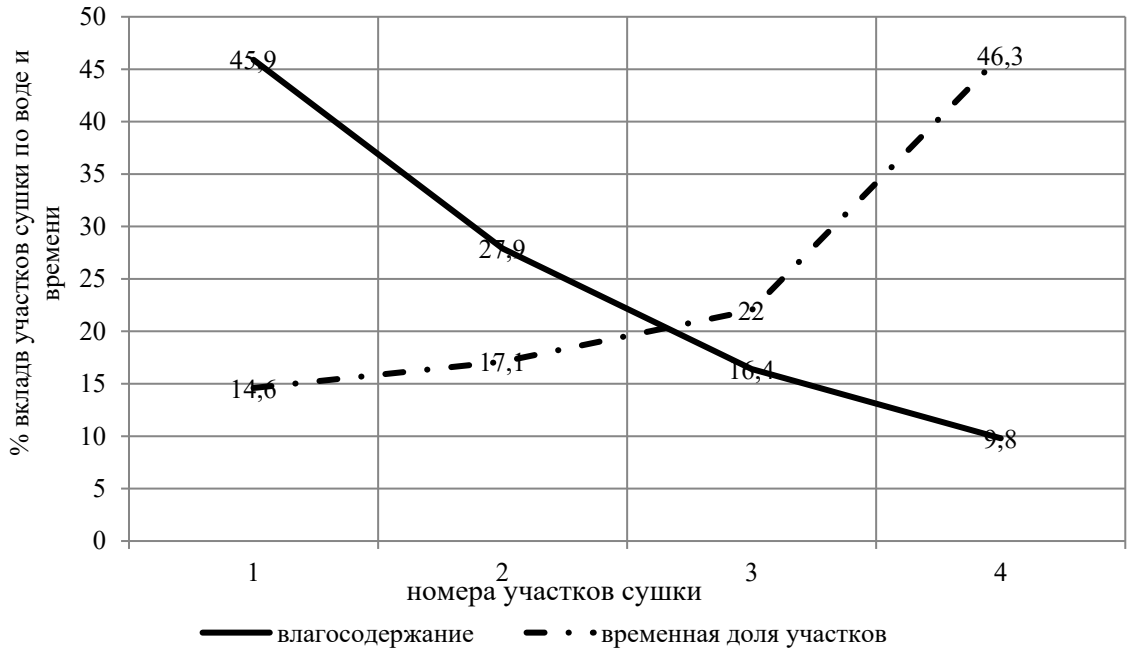


Рисунок 4 – Диаграммы значений влагосодержания и долевого вклада в сушку по времени удаления воды для 4-х участков ИК-сушки лекарственного сбора при 105° С

Под влагосодержанием будем понимать процент содержания воды, характерным для каждого участка обезвоживания относительно общего содержания воды и выраженного в процентах. В зависимости от энергии взаимодействия молекул воды с химическими компонентами в структуре порошкообразной формы образца линейности участков являются следствием наличия 4-х видов ее взаимодействия с химическими компонентами составляющими основу растительного сбора. На первом этапе удаления воды происходит ее переход в парообразное состояние. Это начальный период

сушки с преимущественно удалением свободной воды (слабосвязанной с химическими компонентами и структурой частиц образца). И в начале сушки мы наблюдаем небольшой (по времени сушки) участок обезвоживания с высокой начальной скоростью 0,056 % / сек с временным интервалом в 14,6 % от всего периода сушки при влагосодержании в 45,9 % от общего количества удаленной воды. Для простоты дальнейшего описания назовем это фракцией 1, соответствующей участку динамики сушки для участка 1. Далее идет обезвоживание через структуру порошкообразной композиции растительного сбора связанной воды фракции 2 с постоянной скоростью процесса удаления молекул воды 0,023 %/сек., содержание которой в образце составляет 27,9 % и долей по времени обезвоживания 17,1 %. Это обезвоживание по второму механизму, что характерно для второго линейного участка в графическом описании динамики процесса. После удаления молекул воды этого уровня энергетики, наблюдается выход на 3-й участок обезвоживания со снижением скорости до 0,0112 % / сек, что характерно для воды фракции 3 в динамике обезвоживания, составляющей по влагосодержанию и времени обезвоживания 16,4 % и 22,0 %, соответственно.

Переход к 4-му участку характеризуется реализацией процесса удаления воды с высоким энергетическим взаимодействием и характерен для воды фракции 4. Этот участок имеет самую низкую скорость удаления воды – 0,0028 % / сек, что меньше скоростей относительно 1-го, 2-го и 3-го участков в 20,4, 8,2 и 3,9 раза, соответственно.

Выделение в динамике обезвоживания растительного сбора желчегонного действия 4-х фракций воды на основе анализа 4-х линейных участков, по мнению авторов, позволит в дальнейшем связать эти фракции воды с химическими компонентами, составляющими конкретный лекарственный сбор. Один из путей реализации этого подхода является введение в эксперимент химических соединений – маркеров и экспериментальным определением их динамик сушки.

ВЫВОДЫ

Таким образом, обработка экспериментального материала динамики сушки по предложенному алгоритму позволяет определить характерный профиль энергетики различного уровня взаимодействия удаляемой воды при ИК-энергоподводе для конкретного растительного сбора с получением его количественной характеризации по скоростям удаления воды, влагосодержанию по каждому участку скоростей и вклада времени сушки по каждому участку относительно всего периода обезвоживания. Это, возможно, позволит количественно характеризовать образцы растительных сборов в зависимости от их составляющих компонентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лекарственные растения, возделываемые в России/ И.Д. Семенихин, В.И. Семенихин. – М, 2013, 240 С.

2. Лекарственные средства из растений (опыт ВИЛАР): научное издание/ С.А. Вичканова, В.К. Колхир, Т.А. Сокольская, И.В. Воскобойникова, В.А. Быков. – М.6 АДРИС, 2009. – 432 с.

3. Государственная Фармакопея Российской федерации XIV изд. – М., 2018. Режим доступа: https://pharmacopoeia.ru/gosudarstvennaya-farmakopeya-14-izdaniya/

4. Зеленков В.Н., Лапин А.А., Поляков А.В. Особенности динамики обезвоживания разных сортов чеснока отечественной и зарубежной селекции при инфракрасной сушке. Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты: Сборник научных трудов. Выпуск 23 – М.: РАЕН, 2016. С. 109–115.

5. В.Н. Зеленков, Е.В., Ферубко, Т.Д. Даргаева. Анализ динамик удаления воды из растительного сбора гепатопротективного действия при инфракрасном излучении при досушивании образцов. / Сборник трудов II Международной научной конференции «Роль метаболомики в совершенствовании биотехнологических средств производства». – М.: ВИЛАР, 2019. С. 267–273.

УДК 579:576.6

ПОВЫШЕНИЕ АКТИВНОСТИ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА ПУТЕМ ПРОВЕДЕНИЯ ИНДУЦИРОВАННОГО УФ-МУТАГЕНЕЗА

А.Х. Хасенова[1], М.А. Акылова[2], З.Ж. Турлыбаева[1], Р.Ш. Галимбаева[1], А.Ж. Султанова[1]

[1] ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, г. Алматы, Казахстан
[2] АО «Центральная клиническая больница» Казахстан, Алматы

Одновременно с расширением области применения антибиотиков увеличилось число патогенных штаммов микроорганизмов, проявляющих устойчивость к одному или нескольким антибиотикам. Такие инфекции труднее лечить, повышается уровень заболеваемости и смертности, увеличивается длительность госпитализации [1–4]. Наиболее оптимальным решением проблемы резистентности является изыскание новых биологически активных веществ среди вторичных метаболитов микробного происхождения. Для повышения продуктивности штаммов применяют мутагенез с последующим скринингом и отбором вариантов с лучшими антимикробными параметрами [5–7].

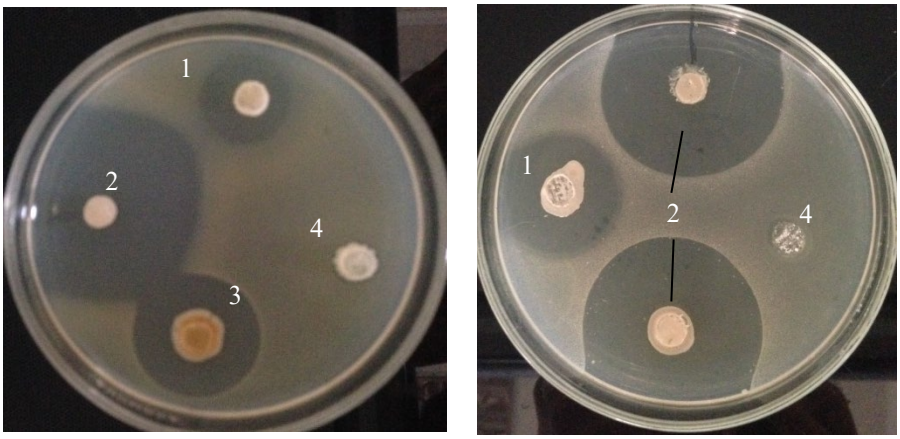
Из образцов ризосферы растения синеголовник (Eryngium planum) выделено в чистую культуру 78 колоний актиномицетов и изучены их антагонистические свойства в отношении лабораторных коллекционных штаммов: грамположительных (Bacillus subtilis ATCC 6633) и грамотрицательных (Comamonas terrigena ATCC 8461) тест-микроорганизмов методом агаровых блоков. Инкубирование бактериальных тестов проводили при температуре 37 °С в течение 24 часов. Результат учитывали по величине диаметра зоны подавления роста вокруг агаровых блоков. Наибольший интерес представил изолят С32 с широким спектром действия: зона подавления роста Bacillus subtilis ATCC 6633 составила 30 мм, тест-культуры Comamonas terrigena ATCC 8461 – 28 мм.

Проведена селекция штамма методом физического мутагенеза (УФ-облучение) по методу Дж. Миллера [8]. Для проведения мутагенеза мицелий 5–7-дневной культуры смывали с поверхности агаризованной среды стерильной водой и фильтровали через ватный фильтр для отделения крупных конгломератов мицелия. Затем суспензию фильтровали через стеклянный фильтр (размер пор-100 мкм). Суспензию спор (10^6) асептично разливали по 5 мл в стерильные чашки Петри и устанавливали под ультрафиолетовой лампой на расстоянии 15 см. УФ-источником излучения служила бактерицидная лампа типа TUV30W LL, (BTA 30L31 Philips).

Облучение суспензии спор проводили в течение 5–240 секунд при постоянном перемешивании, после чего чашки выдерживали в темноте в течение 2 ч во избежание фотореактивации. После проведения индуцированного ненаправленного мутагенеза, отобранные пробы разводили так, чтобы на чашках Петри с агаризованными средами после их высева не образовывалось более 100 колоний. На чашки Петри с картофельным агаром наносили по 0,1 мл и равномерно распределяли по всей поверхности агара. Чашки инкубировали в течение 7–10 суток при температуре 28°±1° С в изолированном от света месте. В качестве контроля использовали необлученную суспензию. Степень выживаемости определяли, как отношение числа выросших колоний после проведения мутагенеза, к количеству колоний до его проведения.

Частоту проявления мутаций определяли, как отношение числа колоний с изменённой морфологией (по сравнению с морфологией контрольных колоний), к числу колоний, не изменивших свою морфологию. В результате проведенных экспериментов обнаружено 4 различных морфологических формы колоний, отличающихся друг от друга не только скоростью роста, но и различной пигментацией и наличием воздушного мицелия. Все виды возникающих морфологических форм протестированы на антагонистическую активность методом агаровых блоков в отношении Staphylococcus aureus 209 P и E.coli (рисунок 1).

Установлено, что активность большинства полученных вариантов соответствует активности контроля. Наименьшая активность минус-варианта составила 75 % от активности контроля. Колонии со скудным воздушным мицелием не проявили антагонистической активности (рисунок 1, вариант 4). При УФ-облучении в течение 240 секунд выделен активный клон, превышающий активность родительского штамма в 2–2,5 раза (рисунок 1, вариант 2).



S. aureus 209 P *E.coli*

Рисунок 1 – Антибиотическая активность клонов изолята С32. 1-родительский штамм; 2–4 мутантные штаммы после УФ облучения (240 сек)

В результате проведенных исследований получен новый продуцент антибиотика широкого спектра действия СМ 32, перспективный для дальнейших исследований, с целью получения нового природного антибиотика для медицины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Журавков Ю.Л., Королева А.А., Станишевский А.Л. Проблема антибиотикотерапии резистентных инфекций на современном этапе // Военная медицина. – 2013. – № 2. – С. 110–119.

2. Таточенко В.К. Резистентность к антибиотикам и как ее преодолеть // Педиатрическая фармакология. 2017. Т. 14, № 6. С. 514–519.

3. Shallcross L.J., Davies S.C. The World Health Assembly resolution on antimicrobial resistance //J Antimicrob Chemother. – 2014. – V. 69, № 11. – P. 2883–2885.

4. Livermore D.M. Fourteen years in resistance //Int J Antimicrob Agents. 2012. V. 39, № 4. P. 283–294.

5. Яковлева М.Б., Никитина З.К. Скрининг-методы в биотехнологии. Выявление микроорганизмов-продуцентов биологически активных веществ // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2016. – № 5. – С. 35–43.

6. Baltz R.H. Spontaneous and induced mutations to rifampicin, streptomycin and spectinomycin resistances in actinomycetes: mutagenic mechanisms and applications for strain improvement //J Antibiot (Tokyo). 2014. V.67, № 9. P. 619–624.

7. Adepu K. Kumar. UV mutagenesis treatment for improved production of endoglucanase and β-glucosidase from newly isolated thermotolerant actinomycetes, Streptomyces griseoaurantiacus // Bioresources and Bioprocessing. – 2015. – № 2. – P.22

8. Миллер, Дж. Эксперименты в молекулярной генетике // Дж. Миллер. – М.: Мир. 1976. – 440 с.

УДК 57.042

ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРЫС ЛИНИИ ВИСТАР В УСЛОВИЯХ ПОСТОЯННОГО ОСВЕЩЕНИЯ

В.С. Каплан, А.А. Грицюнайте, К.А. Сахнова, Е.А. Шмигельский, Л.С. Макарцева, С.А. Кучер, Д.А. Арешидзе

Научно-исследовательская лаборатория экспериментальной биологии и биотехнологиии НОЦ МГОУ в г. Черноголовка, Мытищи, Россия

Условия постоянного освещения являются сильным стрессорным фактором [8]. Активизация коры надпочечников как одного из центров стрессовых реакций сопровождается многочисленными изменениями в составе крови: увеличением количества лейкоцитов, эритроцитов, как следствие, повышением гемоглобина, но недостаточной насыщенности эритроцитов гемоглобином, повышением вязкость крови [2]. Также в результате постоянного освещения происходят изменение активности секреции мелатонина, что нарушает процессы пролиферации, дифференцировки, миграции, кооперации иммунокомпетентных клеток, тем самым также приводя к отклонению гематологических параметров [5].

Исследование количественного и качественного состава клеточных элементов системы крови чрезвычайно важно, так как выявляемые в ее морфологической картине изменения являются индикаторами нарушений в системах обеспечения кроветворения и функционирования форменных элементов крови. Система крови отражает состояние организма, является одной из быстро реагирующих систем на физиологические отклонения тканей, а ее параметры служат интегральным показателем его адаптивных возможностей [7].

В связи с вышеизложенным, нам представлялось актуальным изучение особенностей гематологических показателей периферической крови 6-месячных самцов крыс линии Wistar в условиях фиксированного светового режима и постоянного освещения.

Эксперимент проводился на 2 группах 6-месячных самцов крыс линии Wistar. Первая группа содержалась при фиксированном световом режиме (СТ 10: 14) – 30 крыс. Вторая группа содержалась при постоянном световом режиме (СС) – 27 крыс. Исследуемые показатели определяли методом временных серийных срезов [3] через каждые шесть часов: в 9, 15, 21, 3.

Общее клиническое исследование проб цельной крови проводили на полностью автоматическом гематологическом анализаторе Abacus Junior 30, используя наборы реактивов компании «Diatron». В крови животных определяли 18 показателей.

Статистический анализ полученных данных проводился с помощью GraphPad Prism 8.0. Полученные значения были выражены как Mean ± SD. Статистическую различия между полученными данными определяли с использованием t-критерия Стьюдента. Значение $p < 0,05$ было принято как статистически значимое.

По результатам анализов установлено, что достоверные изменения были отмечены для 10 исследованных параметров клеточного состава и характеристик клеток крови: HCT (%) – гематокрит (отношение объема всех клеток крови к объему плазмы), GRA (10^9л) – количество гранулоцитов, BAND NEUT (%) – относительное количество палочкоядерных нейтрофилов, LYMPH (%) – относительное количество лимфоцитов, MONO (%) – относительное количество моноцитов, RBC (10^{12} Л) – количество эритроцитов, MCHC (г/ л) – отношение уровня гемоглобина в эритроците к объему эритроцита, MPV (фл) – средний объем тромбоцита, PDWc (%) – широта распределения популяции тромбоцитов, P-LCR (%) – коэффициент больших тромбоцитов.

Значения гематокрита повысились с 51,13 ± 1,93 % в первой группе, до 53,36 ± 1,95 % во второй группе (рис. 1).

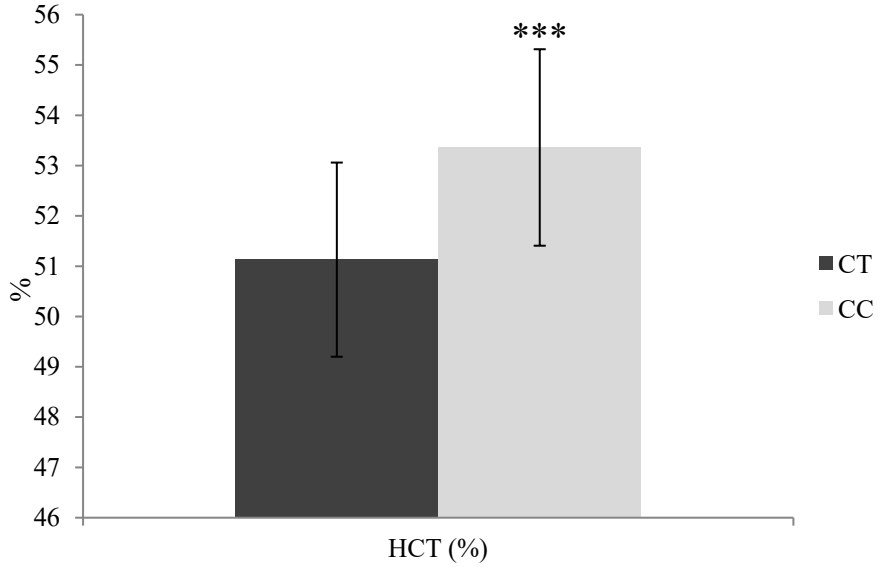
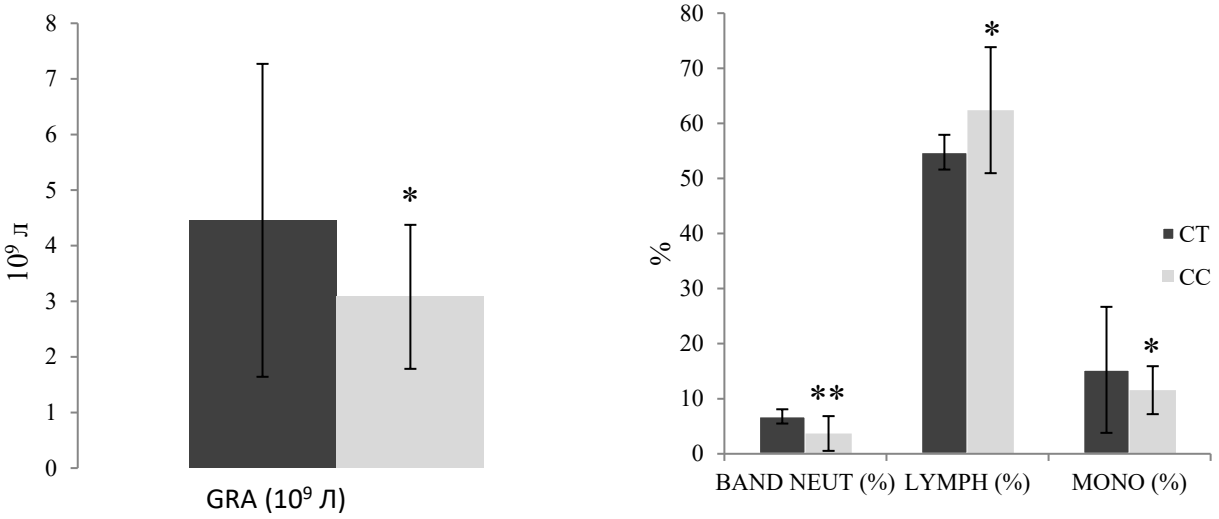


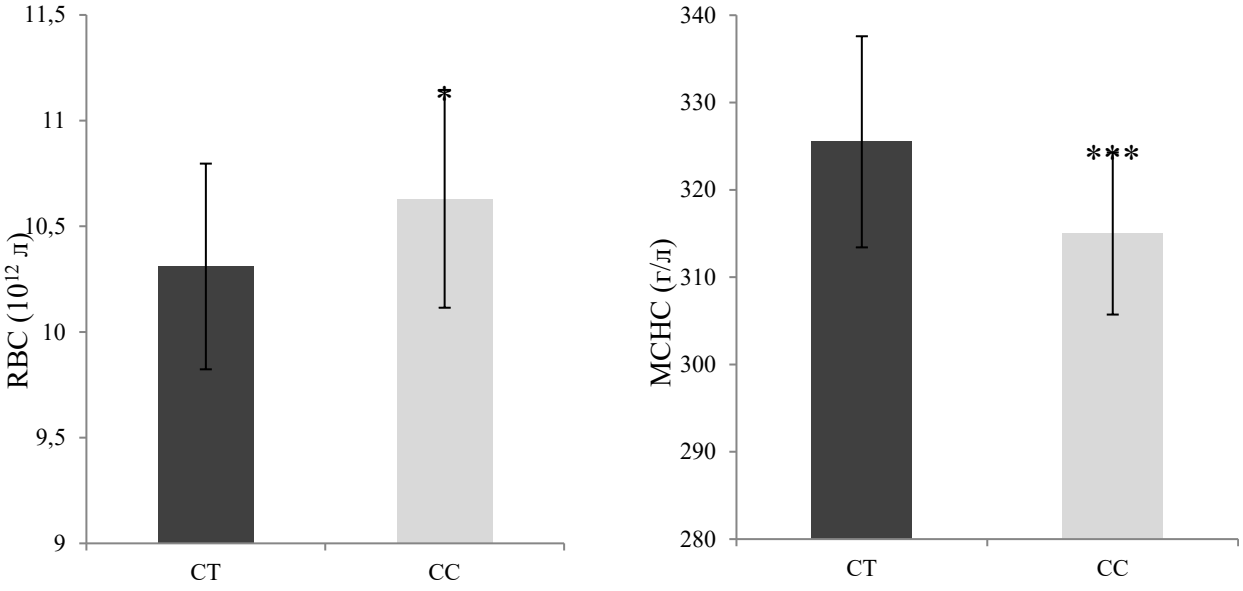
Рис. 1. Гематокрит (HCT (%))при фиксированном световом режиме (СТ) и при постоянном световом режиме (СС). Здесь и далее: достоверность отличий показателей при постоянном световом режиме от показателей при фиксированном режиме освежения (* – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,005$; *** – $p \leq 0,0005$)

Из моноцитарного, лимфоцитарного, гранулоцитарного ростков изменениям подверглись GRA, BAND NEUT, LYMPH, MONO. Количество гранулоцитов понизилось с 4,46 ± 2,81 10^9л в первой группе до 3,08 ± 1,30 10^9л во второй группе; относительное количество гранулоцитов понизилось с 6,79 ± 3,60 до 3,68 ± 3,16 %; относительное количество лимфоцитов повысилось с 54,76 ± 14,20 % до 62,39 ± 11,44 %; относительное количество моноцитов понизилось с 15,24 ± 6,28 % до 11,55 ± 4,35 %. (рис. 2). Из эритроидного ростка изменениям подверглись RBC, MCHC. Количество красных кровеносных телец увеличилось с 10,31 ± 0,48 до 10,63 ± 0,51 10^{12} л; отношение уровня гемоглобина в эритроците к объему эритроцита упало с 325,50 ± 12,09 г./л до 315,0 ± 9,28 г./л. (рис. 3)



(а) (б)

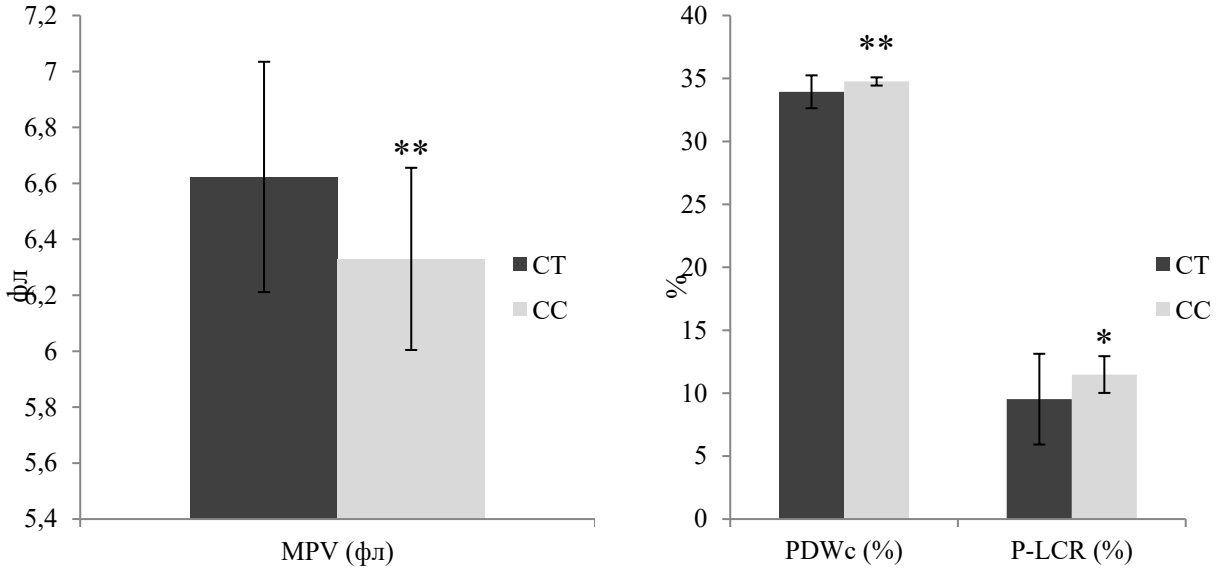
Рис. 2. Общее количество гранулоцитов (GRA (10^9 Л)) (а); относительное количество палочкоядерных нейтрофилов (BAND NEUT (%)), лимфоцитов (LYMPH (%)), моноцитов (MONO (%)) (б) при фиксированном световом режиме (CT) и при постоянном световом режиме (CC)



(а) (б)

Рис. 3. Общее количество эритроцитов (А) (RBC (10^{12}л)) и отношение уровня гемоглобина в эритроците к объему (Б) (MCHC (г/л)) при фиксированном световом режиме (CT) и при постоянном световом режиме (CC)

Из мегакариоцитарного ростка изменениям подверглись MPV, PDWc, P-LCR. Средний объем тромбоцита снизился с 6,62 ± 0,41 фл до 6,33 ± 0,33 фл; широта распределения популяции тромбоцитов снизилась с 34,76 ± 1,31 % до 33,94 ± 1,46 %; коэффициент больших тромбоцитов снизился с 11,48 ± 3,60 % до 9,53 ± 2,61 %. (рис. 4)



(а) (б)

Рис. 4. Средний объем тромбоцита (MPV (фл)) (а); широта распределения популяции тромбоцитов (PDWc (%)), коэффициент больших тромбоцитов (P-LCR (%)) (б) при фиксированном световом режиме (CT) и при постоянном световом режиме (CC)

Результаты наших исследований показывают, что 10 показателей периферической крови из 18 подверглись достоверному отклонению под воздействием стресса, который представлен сильным нарушением светового режима.

Как известно из литературных источников, в условиях стресса гематокрит повышен в сравнении с нормой [6]. Также достоверно отклоняются параметры эритроцитов, повышается общее количество эритроцитов, и значительно понижается отношение уровня гемоглобина в эритроците к объему эритроцита. Снижение отношение гемоглобина к объему эритроцита – это компенсаторная реакция вызванная увеличением общего количества эритроцитов. Таким образом, повышается кислородтранспортная функция крови.

Достоверные отклонения в параметрах клеток мегакариоцитного ростка периферической крови выражено уменьшением среднего объема тромбоцита и процентным увеличением широты распределения популяции тромбоцитов и коэффициента больших тромбоцитов. Увеличение широты распределения тромбоцитов, коэффициента больших тромбоцитов, уменьшение среднего объема тромбоцита говорит о повышении скорости свертывания крови [1] в стрессовых условиях.

Установлено, что у группы лабораторных животных при постоянном световом режиме в периферической крови в сравнении с группой при фиксированном световом режиме достоверно отклоняются параметры лейкоцитов. Повышается относительное количество лимфоцитов, снижается относительное количество палочкоядерных нейтрофилов, моноцитов и снижается общее количество гранулоцитов. Разнонаправленные изменения количественного состава лейкоцитов в крови могут быть связаны с угнетением пролиферации и дифференцировки клеток лимфоидного ряда в тимусе и в селезенке [4].

ЛИТЕРАТУРА

1. Дорн О.Ю., Цикаленко Е.А., Степанова Е.Г., Паламарчук М.В., Вохминцева Л.В. Показатель PLCC как лабораторный маркер активации тромбоцитарного гемостаза у больных ишемической болезнью сердца // Journal of Siberian Medical Sciences. 2015. № 1. – С.22
2. Ежов С.Н. Основные концепции биоритмологии // Вестник ТГЭУ. 2008. № 2, С.104–121
3. Макарцева Л.А. и др. Особенности суточной ритмичности некоторых физиологических параметров самцов крыс линии вистар в разные периоды онтогенеза // EurasiaScience: Сборник статей XXI международной научно-практической конференции Москва: «Научно-издательский центр «Актуальность. РФ», 2019. – С. 23–24
4. Осиков М.В., Гизингер О.А., Огнева О.И. Механизм влияния мелатонина на иммунный статус при экспериментальном десинхронозе в условиях светодиодного освещения // Медицинская иммунология. 2015. № 6. – С. 517–524
5. Осиков М.В., Огнева О.И., Платковский П.О. Влияние мелатонина на поведенческую активность животных при десинхронозе в условиях люминесцентного освещения // Здоровье и образование в XXI веке. 2014. № 4. С. 267–270.
6. Сотникова Е.Д. Изменения в системе крови при стрессе // Вестник РУДН. Серия: Агрономия и животноводство. 2009. № 1. – С. 50–54
7. Юшкова Л.Н. Влияние гипо- и гиперпаратиреоза на особенности организации циркадианных ритмов состава периферической крови и красного костного мозга в процессе адаптации к изменению режима освещения: экспериментальное исследование: Дис… канд. биол. наук. Ставрополь, 2009. 143 с
8. Areshidze D.A., Kozlova M.A., Kuznetsova I.A., Makartseva L.A. The Influence of Experimental Hypercalcemia on the Organization of Circadian Rhythms of Rectal Temperature, Some Metabolites and Red Blood Indices. // Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. – 2018. – № 1. – V – 3. – P. 583–591

УДК 328

БИОСИНТЕЗ ПОЛИГИДРОКСИБУТИРАТА НА ГЛИЦЕРИНЕ DELFTIA SP. LP-1

Е.Н. Капаруллина, Н.В. Агафонова, Н.В. Доронина

Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Пущино, Россия

Полигидроксибутират (ПГБ) – термопластичный, биоразлагаемый и биосовместимый полимер, потенциальные сферы применения которого включают биомедицину, пищевую и косметическую промышленность, упаковку и сельское хозяйство. Накопление ПГБ широко распространено среди микроорганизмов, к продуцентам ПГБ относятся представители родов Cupriavidus (Ralstonia), Pseudomonas, Bacillus, Allochromatium, Aeromonas и др. и в том числе многие метилотрофы (Methylorubrum, Methyloligella) на различных источниках углерода и энергии (Волова, Шишацкая, 2011; Порошина с соавт., 2014; Доронина с соавт., 2015). Известно, что представители рода Delftia также способны к синтезу ПГБ (Tsuge et al., 2004; Chen et al., 2012).

Большой научно-практический интерес представляет синтез биодеградабельных и биосовместимых пластиков из дешевого непищевого сырья и отходов агрокомплексов и различных производств, в том числе биодизеля, побочным продуктом которого является глицерин в высоких концентрациях в смеси с C_1-субстратами. Глицерин перспективен в качестве субстрата для биосинтеза биопластиков и поиск микроорганизмов-продуцентов биополимеров на этом субстрате весьма актуален.

Цель данной работы – определение молекулярной массы образцов ПГБ при культивировании штамма Delftia sp. Lp-1 на минеральной среде с глицерином и молекулярно-генетический анализ фрагмента гена phaC.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование и анализ ПГБ. Из клубеньков люпина Lupinus polyphyllus L. на среде с метанолом нами выделен новый штамм Delftia sp. Lp-1 (ВКМ В-3039), являющийся фитосимбионтом и обладающий широким спектром механизмов стимуляции роста различных растений (Агафонова с соавт., 2017). Изолят является факультативным метилотрофом, способен расти на ряде С1-, полиуглеродных субстратах и глицерине. Штамм Delftia sp. Lp-1 выращивали на простой минеральной

среде «К» (г/л: KH_2PO_4 – 2.0; $(NH_4)_2SO_4$ – 2.0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.025; NaCl – 0.5; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.002; $H_2O_{дист.}$ – 1 л) в колбах Эрленмейера объемом 750 мл с 200 мл среды и 0.2 % глицерина при 29 ºС на роторной качалке (180 об/мин) в течение 3–5 сут. pH среды в процессе культивирования поддерживали добавлением 10 % NaOH. Содержание биомассы определяли, измеряя оптическую плотность $ОП_{600}$ в 0.5 см кювете на спектрофотометре Specol 221 (Германия) и пересчитывали на вес сухой биомассы по калибровочной кривой. Выделение ПГБ из биомассы проводили как описано ранее (Ежов с соавт., 2013). Молекулярную массу (Мм) полимеров определяли вискозиметрическим методом, измеряя вязкость раствора ПГБ в хлороформе при 30 °С (Мышкина с соавт., 2010).

Выделение и анализ ДНК. ДНК выделяли с использованием набора ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep (“Zymo Research”, США) в соответствии с рекомендациями фирмы – производителя. Фрагмент гена phaC (550 п.н.), кодирующего полигидроксибутират синтазу, амплифицировали, используя праймеры, согласно ранее описанному протоколу (Замахаева с соавт., 2016). Продукты реакции разделяли методом электрофореза в 1 %-ном агарозном геле. Выделение и очистку фрагментов ДНК из легкоплавкой агарозы проводили на колонках с использованием набора Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (“Zymo Research”, США), согласно инструкции фирмы-производителя. Секвенирование ПЦР-фрагментов проводили с помощью набора реактивов CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing kit (“Beckman Coulter”, США) на анализаторе CEQ2000 XL (“Beckman Coulter”, США).

Молекулярно-генетический анализ. Предварительный скрининг сходства последовательностей гена phaC проводили по базе данных GeneBank [NCBI] с помощью пакета программ BLAST [http://ncbi.nlm.nih.gov]. Обработку и перевод нуклеотидных последовательностей гена phaC в аминокислотные проводили с использованием Gene Runner, версия 3.05 [Hastings Software, Inc.]. Последовательность белка PhaC выравнивали с последовательностями референтных штаммов ближайших прокариот с помощью программы CLUSTAL W (Thompson et al., 1997). Филогенетический анализ выполнен при помощи программы MEGA5 (Tamura et al., 2011). Филограммы строили методами “neighbor-joining” и “maximum-likelihood” (Saitou, Nei, 1987). Статистическую достоверность ветвления оценивали с помощью “bootstrap – анализа” 1000 альтернативных филограмм.

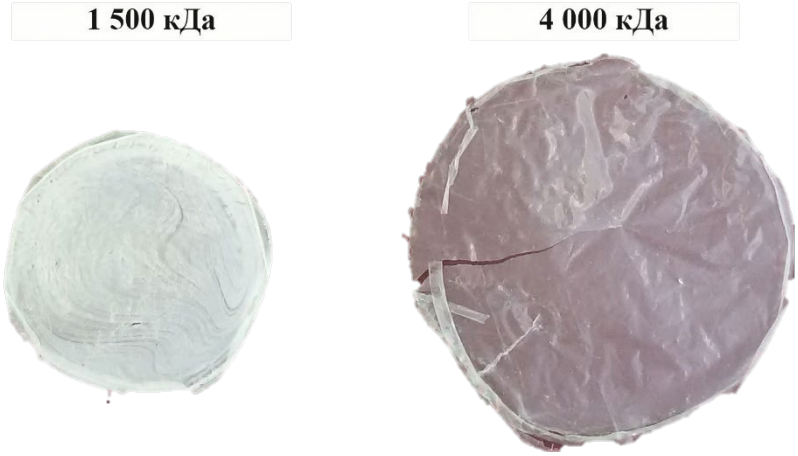


Рис. 1. Внешний вид образцов пленок ПГБ из биомассы штамма Delftia sp. Lp-1 на глицерине.

Показано, что при росте Delftia sp. Lp-1 на глицерине синтезировался биополимер с высокой молекулярной массой (Мм) от 1500–4000 кДа (рис. 1), что превышает Мм полимера у Methylorubrum extorquens (ранее Methylobacterium extorquens) – одного из известных метилотрофных продуцентов полигидроксибутировалерата (ПГБВ) из метанола-сырца (Ежов с соавт., 2010; Порошина с соавт., 2014). Выход ПГБ от массы сухих клеток штамма Delftia sp. Lp-1 составил 12–15 %. Полимер с Мм 4000кДа обладал высокой эластичностью и прочностью. Известно, что ПГБ с Мм от 1000 до 10000 кДа является перспективным для использования в медицине (кардиохирургия, противоспаечные и шовные материалы, основа для доставки лекарственных препаратов, восстановление костной ткани и при конструировании эндопротезов) (Волова с соавт., 2014; Галузина с соавт. 2015; Насонова с соавт., 2015).

По данным секвенирования фрагмента гена phaC ПГБ-синтазы, штамм Delftia sp. Lp-1 имел 96–99 % идентичности аминокислотных последовательностей с таковыми у представителей рода Delftia (рис. 2). Показано, что ПГБ – синтаза нашего штамма отнесена к ПГБ-синтазам I класса и наиболее близка таковым у различных штаммов вида D. acidovorans (98.4–99 %). Интересно отметить, что ПГБ – синтазы представителей рода Delftia образуют отдельную ветвь (рис. 2) среди представителей других родов, имеющим фермент I класса.

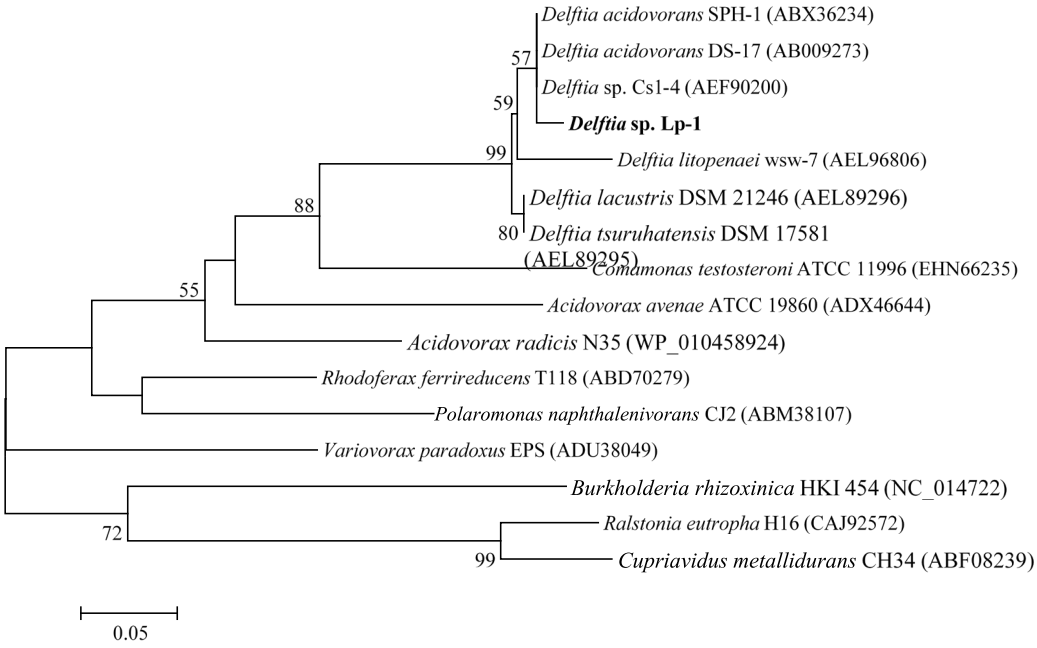


Рис. 2. Филогенетическое положение штамма Delftia sp. Lp-1 на основе сравнения аминокислотных последовательностей белка PhaC среди представителей порядка Burkholderiales с ПГБ-синтазами I класса. Шкала соответствует 5 аминокислотным заменам на каждые 100 аминокислот (эволюционное расстояние). Использован метод “maximum-likelihood”

Таким образом, впервые для Delftia sp. Lp-1 показана способность синтезировать ПГБ с высокой молекулярной массой, и очевидна перспективность этого штамма в качестве продуцента биоразлагаемого и биосовместимого пластика из недорогого побочного продукта промышленности – глицерина.

ЛИТЕРАТУРА

Агафонова Н.В. и др. Новый фитосимбионт из рода Delftia, способный к автотрофной метилотрофии // Микробиология. 2017. Т. 86. № 1. С. 88–98.

Волова Т.Г., Шишацкая Е.И. Разрушаемые биополимеры: получение, свойства, применение. Красноярск: «Красноярский писатель», 2011. 392 с.

Волова Т.Г., Винник Ю.С., Шишацкая Е.И., Маркелова Н.М. Биомедицинский потенциал разрушаемых полигидроксиалканоатов: экспериментально-клинические исследования. Красноярск: «Версо», 2014. -332 с.

Галузина Т.В., Герасин В.А., Доронина Н.В., Ежов В.А., Троценко Ю.А., Киприанов С.В., Иванов А.О., Филатова М.П., Шклярук Б.Ф. Структура и свойства полигидроксиалканоатов, синтезируемых Methyloligella halotolerans C2 и Methylobacterium extorquens G10, из метанола и его смеси с пентанолом // Высокомолекулярные соединения. Серия А. 2015. Т. 57. № 6. С. 511–520.

Доронина Н.В и др.. Аэробные метилобактерии – перспективные объекты современной биотехнологии (обзор) // Прикл. биохим. и микробиол. 2015. Т. 51. № 2. С. 111–121.

Ежов В.А., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. Биосинтез полигидроксибутировалерата с разной молекулярной массой при росте Methylobacterium extorquens G-10 на смеси метанола и пентанола // Прикл. биохимия и микробиология. 2013. Т. 49. № 2. С. 171–174.

Замахаева С.А. и др. Клонирование и характеристика полигидроксибутиратсинтазы из Methylobacterium extorquens AM1 // Журнал Сибирского Федерального Университета. Сер. Биология. Т. 2. № 9. С. 169–179.

Замахаева, С.А., Фёдоров, Д.Н., & Троценко, Ю.А. (2017). Метилотрофные продуценты биопластиков (Обзор) // Прикл. биохим. микробиол., 53(4), 351–362.

Мышкина В.А., Иванов Е.А., Николаева Д.А., Махина Т.К., Бонарцев А.П., Филатова Е.В., Ружицкий А.О., Бонарцева Г.А. Биосинтез сополимера поли-3-гидроксибутирата-3-гидроксивалерата штаммом *Azotobacter chroococcum* 7Б // Прикл. биохим. микробиол. 2010. Т. 46. № 3. С. 315–323.

Насонова М.В. и др. Скорость резорбции трансплантата на основе полигидроксиалканоатов и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2015. № 1. С. 39–45.

Порошина М.Н., Доронина Н.В., Ежов В.А., Троценко Ю.А. Сравнительная характеристика биосинтеза полигидроксибутирата Methylobacterium extorquens G10 и Methyloligella halotolerans C2 на метаноле // Прикл. биохим. микробиол. 2014. Т. 50. № 3. С. 283–288.

Chen W.M., Lin Y.S., Sheu D.S., Sheu S.Y. Delftia litopenaei sp. nov., a poly-beta-hydroxybutyrate-accumulating bacterium isolated from a freshwater shrimp culture pond // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2012. V. 62. P. 2315–2321.

Saitou N., Nei M. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. 1987. V. 4. P. 405–425.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // Mol. Biol. Evol. 2011. V. 28. P. 2731–2739.

Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin, F., Higgins D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools // Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. P. 4876–4882.

Tsuge, T., Imazu, S.I., Takase, K., Taguchi, S., Doi, Y. An extra large insertion in the polyhydroxyalkanoate synthase from Delftia acidovorans DS-17: its deletion effects and relation to cellular proteolysis. // FEMS Microbiol. Lett. 2004. V. 231(1). P. 77–83.

УДК 577.1.04; 577.15.03

ОСОБЕННОСТИ РЕГИСТРАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ ОТВЕТОВ БИООБЪЕКТОВ В ПРИСУТСТВИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

О.М. Алексеева[1], А.В. Кременцова[1], О.В. Шаталова[1], Ю.А. Ким[2]

[1] Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия
[2] Институт биофизики клетки РАН, Московская область, Россия

Для достижения целей медицинской биотехнологии и биофармацевтики необходимы тест-объекты со стабильными характеристиками, простые в получении. В исследованиях мы использовали суспензию клеток асцитной карциномы Эрлиха *(*АКЭ*)* для тестирования воздействия биологически активных веществ *(*БАВ*)*: мелафена и феноксана *(*рис. 1*)*, на один из сигнальных путей клеток животного происхождения – метаботропный Ca^2±зависимый путь при действии АТФ на P2Y рецепторы.

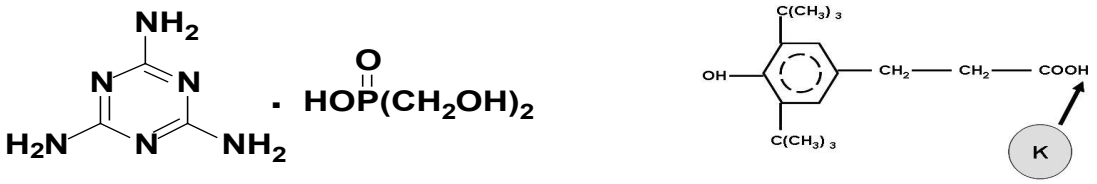


Рис. 1. Структурные формулы мелафена и феноксана

Мелафен – это меламиновая соль бис (оксиметил) фосфиновой кислоты, он синтезирован в ИОФХ РАН им. А.Е. Арбузова для стимуляции прорастания семян сельскохозяйственных культур [1]. Феноксан – это калиевая соль антиоксиданта фенозана (- β-(4-гидрокси – 3,5 – ди-трет-бутилфенил) пропионовая кислота), синтезированного в ИХФ РАН им. Н.Н. Семенова [2]. Фенозан первоначально предназначался для стабилизации полимеров и резин. Впоследствии было обнаружено, что и фенозан и феноксан проявляют свойства биологически активных веществ, являясь антиоксидантами и адаптогенами.

Мелафен и фенозан изменяют жирнокислотный состав мембран, как растительных, так и животных клеток, улучшают выживаемость организмов, в стрессовых условиях [3–5]. На уровне модельных экспериментальных объектов показаны изменения в организации липидных и белковых микродоменов, микровязкости биомембран [6]. БАВ влияют на топографию поверхности и морфологию эритроцитов [7,8]. Все эффекты являются доза-зависимыми. Водные растворы БАВ: мелафена или феноксана, в широком диапазоне концентраций (10^{-17}–10^{-2} М) приготавливали методом последовательных разбавлений с интенсивным перемешиванием с помощью вортекса. Перед измерениями раствор БАВ добавляли в образец сравнения, содержащий раствор ХЕНКСА, образец вносили в контрольную кювету. Кювета с опытным образцом содержала суспензию клеток АКЭ и БАВ. Поддерживались температура 24 °С и неинтенсивное перемешивание.

С целью исследования действия БАВ на функции целых изолированных клеток тестирование выполнялось на модели клеток короткоживущей асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) мышей. Клетки АКЭ на определенных этапах развития карциномы обладают характерной для многих видов клеток системой пурин-зависимой клеточной $Ca^{2\pm}$сигнализации. Некоторые пути Ca^{2}±сигнализации, в том числе и пурин-зависимая, влияют на объем клетки, что соответственно отражается на светорассеивающих параметрах разбавленной суспензии клеток. Регистрацию светорассеяния суспензии клеток АКЭ, коррелирующее с изменением объема, проводили на спектрофлуориметре Perkin-Elmer при одинаковых длинах волн возбуждения и регистрации в видимом диапазоне согласно ранее разработанным методам измерения [9, 10]. Метод светорассеяния под углом 90º, позволяет оценить общий клеточный ответ на добавление БАВ без внесения каких-либо красителей, меток и т. д. При этом регистрируется прямая реакция клетки на исследуемое вещество. Светорассеяние зависит от количества и размеров рассеивающих частиц в растворе. В разбавленных суспензиях клеток наблюдается только однократное (первичное) светорассеяние независимыми частицами [9, 10]. Светорассеяние под углом 90° резко возрастает при сжатии объема клеток в разбавленной суспензии. Уменьшение интенсивности первичного светорассеяния происходит при набухании клеток в результате компенсаторного вхождения воды для поддержания осмотических параметров клетки. Затем восстанавливаются исходные размеры клетки, и величина светорассеяния возвращается к исходной. Форма клетки поддерживается цитоскелетом, объем – обеспечением осмотического баланса при работе ионных насосов и каналов. Клетки, проявляя свойства осмометра, контролируют содержание ионов и воды внутри и вне клетки. Баланс ионов влияет на вход и выход воды через мембраны, и происходят значительные изменения объема клетки. Эти свойства животных клеток и были использовании при регистрации клеточной активности с помощью первичного светорассеяния [11]. Объем клетки среди многих механизмов в значительной мере контролируется функционированием кальций-зависимых $K^{\pm}$ и Cl^{-}-каналов плазмолеммы, $Ca^{2\pm}$регуляторные центры, которых расположены внутри клетки. Поэтому изменение объема клетки коррелирует с активностью кальций-зависимых $K^{\pm}$ и Cl^{-}-каналов плазмолеммы и концентрацией свободного Ca^{2+} внутри клетки [11].

АТФ-зависимый сигнальный путь инициировали повышением внутриклеточной концентрации Ca^{2+} при активации пуринорецепторов добавками АТФ [12]. Этот путь повышения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} доказан ингибиторным анализом. АТФ-удаляющий фермент – гексокиназа, и ингибитор пуринорецепторов – сурамин, полностью блокируют выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо [9, 10, 13]. Известно, что на 7–8 сутки развития карциномы после перевитых мышам препаратов клеток АКЭ метаботропные пуринорецепторы P2Y демаскированы на внешней поверхности плазмалеммы клеток [14].

Согласно данным с привлечением методов ингибиторного анализа, опубликованным в работах [9, 10, 15–19], нами была составлена схема действия БАВ на метаботропные пуринорецепторы P2Y и каналы SOC (рис. 2).

Модель клетки АКЭ, имеет полную систему передачи сигнала до внутриклеточных Ca^{2}±депо эндоплазматического ретикулума с обратной связью до ионных каналов на плазмалемме. Сигнализация продолжается до ядра, так как перинуклеарное пространство, окруженное ядерными оболочками, – это непрерывное продолжение пространств а ретикулума. Пурин-зависимая передача является специфической для каждого вида клеток. Появление АТФ во внеклеточном пространстве активирует на плазмалемме метаботропные пуринорецепторы (P2Y), инициирующие опосредованно через G-белки [22] работу фосфолипазы С (PLC). PLC расщепляет фосфолипиды плазмалеммы на инозитолтрифосфат и диацилглицерол (IP3 и DAG). IP3 действует на встроенный в эндоплазматический ретикулум каналообразующий инозитолтрифосфатный рецептор (IP3R), вызывая освобождение Ca^{2+} из этого внутриклеточного $Ca^{2\pm}$депо.

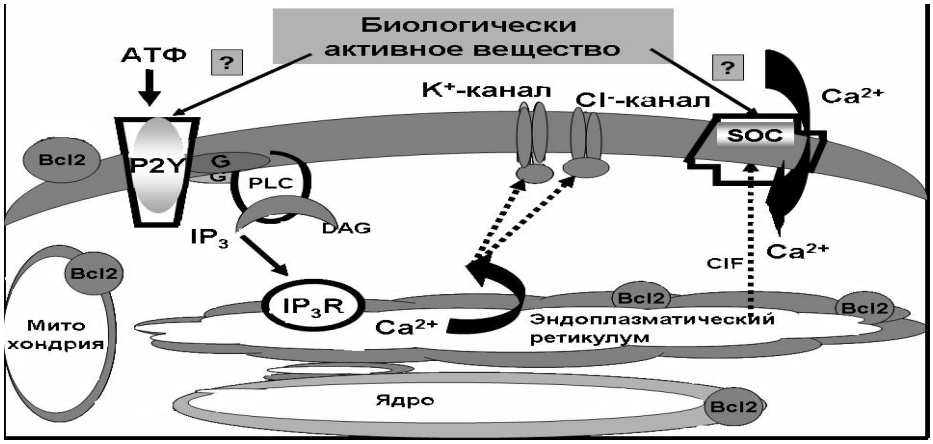


Рис. 2 Схема $Ca^{2\pm}$сигнальной системы. P2Y – метаботропные пуринорецепторы клеток АКЭ; G – G-белки; PLC – фосфолипаза С; IP3 – инозитолтрифосфат; IP3R – рецептор; DAG – диацилглицерол; CIF – цитоплазматический информационный фактор; (SOC store operated channels) – депо управляемые каналы; Bcl2 – антиапоптотические 26-килодальтонные белки, локализующиеся во всех мембранах, регулирующих $Ca^{2\pm}$потоки клетки [20], определяющие судьбу клетки [21]. $Ca^{2\pm}$зависимые $K^{\pm}$ и Cl^{-} – каналы – это каналы, которые участвуют в регуляции объема клетки

Резкое повышение концентрации свободного Ca^{2+} в цитоплазме вызывает сжатие клетки из-за увеличения осмотического градиента через плазмолемму. Свободный Ca^{2+} активирует работу $K^{\pm}$ и Cl^{-} – каналов, $Ca^{2\pm}$связывающие регуляторные центры которых экспонированы внутрь клетки. Происходит быстрый ионный обмен и вхождение воды в клетку, возвращающие клетке почти прежний объем. Эти изменения объема клеток, отражают первичный клеточный ответ, который регистрируется как резкое и кратковременное повышение светорассеяния в разбавленной суспензии клеток. Опустошение $Ca^{2\pm}$депо эндоплазматического ретикулума в свою очередь активирует вторичный вход Ca^{2+} в клетки через SOC (store operated channels – депо-регулируемые каналы), пронизывающие плазмолемму. Регистрируется плавный и продолжительный вторичный клеточный ответ. Типичная кинетическая кривая представлена на рисунке 3 – это кривая 1. Ответы на добавки АТР – бимодальные (рис. 3). Вид ответа клеток АКЭ на АТФ в значительной степени зависит от стадии развития карциномы [14, 23].

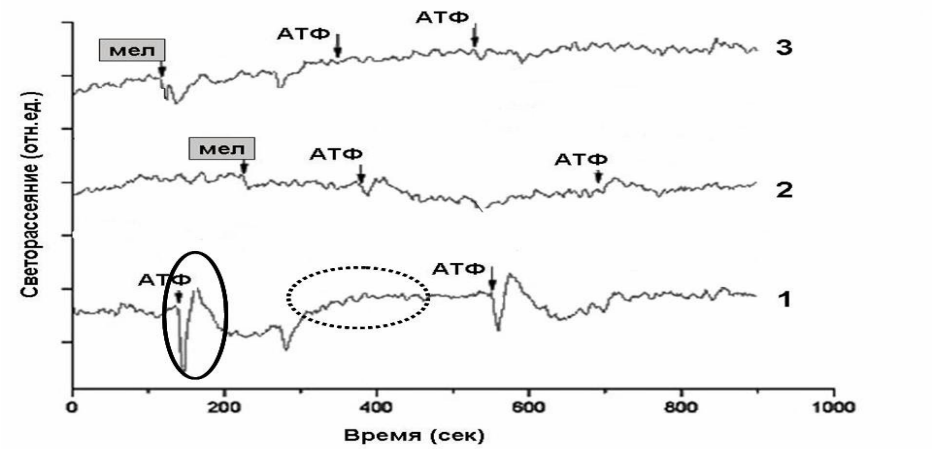


Рис. 3. Кинетические кривые зависимости светорассеяния суспензии клеток АКЭ от концентрации мелафена. 1-контроль; 2 – 10^{-8} М мелафен; 3 – 10^{-3} М мелафен. Овалами отмечены изменения светорассеяния суспензии, связанные с изменениями объемов клеток. Овал – сплошная линия, – первый клеточный ответ при активации P2Y – метаботропных пуринорецепторов клеток АКЭ. Овал – прерывистая линия, – второй клеточный ответ при активации неметаботропных Ca^{2+} – каналов SOC (store operated channels) – депо управляемые каналы клеток АКЭ

При тестировании влияния БАВ было обнаружено, что большие дозы мелафена (10^{-9}–10^{-3} М) значительно меняют реакцию клетки. Мелафен влияет на обе фазы внутриклеточной сигнализации клеток АКЭ: при концентрации 10^{-4} М и выше на 40 % снижается ответ первой фазы. При концентрациях выше 10^{-8} М, снижая величину первого ответа на 60 %, при концентрации выше 10^{-6} М блокирует вторичный вход Ca^{2+} в клетки через (SOC store operated channels), служащий для восстановления истощенного $Ca^{2\pm}$депо. С увеличением концентрации эффект усиливается, и при 10^{-4} М ингибирование достигает 80 %, 10^{-3} М вызывает 100 % – полное ингибирование всех фаз прохождения сигнала. При концентрации 10^{-4} М и выше полностью ингибируется пурин-зависимая Ca^{2}±сигнализация, работа $Ca^{2\pm}$зависимых K^{+} и $C1^{-}$каналов и SOC. Применяемые в растениеводстве концентрации мелафена (менее 10^{-13} М) не оказывают угнетающего действия на трансдукцию пурин-зависимого Ca^{2}±сигнала на модельной системе животных клеток – клетках АКЭ

Пуринозависимая $Ca^{2\pm}$сигнализация клеток АКЭ подвергается также угнетению феноксаном при концентрациях 10^{-7}-10^{-5} М. Влияние феноксана на общие клеточные ответы (первый и второй) клеток АКЭ, отражающиеся в изменении клеточного объема, также приводило к изменениям светорассеяния разбавленных суспензий клеток. Угнетение второго клеточного ответа, отражающего влияние БАВ на SOC каналы, происходило при меньших концентрациях БАВ, чем начиналось угнетение первого ответа, отражающего работу метаботропного пути при активации P2Y – пуринорецепторов. Так при активации Ca^{2}±сигнальной системы добавками АТФ происходило набухание клеток и пропорционально изменялась интенсивность светорассеяния в суспензии клеток Взаимодействие АТФ с пуринорецепторами P2Y на поверхности клетки приводило к повышению цитоплазматической концентрации Ca^{2}+, последующей активации Са-зависимых К±каналов и Са-зависимых Cl--каналов, изменяющих объем клеток. При повторении добавки АТФ опять происходил первый общий клеточный ответ, за ним следовал второй, отражающий увеличение содержания ионов кальция в цитоплазме в результате компенсаторного входа через каналы SOC (каналы, регулируемые опустошением кальциевого депо ретикулума). Оказалось, что все тестируемые в настоящей работе биологически активные вещества доза-зависимо изменяли объем клеток.

ВЫВОДЫ

Показан цитотоксический эффект больших концентраций БАВ для карциномы, вызываемый угнетением пурин-зависимого $Ca^{2\pm}$сигнального пути. БАВ изменяют бимодальный характер кинетических кривых светорассеяния суспензии клеток АКЭ, что свидетельствует об изменении формы клетки и, соответственно, о влиянии на функции всех звеньев $Ca^{2\pm}$сигнального пути: активации фосфолипазы С, опустошения $Ca^{2\pm}$депо эндоплазматического ретикулума, активации кальций-зависимых $K^{\pm}$ и Cl^{-}-каналов плазмолеммы, $Ca^{2\pm}$регуляторные центры, которых расположены внутри клетки, также и на функционирование SOC каналов. Влияние БАВ на активацию SOC каналов могло происходить непосредственно на поверхности клеток или опосредованно через весь метаболический путь, приводящий к опустошению $Ca^{2\pm}$депо эндоплазматического ретикулума, и передаче сигнала на внутриклеточные центры SOC каналов. Показано, что БАВ: мелафен и феноксан, регулируют Ca^{2}±потоки как внутри клетки, так и внеклеточный вход Ca^{2+}.

ЛИТЕРАТУРА

1. Фаттахов С.Г., Резник В.С., Коновалов А.И. Меламиновая соль бис(оксиметил)фосфиновой кислоты (мелафен) как регулятор роста и развития растений нового поколения. // В сб. докладов 13-ой Международной конференции по химии соединений фосфора. С. – Петербург 2002. С. 80.

2. Ершов В.В., Никифоров Г.А., Володькин А.А. Пространственно – затруднённые фенолы. // М. Химия. 1972. 352 с.

3. Жигачева, И.В., Фаткуллина Л.Д., Шугаев А.Г. Сверхмалые концентрации препарата «Мелафен» изменяют структурно-функциональные характеристики биологических мембран растительного и животного происхождения // Мелафен: механизм действия и области применения. Под ред. С.Г. Фаттахова, В.В. Кузнецова, Н.В. Загоскиной. – Казань: «Печать-Сервис XXI век». 2014. С. 136–147.

4. Фаткуллина Л.Д. и др. «Действие антиоксиданта фенозана на структурные характеристики мембран и ДНК при развитии спонтанного лимфолейкоза мышей» Сборник материалов IX Международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты». Москва 20–25 апреля 2015 г. под ред. Загоскиной Н.В. С 151–154.

5. Жигачева И.В., Фаткуллина Л.Д., Русина И.Ф., Шугаев А.Г., Генерозова И.П., Фаттахов С.Г., Коновалов А.И. Антистрессовые свойства препарата мелафен. // ДАН. 2007. Т. 414 № 2. С. 263–265.

6. Alekseeva O.M., Fatkullina L.D., Kim Yu. A., Zaikov G.E. The melafen influence to the erythrocyte's proteins and lipids // Вестник Казанского технологического Университета 2014 Т.17. Вып.9. С. 176–181.

7. Гендель Л.Я., Ким Л.В., Лунёва О.Г., Федин В.А., Круглякова К.Е. «Изменения поверхностной архитектоники эритроцитов под влиянием синтетического антиоксиданта фенозана-1». // Известия РАН. Сер. Биол. 1996. № 4. С. 508–512.

8. Бинюков В.И., Алексеева О.М., Миль Е.М., Албантова А.А., Фаттахов С.Г., Голощапов А.Н., Бурлакова Е.Б., Коновалов А.И. «Изучение влияния фенозана, ИХФАН-10 и мелафена на эритроциты in vivo методом АСМ». // ДАН 2011. Т. 441. № 1. С. 114–117.

9. Баумуратов А.С., Кононов А.В., Ли В.В, Зинченко В.П. Импульсное освобождение АТФ из клеток асцитной карциномы Эрлиха при действии сапонина и ОН. // Биол. мембраны 2004 Т.21. С. 46–52.

10. Зинченко В.П., Касымов В.А., Ли В.В., Каймачников Н.П. Ингибитор кальмодулина R24571 индуцирует кратковременный вход Ca2 + и импульсную секрецию АТФ в клетках асцитной карциномы Эрлиха. // Биофизика. 2005. Т. 50. № 6. С. 1055–1069.

11. Cornet M., Lambert I.H., Hoffman E.K. Relation between cytosceletal hypoosmotic treatment and volume regulation in Erlich ascites tumor cells. // J. Membr. Biol. 1993. V.131. P. 55–66.

12. Sekar M.C., Hokin L.E. The role of phosphoinositides in signal transduction. // J. Membr. Biol. 1986. V. 89. P. 193–210.

13. Зиганшин А.У., Зиганшина Л.Е., Бернсток Дж. Экто-АТФазы и рецепторы АТФ. // Эксп. Клинич. Фармакол. 1997. (6). № 3. С. 78–82.

14. Замай А.С., Замай Т.Н. Влияние АТФ на асцитные клетки в разные фазы опухолевого роста // Материалы международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация». Пущино. 2005. С. 48–51.

15. Arslan P., DiVirgilio F., Betzame M., Tsien R.I., Pozzan T. Cytosolyc Ca^{2}+ homeostasisin Ehrlich and Yoshida carcinomas. // J. Biol. Chem. 1985. V.260. P. 2719–2727.

16. Нуриева Р.И., Абдрасилов Б.С, Ким Ю.А., Леонтьева Г.А., Пак Хва Дин, Зинченко В.П. Механизм активации клеток асцитной карциномы Эрлиха общей фракцией сапонинов из корейского женьшеня. // Антибиотики и химиотерапия. 1995. N.11–12. С. 25–28.

17. Abdrasilov B.S., Kim Yu. A., Nurieva R.I., Dedkova E.N., Leonteva G.A., Hwa Jin Park, Zinchenko V.P. The effect of total saponins from Panax Ginseng C.A. Meyer on the intracellular signalling system ¡11 F.hrlich ascites tumor cells. // Biochem. Mol. Biol. Int. 1996. V. 38. № 38. P. 519–526.

18. Dubyak G.R. Extracellular ATP activates poliphosphoinositide breakdown and Ca^{2}±mobilisation in Ehrlich ascites tumor cells. // Arch. Biochem. Biophys. 1986. V. 245. P. 84–95.

19. Artalej O.A., J. Garcia – Sancho, Mobilization of intracellular calcium by extracellular ATP and by calcium ionophores in the Ehrlich ascities tumor cells. // Biochem. Biophys. Acta 1988. V. 941. № 9. P.48–54.

20. Kuo T.H. Kim H.R., Zhu L., Yu Y., Lim H.M., Tsang W. Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump by Bcl-2. // Oncogene. 1998. V. 17, № 15. P. 1903–1910.

21. Cory S., Adams J.M. The Bc 12 family: regulators of the cellular life-or-death switch. // Nat. Rev. Cancer. 2002. № 2. P. 647–656.

22. Webb T.E., Simon J., Krishek B.J., et al. Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. // FEBS Lett. 1993. V. 324 P. 219.

23. Замай Т.Н., Замай А.С. Изменение концентрации кальция в асцитных клетках карциномы Эрлиха в динамике ее роста. // Материалы международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация». Пущино. 2005.С. 51–54.

УДК 57.085.23:579.887

ИСПЫТАНИЕ НА ПРИСУТСТВИЕ МИКОПЛАЗМ МЕТОДОМ ИНДИКАТОРНОЙ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ

Н.С. Куцерубова, М.П. Богрянцева, С.В. Усова, И.Ф. Радаева, Е.А. Нечаева

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, г. Новосибирск, Россия

Безопасность иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП), получаемых из культур клеток, напрямую связано как с самими клетками, так и их компонентами, а также с присутствием в них контаминантов микробного и вирусного происхождения. Одним из распространенных контаминантов являются микоплазмы. Риск контаминации микоплазмами культур клеток, сывороток, питательных сред, вирусных сборов, используемых при производстве вакцин, является на сегодняшний день серьезной проблемой при производстве ИЛП.

Выявление микоплазменной контаминации ИЛП определяется требованиями нормативной документации. В настоящее время основными методами, рекомендованными Государственной Фармакопеей Российской Федерации XIV издания для выявления микоплазм, являются микробиологический (культуральный) метод и метод индикаторной клеточной культуры с использованием флюоресцирующего красителя ДНК (цитохимический). [1–4].

Культуральный метод, рекомендованный в последних изданиях американской, европейской, японской фармакопей в качестве «золотого стандарта» определения микоплазм, имеет ряд недостатков [5]: длительное время анализа (28 суток); чувствительность теста зависит от правильного приготовления сред, качества компонентов сред, а также от неправильного хранения образцов.

Цитохимический метод выявления микоплазм основан на внесении испытуемого образца в клеточную культуру, чувствительную к микоплазмам (обычно Vero), и последующей обработке культуры клеток специфическим флуоресцирующим красителе Hoechst-33258. Микоплазмы в культурах клеток обнаруживаются в виде отдельных мелких (0,1–0,3 мкм диаметром) гранул или скоплений, расположенных вне клеток или на их поверхности. В препаратах клеток, свободных от микоплазм, наблюдается флуоресценция ядер, цитоплазма при этом почти не светится [6,7]. Недостатками этого метода являются длительность времени анализа (инкубация до 5 суток), метод не прост в использовании, необходимы специальная клеточная культура, среда, а также люминесцентый микроскоп.

Цель настоящей работы является усовершенствование метода выявления микоплазменной контаминации в иммунобиологических лекарственных препаратах с помощью метода индикаторной клеточной культуры с использованием флюоресцирующего красителя ДНК с визуализацией на цитофлюориметре Cellavista.

Цитофлюориметр Cellavista – это платформа для быстрого анализа клеток в режиме светлого поля и множественной флуоресценции. В работе цитофлюориметра используется специально разработанная оптика в сочетании с исключительно быстрым автофокусом для доставки изображений высокого качества на персональный компьютер. Данный прибор является усовершенствованным аналогом люминесцентного микроскопа.

В ходе экспериментальных работ определение микоплазм в культурах клеток проводилось методом индикаторной клеточной культуры (цитохимический) с использованием флюоресцирующего красителя ДНК, для прижизненной окраски клеточных ядер использовали краситель 4'-6-диамино-2 – фенилидол (DAPI). Для этой цели были использованы следующие перевиваемые линии клеток: L-929 (мышь, фибробласты подкожной соединительной ткани, клон линии клеток L) и MDCK (собака, почка), Vero – эпителий почки (зеленая мартышка), для выращивания которых была применена питательная среда Игла МЕМ производства ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Россия) с 10 % сыворотки эмбриональной телячьей «Gibco» (США). На 2 сутки инкубации часть клеток контаминировали ОСО Mycoplasma arginine G 230 (Россия) с титром стандартного образца 1 х 10^{-7} КОЕ/мл. Далее образцы культивировали еще 2 суток при условии CO_2 (36 ± 1) °С.

Для определения микоплазмы анализируемые клетки выращивали на покровных стеклах, в течение 2–3 сут, и на 96-луночных планшетах, затем фиксировали, окрашивали, промывали и просматривали на приборе цитофлюориметре Cellavista и на люминесцентном микроскопе.

При сравнительном исследовании препаратов как на цитофлюориметре так и на люминесцентном микроскопе, были выявлены контаминированные Mycoplasma arginine G 230 культуры клеток (рис. 2) так и чистые культуры клеток MDCK, Vero и L-929 (рис. 1).

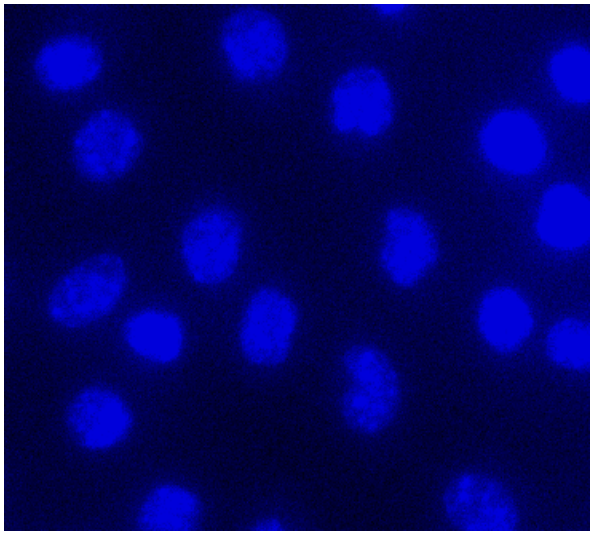


Рисунок 1. Выявление микоплазм на цитофлюориметре Cellavista, окраска красителем 4'-6-диамино-2 – фенилидол (DAPI) – культура клетки L-929 (свободна от микоплазм)

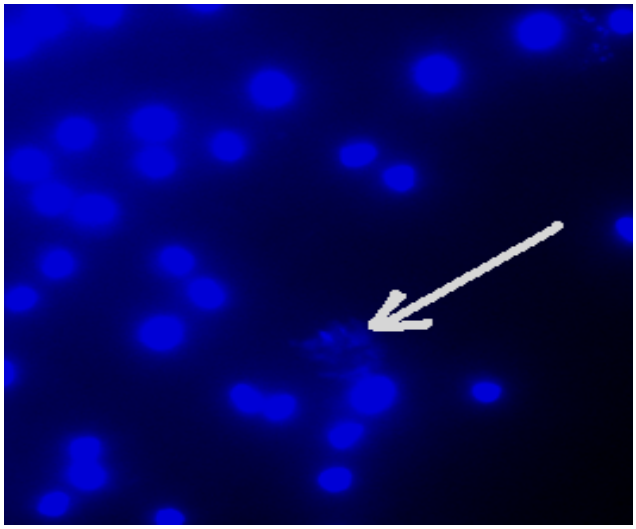


Рисунок 2. Выявление микоплазм на цитофлюориметре Cellavista, окраска красителем 4'-6-диамино-2 – фенилидол (DAPI) – культура клетки L-929 контаминированная микоплазмами (указаны стрелками)

В результате работы было показано, что преимуществом метода индикаторной клеточной культуры с использованием флюоресцирующего красителя ДНК с визуализацией на цитофлюориметре Cellavista, в сравнении с работой на люминесцентном микроскопе является возможность контролировать большее количество образцов одновременно, проведение анализов не только на покровных стеклах, но и на 96-луночных планшетах, получение результата от 3 суток до нескольких часов с выведением результатов на персональный компьютер.

Предложенный метод был валидирован, и было подтверждено, что метод индикаторной клеточной культуры с визуализацией на цитофлюориметре Cellavista соответствует заявленным требованиям Государственной Фармакопеи.

ЛИТЕРАТУРА

Куцерубова Н.С. и др. Выявление микоплазм в иммунобиологических лекарственных препаратах. Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения // Материалы XI съезда Всерос. науч.-практ. о-ва эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (Москва, 16–17 ноября 2017 г.) Под ред. А.Ю. Поповой. СПб. ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, 2017. С. 134.

ГФ XIV изд., т. 2, М., 2018 г. стр. 2997–3008 [Электронный источник] – URL: http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php. (дата обращения: 30.07.2019)

Бердникова З.Е. Разработка и стандартизация методов выявления микоплазм контаминантов медицинских биологических препаратов: дис. канд. биолог, наук. – М., 1991. – 136 с.

Борхсениус С.Н., Чернова О.А., Чернов В.М., Вонский М.С. Микоплазмы. Молекулярная и клеточная биология, взаимодействие с иммунной системой млекопитающих, патогенность, диагностика. – СПб., 2002.

Ёлшин Н.Д., Петров А.В. Изучение возможности использования метода qPCR для контроля отсутствия микоплазменной контаминации в клеточных культурах // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2017. Т. 17. № 3 (63). С. 173–179.

Drexler H.G., Uphoff C.C. Contamination of cell culture, Mycoplasma // Encyclopedia of cell technology / Ed. by R.S. Spier. – N.Y.; Toronto, 2000. – Vol. 1. – P. 609–627.

Усова С.В. и др. Контаминация микоплазмами культуральных вирусных вакцин // Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2014. – Т. 12. – № 4. – С. 59–67.

УДК 577.151:57.05

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИНГИБИТОРОВ PHASEOLUS VULGARIS

В.А. Сильченко, Е.А. Прутенская, Л.А. Зайцева

Тверской государственный технический университет, Тверь, Россия

Семена фасоли содержат большое количество белковых веществ и крахмала. Существует много методов для их разделения и некоторые из них нашли широкое применение в промышленности. Белковые вещества фасоли в зависимости от технологии их выделения применяются в разных сферах. При тепловой обработке белкового изолята получается гидролизат, который используется в качестве кормовой добавки, при получении пищевых концентратов, например, в изготовлении специальных добавок в макаронной, кондитерской, хлебопекарной промышленности. Белки фасоли без предварительной обработки используют для выделения ингибиторов ферментов [1, 2].

Большое распространение ингибиторов пищеварительных ферментов и их присутствие в довольно значительных количествах в тканях этих растений свидетельствует о том, что они играют важную роль в регуляции разных физиологических процессов.

В последнее время ингибиторы стали использовать в качестве генетических маркеров при решении вопросов эволюции растений, при идентификации сортовой принадлежности рода в систематике, а также в роли перспективных препаратов, которые используют в медицине [3].

В связи с этим, в настоящее время является актуальным изучение ингибиторов растений и их биологической активности.

Фасоль отличается высоким содержанием хорошо перевариваемого, полноценного по аминокислотному составу растительного белка. Белковый комплекс фасоли в нативном виде содержит антипитательные вещества или так называемые антиалиментарные факторы: лектины, ингибиторы протеиназ и амилаз.

В работе изучалось влияние комплексов белковых ингибиторов из Phaseolus vulgaris на α-амилазы Aspergillus oryzae и панкреатическую. Опытные образцы были получены по методикам, разработанным на кафедре БТиХ ТвГТУ [4]. Растворы ингибиторов готовили из сухих образцов путем растворения в воде. Амилолитическую активность определяли колориметрическим методом.

При исследовании воздействия ингибиторов на активность ферментов выяснилось, что минимальная каталитическая активность ферментных молекул прослеживается при конкретной насыщенности ингибитора, в результате ее уменьшения или увеличения в сравнении с приемлемым уровнем каталитические свойства фермента усиливаются. Потому как субстрат, так и ингибитор являются структурными аналогами и в процессе реакций они конкурируют за соединение с активным центром фермента, следовательно, уровень ингибирования ферментативного превращения находится в зависимости от пропорции концентраций субстрата и ингибитора. В случае если плотность субстрата будет намного превышать плотность ингибитора, то постоянно лишь малое количество молекул фермента будет связано с ингибитором и воздействие ингибитора практически не обнаружится.

В связи с этим, вначале подбиралось оптимальное соотношение субстрата (крахмал 1 %) и ингибитора. Для исследования использовали в качестве объекта α-амилазу Aspergillus oryzae.

В зависимости от величины концентрации белкового вещества наблюдалась различная тенденция. При концентрации раствора ингибитора 0.01 % и выше наблюдалось незначительной снижение активности амилазы. При уменьшении концентрации ингибитора в растворе происходило снижение активности (рисунок 1).

Наибольшее снижении активности наблюдается при добавлении растворов ингибитора концентраций близкой к 0.00001 %. Дальнейшее уменьшение концентрации раствора ингибитора приводило к незначительному увеличению активности α-амилазы Aspergillus oryzae. Максимальное подавление ферментативной активности в пробах достигает 29 % от исходной активности фермента.

На рисунке 2 показано влияние белкового комплекса ингибиторов на активность грибной α-амилазы Aspergillus oryzae в течение 20 минут. Для опытов брали растворы ингибитора концентрацией 0.000001 % и 0.00001 %. *1 – Активность α-амилазы без добавления ингибитора; 2 – активность α-амилазы при добавлении раствора ингибитора с концентрацией 0.000001; 3 – активность α-амилазы при добавлении раствора ингибитора с концентрацией 0.00001.*

Максимальное ингибирование происходит на 10 минутах реакции, затем активность α-амилазы увеличивается, но не достигает контроля. Торможение ферментативной реакции составляет 5 минут, полное разрушение субстрата не происходит даже на 20 минутах. После 15 минут течение ферментативной реакции практически приостанавливается. Таким образом, при уменьшении концентрации субстрата в растворе между ингибитором и ферментом образуется необратимый комплекс, который не позволяет полностью деструктировать крахмал.

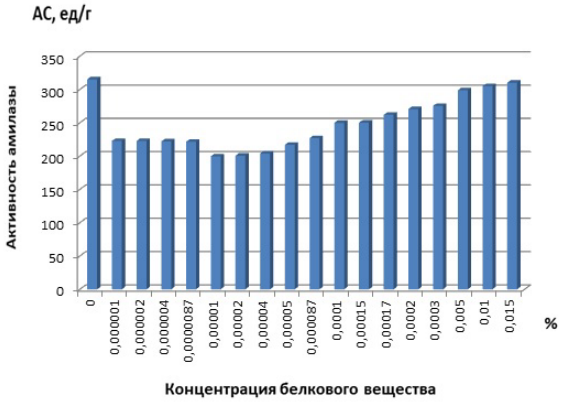


Рисунок 1 – Зависимость активности грибной амилазы при разной концентрации растворов ингибитора (время реакции 10 минут, концентрация крахмала 1 %, температура 30°С)

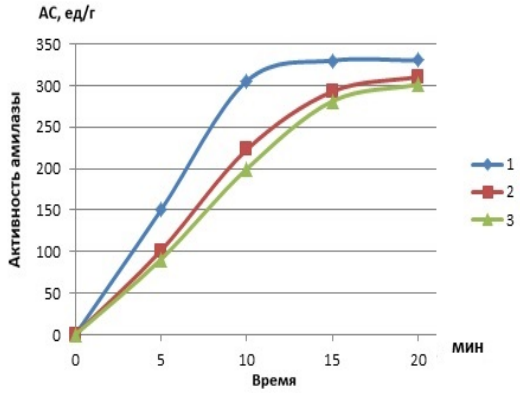


Рисунок 2 – Зависимость активности грибной α-амилазы Aspergillus oryzae при добавлении растворов ингибитора разных концентраций от времени

На основе данных результатов можно сделать вывод, что при добавлении ингибитора активность амилазы падает, но при этом малая концентрация ингибитора оказывает более сильное воздействие на активность. Можно предположить, что при большей концентрации крахмала происходит конкурентное ингибирование или селективное действие ингибитора.

В ходе изучения влияния на панкреатическую амилазу для определения оптимальной концентрации ингибирующего вещества были проведены опыты, в ходе которых было выяснено, что повышение концентрации ингибитора выше 1 % никак не влияло на результат ингибирующего действия на фермент. Однако понижение концентрации ингибитора ниже 1 % приводило к снижению влияния ингибитора, выделенного из фасоли, на активность панкреатической α-амилазы.

Графические данные о влиянии различных концентраций ингибитора на активность панкреатической α-амилазы представлены на рисунке 3.

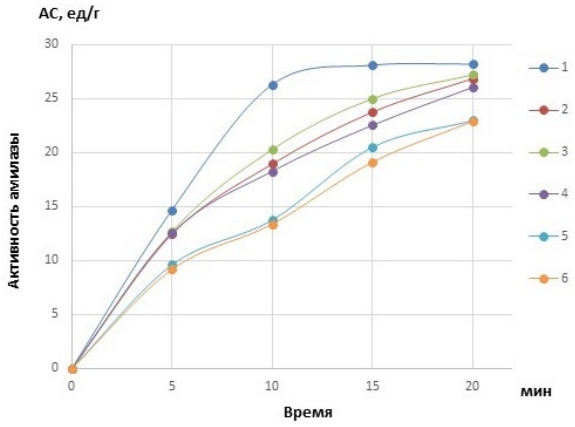


Рисунок 3 – Зависимость активности амилазы при добавлении различной концентрации ингибитора от времени. 1 – Активность амилазы без добавления ингибитора; 2 – Активность амилазы при концентрации ингибитора 0.03; 3 – Активность амилазы при концентрации ингибитора 0.05; 4 – Активность амилазы при концентрации ингибитора 0.1; 5 – Активность амилазы при концентрации ингибитора 1 %; 6 – Активность амилазы при концентрации ингибитора 2 %

Максимальное ингибирование фермента происходит на 10 минуте и составляет 49 % от контроля. На 20 минуте активность фермента увеличивается на 30 %. Таким образом, механизм действия белковых ингибиторов, выделенных из фасоли, одинаков, как для панкреатической амилазы, так и для грибной.

На основании вышеизложенного, можно отметить, что полученные препараты ингибиторов являются антиалиментарными факторами и могут быть использованы для практических целей.

Работа выполнена при финансировании РФФИ (госконтракт 19–08–00185\19).

ЛИТЕРАТУРА

1 Акулов, А.С. Перспективная ресурсосберегающая технология производства фасоли: метод. рекомендации / А.С. Акулов [и др.]. – М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2010. – 36 с.

2 Чурикова, С.Ю. Разработка технологий производства адаптированных функциональных продуктов питания с использованием злаковых, бобовых и гречишных культур: дис… канд. сель-хоз. наук: 05.18.01: защищена 30.11.11: / Чурикова Светлана Юрьевна. – Воронеж, 2011. – 224 с.

3 Шпирная, И.А. Гидролитические ферменты и их ингибиторы как компоненты системы "насекомое-фитофаг-растение": дис… канд. биолог. наук: 03.00.12 /Уфа, 2006. – 112 с.

4 Сильченко В.А. и др. Разработка технологии выделения ингибиторов пищевых ферментов из растительного сырья для создания диагностических препаратов // Вестник Тверского государственного технического университета. 2017. № 1 (31). – С. 133–137.

УДК 57.08: 615.835.14:612.181.5:615

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ПРОГНОЗИРОВАНИЮ ПОВЫШЕНИЯ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ОРГАНИЗМА К ТЯЖЕЛЫМ ГИПОКСИЧЕСКИМ / ИШЕМИЧЕСКИМ НАГРУЗКАМ

Е.И. Захарова[1], З.И. Сторожева[2], М.Ю. Монаков[1], А.М. Дудченко[1]

[1] Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия
[2] Федеральный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии, Москва, Россия

Для повышения устойчивости к гипоксическому стрессу все больший интерес представляет гипоксическое/ ишемическое прекондиционирование разных органов и тканей или организма в целом [1–7]. Ранее нами была показана выраженная индивидуальная вариабельность эффективности прекондиционирующего действия в популяции белых беспородных крыс (самцов) [8]). Очевидно, что низкая прекондиционирующая эффективность может быть критична в определенных клинических ситуациях. Поэтому оценка результатов прекондиционирования или их прогнозирование является важной клинической задачей. Однако способы ее прогнозирования до недавнего времени отсутствовали.

В экспериментах на крысах нами был найден один такой способ – выявлена устойчивая корреляция между эффективностью прекондиционирующего действия одноразового сеанса умеренной гипобарической гипоксии (ГБГ, 10–11 % O_2, 60 мин), которая определялась по времени до наступления апное (Т) в условиях тяжелой гипобарической гипоксии (ТГБГ, 4.5 % O_2), и предстимульным торможением (ПСТ, PPI в английской транскрипции) в модели акустической стартл-реакции [9], ПСТ-Т тест. ПСТ является достаточно распространенным диагностическим показателем в нейробиологии, особенно в психопатологии, как в экспериментальной нейробиологии, так и в медицинской практике [10, 11], однако в проблеме гипоксического прекондиционирования не использовался (патент РФ № 2571603). Наши дальнейшие эксперименты с ПСТ-Т тестом только подтверждают полученную закономерность (Табл. 1).

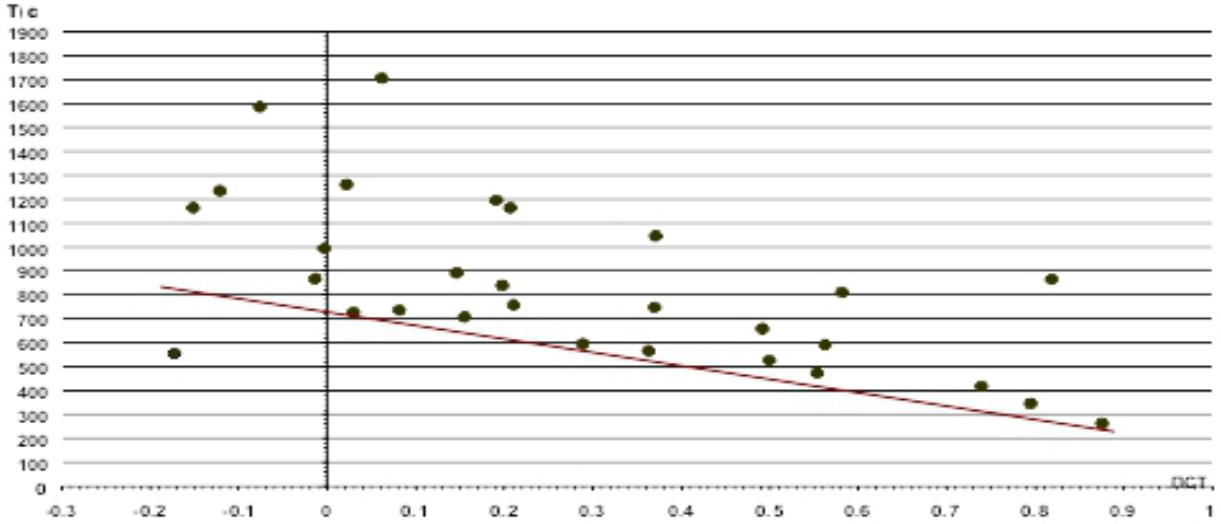
С помощью ПСТ-Т теста стало возможным прогнозировать эффективность прекондиционирующего действия ГБГ (Рис. 1) и изучать механизмы гипоксического прекондиционирования, в том числе молекулярные мишени повышения его эффективности. С этой целью мы исследовали влияние агониста холинергических никотиновых рецепторов (нХР) альфа 7 типа PNU-282987 (PNU) на эффективность ГБГ. По данным литературы, в механизмы гипоксического/ ишемического прекондиционирования разных органов вовлечены нХР и наиболее убедительно это показано для нХР альфа 7 подтипа [12–16].

Таблица 1. Устойчивость зависимости эффективности прекондиционирующего действия ГБГ от индивидуальных значений ПСТ в ПСТ-Т тесте

№ экспериментальных серий	n	r	P
I	18	-0.711	<0.001
I + II	22	-0.561	<0.01
I + II + III	29	-0.637	<0.001

Обозначения. Экспериментальные серии пронумерованы римскими цифрами в хронологической последовательности; n, количество вариант; r, корреляционный критерий Пирсона; P, уровень вероятности

В наших фармакологических экспериментах PNU вводили внутрибрюшинно в диапазоне доз от 26 до 12000 нмолей/ кг, а его растворитель диметилсульфоксид (ДМСО) в концентрации 2–3 %. Препараты вводили с таким рассчетом, чтобы максимальная концентрация PNU в мозге (которая достигается через 40–60 мин после системного введения [17, 18]) совпадала с интервалом 20–30 мин от начала гипоксической тренировки. Условия оптимального взаимодействия PNU и ГБГ были подобраны эмпирически. Контрольной группе крыс вводили физиологический раствор в том же режиме. Через 4 мин окончания ГБГ животных подвергали ТГБГ и определяли значения Т.



Обозначения. Маркеры обозначают распределение индивидуальных значений Т (в секундах, с) в соответствии со значениями ПСТ у белых беспородных крыс самцов (n = 29). Значения ПСТ (ось абсцисс) выражены для построения графика в десятичных цифрах, эквивалентных ПСТ-процентам. Под массивом значений Т проведена линия, по которой можно прогнозировать минимальные значения Т у индивидуумов означенной популяции крыс в зависимости от их ПСТ. Исключение составила одна точка (3.4 % от общего массива) – 554 с вместо ожидаемых ~875 с или больше.

Действие PNU во всех дозах оказалось десенсибилизирующим (ингибирующим) альфа 7 нХР [19, 20], а ДМСО – антихолинэстеразным (возбуждающим холинергическую активность) [21] (Рис. 2). И PNU, и ДМСО проявили на ГБГ эффекты, направленность которых менялась на противоположную на границе ПСТ ~ 36–40 %. В наших исследованиях ДМСО у крыс в подгруппе со значениями ПСТ > 40 % (n = 7) потенциировал эффективность ГБГ, а со значениями ПСТ < 40 % ингибировал ее PNU (в растворе ДМСО 2–3 %) снижал эффективность действия растворителя в обеих подгруппах животных в дозах 26 и 260 нмолей/ кг (соответственно, n = 14, 15, Рис. 2, В). Когда мы применили 5 доз PNU в диапазоне 1200 – 12000 нмолей/ кг, рассчитывая получить его активирующий эффект как агониста, то и в этих дозах его действие на альфа 7 нХР было десенсибилизирующим, противоположным действию ДМСО в обеих подгруппах животных (соответственно, n = 12, 13). При этом в диапазоне более высоких доз PNU преодолел противоположную направленность действия растворителя – повысил эффективность ГБГ в подгруппе крыс с ПСТ < 0,40 и снизил ее в подгруппе крыс с ПСТ > 0,40 (Рис. 2-Г).

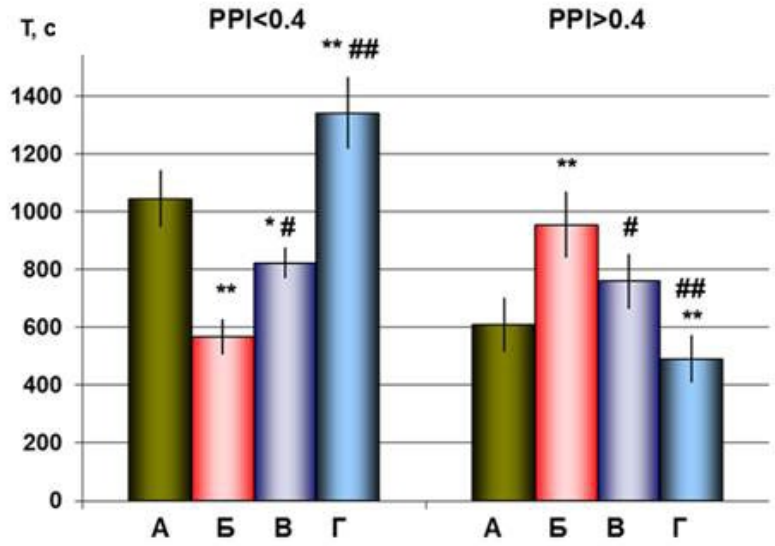


Рис. 2. Значения Т в группах Контроля, ДМСО и PNU с низкими и высокими дозами. Обозначения. Представлены средние значения Т (М ± м) в подруппах с PPI (ПСТ) < 0.4 (< 40 %) и PPI > 0,4 (> 40 %) групп контроля (А), ДМСО (Б), PNU в дозах 26 и 260 нмолей/ кг (В) и в дозах 1200 – 12000 нмолей/ кг (Г). Звездочки, отличие значений Т в подгруппе от соответствующей подгруппы контроля; решетки, отличие значений Т в подгруппе PNU от соответствующей подгруппы ДМСО; один знак, P < 0,05, два знака, P < 0.025. Точный метод Фишера. (n = 15, Рис. 2, Б).

Из полученных данных следует, что применение ПСТ-Т теста позволило выявить два противоположно направленных ПСТ-зависимых холинергических механизма гипоксического прекондиционирования и что в оба механизма вовлечены как PNU, так и ДМСО.

Таким образом, на базе ПСТ разработана новая технология прогнозирования эффективности гипоксического прекондиционирования, а также показана перспектива фармакологической модуляции прекондиционирующих эффектов с помощью DMSO и PNU.

Полученные результаты о разнонаправленном действии агониста альфа 7 нХР и его растворителя ДМСО на изменение устойчивости организма к дефициту кислорода у индивидуумов с различными значениями ПСТ могут быть использованы при реализации принципов персонифицированной медицины. Например, назначение агонистов альфа 7 нХР пациентам с низкими показателями ПСТ и страдающим хроническими нарушениями кровообращения будет, по-видимому, позитивно сказываться на переносимости кислородного голодания. И, наоборот, аналогичная терапия у пациентов с высоким ПСТ будет провоцировать снижение устойчивости к дефициту кислорода.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hawaleshka A and Jacobsohn E. (1998) Ischaemic Preconditioning: Mechanisms and Potential Clinical Applications. Can J Anesth, 45: 670–682. https://doi.org/10.1007/BF03012100

2. Lai IR, Chang KJ, Chen CF, Tsai HW. (2006) Transient Limb Ischemia Induces

3. Remote Preconditioning in Liver Among Rats: The Protective Role of Heme Oxygenase-1.

4. Transplantation, 81: 1311–1317. https://doi.org/10.1097/01.tp.0000203555.14546.63

5. Рубрикова Е.А., Самойлов М.О. (2016) Современная теория о церебральных механизмах гипоксического пре- и посткондиционирования Успехи Физиол Наук, 47(4): 3–17

6. Li S, Hafeez A, Noorulla F, Geng X, Shao G, Ren C, Lu G, Zhao H, Ding Y, Ji X. (2017) Preconditioning in neuroprotection: From hypoxia to ischemia Prog Neurobiol, 157:79–91. doi: 10.1016/j.pneurobio.2017.01.001.

7. Livingston MJ, Wang J, Zhou J, Wu G, Ganley IG, Hill JA, Yin XM, Dong Z (2019)

8. Clearance of damaged mitochondria via mitophagy is important to the protective effect of ischemic preconditioning in kidneys. Autophagy, 22:1–21. doi: 10.1080/15548627.2019.1615822. [Epub ahead of print]

9. Schreiber T, Salhöfer L, Quinting T, Fandrey J. (2019) Things get broken: the hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylases in ischemic heart disease. Basic Res Cardiol, 114(3) : 16. doi: 10.1007/s00395–019–0725–2

10. Shojaei F, Rahmati S, Banitalebi Dehkordi M. (2019) A review on different methods to increase the efficiency of mesenchymal stem cell-based wound therapy. Wound Repair Regen. doi: 10.1111/wrr.12749. [Epub ahead of print]

11. Zakharova EI, Storozheva ZI, Proshin AT, Monakov MYu, Dudchenko AM. (2018) The Acoustic Sensorimotor Gating Predicts the Efficiency of Hypoxic Preconditioning. Participation of the Cholinergic System in This Phenomenon. J Biomedical Science and Engineering, 11(1): 10–25. DOI: 10.4236/jbise.2018.111002

12. Певцов ЕФ Сторожева ЗИ, Прошин АТ, Певцова ЕИ. Аппаратно-программный комплекс для экспериментальных исследований акустической стартл – реакции у лабораторных грызунов (2015) Бюлл Эксперим Биол и Мед, 160(10): 403–407.

13. Storozheva ZI, Kirenskaya AV, Novototsky-Vlasov VY, Telesheva KY, Pletnikov M. (2016) Startle Modification and P50 Gating in Schizophrenia Patients and Controls: Russian Population. Spanish J Psychol, 19: E8. https://doi.org/10.1017/sjp.2016.1

14. Swerdlow NR, Braff DL, Geyer MA. (2016) Sensorimotor Gating of the Startle Reflex: What We Said 25 Years Ago, What Has Happened Since Then, and What Comes Next. J Psychopharmacology, 30: 1072–1081. https://doi.org/10.1177/0269881116661075

15. van Rensburg R, Errington DR, Ennaceur A, Lees G, Obrenovitch TP, Chazot PL. (2009) A New Model for the Study of High-K(+) – Induced Preconditioning in Cultured Neurones: Role of N-methyl-d-aspartate and Alpha7 nicotinic Acetylcholine Receptors. J Neurosci Meth, 177: 311–316. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.10.012

16. Wang Q, Wang F, Li X, Yang Q, Li X, Xu N, Huang Y, Zhang Q, Gou X, Chen S, Xiong L. (2012) Electroacupuncture Pretreatment Attenuates Cerebral Ischemic Injury through α7 Nicotinic Acetylcholine Receptor-Mediated Inhibition of High-Mobility Group Box 1 Release in Rats. J Neuroinflammation, 26: 9–24. https://doi.org/10.1186/1742–2094–9–24

17. Jiang Y, Li L, Tan X, Liu B, Zhang Y, Li C. (2015) miR-210 Mediates Vagus Nerve Stimulation-Induced Antioxidant Stress and Anti-Apoptosis Reactions Following Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. J Neurochem, 134: 173–181. https://doi.org/10.1111/jnc.13097

18. Sun F, Johnson SR, Jin K, Uteshev VV. (2017) Boosting Endogenous Resistance of Brain to Ischemia. Mol Neurobiol, 54, 2045–2059. https://doi.org/10.1007/s12035–016–9796–3

19. Buchholz B, Kelly J, Muñoz M, Bernatené EA, Méndez Diodati N, González Maglio DH, Dominici FP, Gelpi RJ. (2018) Vagal stimulation mimics preconditioning and postconditioning of ischemic myocardium in mice by activating different protection mechanisms. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 314(6): H1289-H1297. doi: 10.1152/ajpheart.00286.2017.

20. Stoiljkovic M, Leventhal L, Chen A, Chen T, Driscoll R, Flood D, Hodgdon H, Hurst R, Nagy D, Piser T, Tang C, Townsend M, Tu Z, Bertrand D, Koenig G, Hajos M. (2015) Concentration-Response Relationship of the α7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonist FRM-17874 across Multiple in Vitro and inVivo Assays. Biochem Pharmacol, 97: 576–589. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.07.006

21. Stoiljkovic M, Kelley C, Nagy D, Leventhal L, Hajos M. (2016) Selective Activation of α7 Nicotinic Acetylcholine Receptors Augments Hippocampal Oscillations. Neuropharmacology, 110, 102–108. https://doi.org / 10.1016/j.neuropharm.2016.07.010

22. Alkondon M, Pereiral EFR, Cartes WS, Maelicke A, Albuquerque EX. (1997) Choline Is a Selective Agonist of a7 Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Rat Brain Neurons. Eur J Neurosci, 9, 2734–2742. https://doi.org/10.1111/j. 1460–9568.1997.tb01702.x

23. Hajos M, Hurst RS, Hoffmann WE, Krause M, Wall TM, Higdon NR, Groppi VE. (2005) The Selective alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonist PNU-282987 [N-[(3R) – 1-Azabicyclo[2.2.2] oct-3-yl] 4-chlorobenzamide hydrochloride] Enhances GABAergic Synaptic Activity in Brain Slices and Restores Auditory Gating Deficits in Anesthetized Rats. J Pharmacol Experim Ther, 312, 1213–1222. https://doi.org/10.1124/jpet.104.076968

24. Sams JrWM and Carroll NV. (1966) Cholinesterase Inhibitory Property of Dimethyl Sulphoxide. Nature, 212, 405. https://doi.org/10.1038/212405a0

УДК 577.218

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РНК-ШАПЕРОНА PROQ ИЗ ESCHERICHIA COLI И ЕГО ДОМЕНОВ С МАЛОЙ РЕГУЛЯТОРНОЙ РНК 3'ETS(LEUZ)

Н.В. Леконцева, А.О. Михайлина, А.Д. Никулин

Институт белка РАН, Пущино, Россия

Во всех доменах жизни малые регуляторные РНК являются важными участниками регуляции экспрессии генов. Для поддержания стабильности и правильного функционирования мрРНК часто необходимы специализированные РНК-связывающие белки, так называемые «РНК-шапероны». До недавнего времени единственными известными примерами таких белков у бактерий были CsrA и Hfq (Holmqvist et al., 2018). Недавно был найден еще один класс бактериальных белков – РНК-шаперонов. Это белки с доменом ProQ/FinO, которые также могут играть существенную роль в посттранскрипционной регуляции генов во всех бактериальных видах. Было показано, что у бактерий рода Salmonella белок ProQ может стабилизировать целый пул мрРНК (так называемый «regulon»), имеющихся в этих бактериях (Smirnov et al., 2016). Уровень экспрессии этих мрРНК и время их полужизни напрямую зависит от присутствия или отсутствия ProQ (Smirnov et al., 2016). Следует отметить, что ProQ из Salmonella enterica взаимодействует преимущественно с двуцепочечными участками РНК. Позднее авторами был описан механизм работы ProQ-зависимой мрРНК RaiZ, которая образует РНК-дуплекс с сайтом связывания рибосомы мРНК hupA, предотвращая синтез α-субъединиицы гистон-подобного белка HU (Smirnov et al., 2017). Однако для такого модельного объекта, как Escherichia coli, подобные исследования не проводились.

ProQ из Escherichia coli представляет собой белок с молекулярной массой ~ 25 кДа, который первоначально был описан как фактор осморегуляции, необходимый для оптимальной экспрессии белка пролинового канала ProP (Kunte et al., 1999). Биоинформационный анализ первичной структуры белка предсказал наличие двух доменов, которые гомологичны белкам FinO (N-концевой домен) и Hfq (C-концевой домен). В 2017 году с помощью метода ЯМР была определена структура ProQ из E. coli (Gonzalez et al., 2017). Результаты подтвердили предложенную FinO-подобную структуру N-концевого домена, но показали, что C-концевой домен содержит лишь часть мономера Hfq, представленного так называемым Тюдор-доменом, состоящим из пяти коротких β-тяжей. Согласно имеющимся биохимическим и структурным данным, N-концевой домен ProQ является основным при связывании РНК, хотя и линкер, и C-концевой домен также могут вносить свой вклад в РНК-белковое взаимодействие (Chaulk et al., 2011, Gonzalez et al., 2017).

Используя данные о мрРНК из Salmonella enterica, которые взаимодействуют с ProQ, нами был проведен биоинформатический поиск их гомологов в E. coli. Для дальнейших исследований была выбрана малая регуляторная РНК 3'ETS (LeuZ), длиной 67 нт. Эта мрРНК представляет собой внешнюю транскрибируемую спейсерную последовательность предшественника лейциновой тРНК. В 2015 году было показано, что данная РНК специфически связывается с мрРНК RyhB и RybB (Lalaouna et al, 2015). Мутации в 3'ETS (LeuZ), приводящие к уменьшению комплеменарности к мрРНК, вызывают многократное увеличение активности RyhB и RybB. Эти результаты свидетельствуют о роли 3'ETS (LeuZ) в качестве «молекулярной ловушки» или «губки», захватывающей эти мрРНК и предотвращая их взаимодействие со своими обычными партнерами. Мы решили проверить, является ли данная мрРНК целевой для белка ProQ в клетках Escherichia coli, а также определить вклад каждого из доменов при связывании белком РНК. Были взяты два варианта РНК – полноразмерный и укороченный. Укороченный фрагмент имеет длину 42 нт и содержит только шпильку, с которой предположительно связывается белок.

Экспрессию генов и очистку полноразмерного белка ProQ и его изолированных доменов проводили, как описано ранее (Nemchinova et al., 2017; Леконцева и др., 2018). Нуклеотидные последовательности вариантов РНК 3'ETS (LeuZ) были клонированы в вектор pUC18. РНК синтезировали с линеаризованных плазмид транскрипцией in vitro с помощью T7 РНК полимеразы. Очистку транскриптов проводили с помощью электрофореза в 10 % ПААГ в присутствии 8 М мочевины. Доочистку элюированной из геля РНК проводили анионообменной хроматографией на смоле DEAE-Sepharose.

Взаимодействие ProQ и его изолированных доменов с полученными вариантами 3'ETS (LeuZ) исследовали методом гель-шифта в полиакриламидном геле. РНК прогревали в течение 10 мин. при 70 °C, после чего охлаждали во льду, затем добавляли белки в молярном соотношении с РНК 2:1.

Полученный раствор выдерживали в течение часа при комнатной температуре. Для анализа изменения подвижности РНК-белковых комплексов в геле проводили электрофорез в 8 % ПААГ, который окрашивали красителем SYBR® Green I (рис. 1).

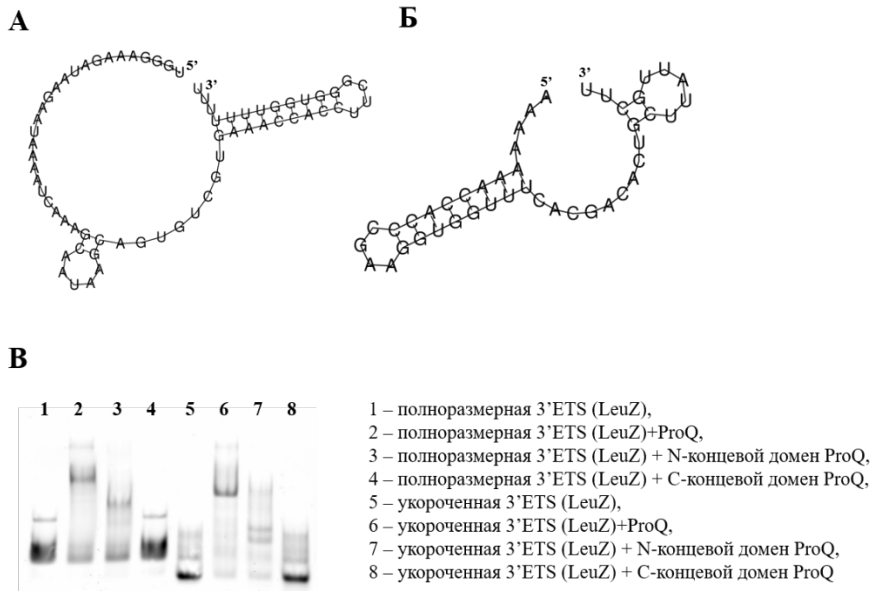


Рисунок 1 – Расчетная вторичная структура полноразмерной (А) и укороченной (Б) мрРНК 3'ETS (LeuZ) и электрофоретический анализ связывания 3'ETS (LeuZ) с белком ProQ и его изолированными доменами в неденатурирующих условиях (В)

Результаты показали, что полноразмерный ProQ связывает оба варианта мрРНК 3'ETS (LeuZ), что подтверждает предположение о том, что укороченный фрагмент содержит сайт связывания и может быть использован в дальнейшем для кристаллизации РНК-белкового комплекса. N-концевой домен, как и целый белок, связывает оба варианта РНК, а С-концевой домен с обеими мрРНК не взаимодействует. Полученные результаты подтверждают выдвинутую ранее гипотезу о том, что N-концевой домен определяет специфичность связывания РНК, а С-концевой домен играет вспомогательную роль и не обладает сродством к РНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18–34–00073.

ЛИТЕРАТУРА

Holmqvist E., Li L., Bischler T., Barquist L., Vogel J. (2018) Mol Cell 70(5) : 971–982.

Smirnov A et al. (2016). Grad-seq guides the discovery of ProQ as a major small RNA-binding protein. Proc Natl Acad Sci 113: 11591–11596.

Smirnov A, Wang C, Drewry LL, Vogel J. (2017). Molecular mechanism of mRNA repression in trans by a ProQ-dependent small RNA. EMBO J 36:1029–1045.

Kunte HJ, Crane RA, Culham DE, Richmond D, Wood JM. (1999). Protein ProQ influences osmotic activation of compatible solute transporter ProP in Escherichia coli K-12. J Bacteriol 81: 1537–1543.

Chaulk SG, et al. (2011) ProQ is an RNA chaperone that controls ProP levels in Escherichia coli. BioChemistry 50:3095–3106.

Gonzales GM, Hardwick SW, Maslen SL, Skehel JM, Holmqvist E, Vogel J, Bateman A, Luisi BF, Broadhurst RW. (2017). Structure of the Escherichia coli ProQ RNA-binding protein. RNA 23: 696–711.

Lalaouna D. et al. (2015) A 3' external transcribed spacer in a tRNA transcript acts as a sponge for small RNAs to prevent transcriptional noise. Mol Cell. 58(3): 393–405.

Nemchinova M., et al. (2017) An Experimental Tool to Estimate the Probability of a Nucleotide Presence in the Crystal Structures of the Nucleotide-Protein Complexes. Protein J. 36(3): 157–165.

Леконцева Н.В., Фандо М.С., Михайлина А.О., Коробейникова А.В., Никулин А.Д. (2018) Исследование взаимодействия РНК-шаперона ProQ из Escherichia coli и его доменов с малой регуляторной РНК rdlD. Актуальные вопросы биологической физики и химии 3(3): 651–653.

УДК 577.113.7; 577.112.7

НОВЫЙ МЕТОД ТЕРМИЧЕСКОЙ ДИССОЦИАЦИИ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ СЕЛЕКЦИИ ДНК-АПТАМЕРОВ

С.А. Лапа, Э.Н. Тимофеев, Г.С. Краснов, А.В. Чудинов

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

Аптамеры – одноцепочечные ДНК- и РНК-олигонуклеотиды, функциональные аналоги моноклональных антител, способные проявлять аффинное сродство к широкому спектру биомолекул. Аптамеры находят применение в клинической диагностике, в настоящее время предпринимаются попытки их использования в качестве самостоятельных терапевтических средств. Процесс отбора специфичных к индивидуальной мишени аптамеров из исходной комбинаторной ДНК-библиотеки именуется SELEX и представляет собой несколько повторяющихся раундов, состоящих из последовательных шагов: взаимодействие библиотеки одноцепочечных аптамеров с молекулярной (или клеточной) мишенью, отмывка несвязавшихся аптамеров, отбор связавшихся аптамеров, их амплификация и обратный перевод в одноцепочечную форму. Обогащенная таким образом библиотека вовлекается в следующий раунд селекции. Обычно в результате проведения раундов селекции получают несколько индивидуальных олигонуклеотидных последовательностей, специфичных к выбранной молекулярной мишени.

Существует несколько общепринятых методов проведения этапа взаимодействия библиотеки аптамеров с белковой мишенью: иммобилизация целевого белка на магнитных частицах, микрофлюидные технологии, разделение конъюгата аптамеров с белком методом электрофореза и другие.

Нами разработан метод термической диссоциации обогащенных библиотек аптамеров (ТДА) из электрофорезного геля после коньюгации с их белковой мишенью. В качестве целевого белка использован альфа-фетопротеин человека, являющийся маркером пре- и неонатальных заболеваний, а также онкомаркером некоторых видов рака. В предлагаемом методе изначально проводится от пяти до десяти раундов селекции с иммобилизованным целевым белком (альфа-фетопротеином). После этого обогащенная библиотека конъюгируется со свободным целевым белком в микромолярных концентрациях и полученный конъюгат подвергается электрофоретическому разделению в акриламидном геле. Данный этап позволяет исключить несвязавшиеся с белком аптамеры. Затем осуществляется элюция из соответствующего участка геля связавшихся аптамеров в водный раствор 2 %-ного перхлората лития с сохранением микромолярных концентраций аптамеров и их мишени. Это позволяет сохранить неразрушенные комплексы наиболее специфичных аптамеров с целевым белком, но удалить аптамеры с низким сродством к мишени. После этого производится термическая диссоциация комплексов при температуре 60 °С и элюция наиболее высокоспецифичных аптамеров. Обогащенная библиотека амплифицируется и подвергается термической диссоциации после конъюгации с мишенью еще дважды. В результате получается обогащенная высокоспецифичными аптамерами библиотека, готовая к проведению секвенирования для определения индивидуальных нуклеотидных последовательностей.

На рис. 1 представлена электрофореграмма, показывающая образование конъюгата обогащенной одноцепочечной ДНК-библиотеки (оцДНК-библиотека) с целевым белком – альфа-фетопротеином человека (АФП) после проведения пяти раундов селекции на магнитных частицах и трех раундов ТДА. В эксперименте были использованы модифицированные библиотеки аптемеров, с введенными по 5-положению пиримидинового цикла различными заместителями (обозначены как $dUTP_3$ и $dUTP_6$) [1].

После обогащения библиотек было проведено их секвенирование методом NGS и получены индивидуальные последовательности аптамеров. С помощью программы FASTQC проведена оценка качества полученных прочтений, из анализа были удалены последовательности некорректной длины и последовательности, содержащие «мисматчи» в более чем одной букве в области региона, связывающегося с праймером. Фланкирующие последовательности праймеров удаляли с помощью программы Trimmomatic [2]. Компьютерный биоинформатический анализ результатов секвенирования проводили, используя программу FASTAptamer [3]. С помощью подхода FASTAptamer-Enrich проводили обогащение последовательностей, присутствующих во всех образцах технических повторов. Кластеры «родственных» последовательностей получали с помощью алгоритма FASTAptamer-Cluster для k-меров различной длины (от 6 до 14 нт).

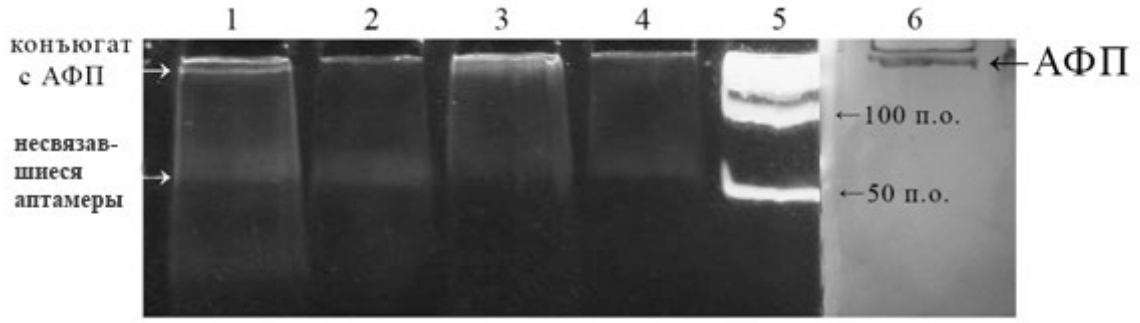


Рисунок 1. – Электрофореграмма, показывающая разделение конъюгатов аптамеров с белком от несвязавшихся аптамеров. 1 – конъюгат оцДНК-библиотеки (dUTP3) с АФП; 2 – оцДНК-библиотека (dUTP3); 3 – конъюгат оцДНК-библиотеки (dUTP6) с АФП; 4 – оцДНК-библиотека (dUTP6); 5 – маркер длин ДНК «GeneRuler 50 bp»; 6 – АФП. Лунки 1 – 5, окрашивание бромидом этидия. Лунка 6 – окрашивание «кумасси блю»

На основе этих данных выбирали индивидуальные последовательности с функционально-значимыми мотивами. Показана отчетливая кластеризация отобранных аптамеров с применением метода ТДА. Полученные кластеры аптамеров приведены на рис. 2.

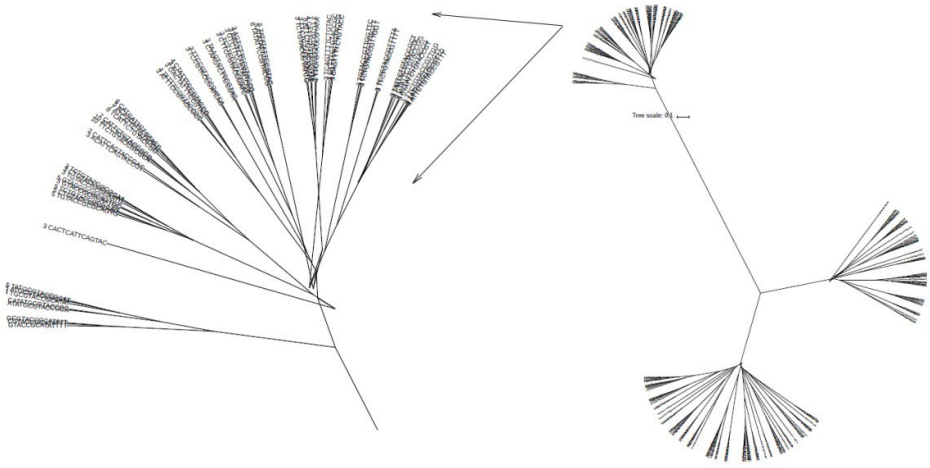


Рисунок 2. – Применение методов биоинформатики для поиска функционально-значимых консервативных мотивов, присутствующих в высокоспецифичных аптамерах

Таким образом, показано обогащение ДНК-библиотек с помощью разработанного метода и возможность его применения для проведения SELEX к белковым мишеням, в том числе с использованием модифицированных нуклеотидов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (соглашение № 14.576.21.0096, уникальный идентификатор проекта RFMEFI57617 x 0096).

ЛИТЕРАТУРА

1. Лапа С.А. и др. Получение модифицированных комбинаторных ДНК-библиотек методом ПЦР в обратной эмульсии с последующим разделением цепей. Молек. биол. (2018) 52, 984–996.

2. A.M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics (2014) 30, 2114–2120.

3. K.K. Alam, J.L. Chang, D.H. Burke. FASTAptamer: A Bioinformatic Toolkit for High-throughput Sequence Analysis of Combinatorial Selections. Mol. Ther. Nucleic Acids (2015) 4, e230.

УДК 628.355.3

ВЛИЯНИЕ ЭРИТРОМИЦИНА НА ВИДОВОЙ СОСТАВ БИОЦЕНОЗА АКТИВНОГО ИЛА

З.Е. Мащенко, В.В. Бахарев

Самарский государственный технический университет, Самара, Россия

Антибиотики широко применяют для профилактики и лечения бактериальных инфекций, поражающих человека, животных и растения. Так же антибиотики используют в животноводстве, как стимуляторы роста. Как следствие, они в огромном количестве попадают в природу со сточными водами из фармацевтических компаний, с сельскохозяйственными и промышленными отходами. На свалках оказываются горы просроченных или неиспользованных лекарств.

Научно доказано, что антибиотики в существенных концентрациях можно обнаружить во многих водоёмах, осадочных породах и почвах планеты. Наша окружающая среда всё в большей мере становится резервуаром резистентных болезнетворных микроорганизмов и противомикробных веществ [1, 2].

Несмотря на то, что технический прогресс все время шагает вперед, справиться с подобного рода химическими веществами могут немногие фильтры для воды. Кроме того, установлено, что стандартная процедура по хлорированию воды не только не устраняет подобные загрязнения, но, наоборот, увеличивает их токсичность.

Самым эффективным и не дорогостоящим методом очистки, в настоящее время, является биологический метод очистки сточных вод, в частности очистка активным илом.

Активный ил – биоценоз зоогенных скоплений бактерий и простейших организмов. Метод биологической очистки основан на способности некоторых видов микроорганизмов, в определённых условиях, использовать загрязняющие вещества в качестве своего питания.

В процессе очистки сточных вод, лекарственные средства удаляются не эффективно и при поступлении в водоисточники могут негативно влиять на состояние живых организмов [3].

Цель исследовательской работы – изучение влияния цефазолина на видовой состав биоценоза активного ила при однократном и многократном действии антибиотика.

В качестве тест-организмов в экспериментах использовали активный ил городских очистных сооружений г. Самара.

В качестве модельного антибиотика в исследованиях использовали эритромицин. Эритромицин – первый природный 14-ти членный макролидный антибиотик.

Для исследования видового состава биоценоза активного ила использовали метод «раздавленная капля» при увеличении 1000Х. При изучении микробиологических препаратов учитывали количество гидробионтов активного ила, их общее состояние, а также параметры характеризующие качество флока: форма (степень округлости), четкость контура, структура [3, 4].

Инкубацию антибиотиков с активным илом проводили в течение 72 часов при температуре 25° С в следующих условиях (табл. 1).

Таблица 1 Условия инкубирования активного ила

№ пробы	Эритромицин
1	Нет
2	Да (С = 100 мг/г биомассы активного ила, однократно)
3	Да (С = 100 мг/г биомассы активного ила, ежедневно в течение 3 суток)

Данные влияния антибиотика на микроорганизмы активного ила при однократном добавлении эритромицина представлены в табл. 2.

В течение всего периода инкубации флок ила имел округлую форму, четкий контур и плотную структуру. Через 24 часа инкубации в опытной пробе, по сравнению с контрольной, отсутствовали Flagellata, нитчатые, Nematoda, Oligichaeta. После 48 часов инкубации в опытной пробе наблюдалось отсутствие Oligichaeta, но при этом присутствовали Epistylis. По истечении 72 часов инкубации в опытной пробе наблюдались Flagellata, Vaginicola, появились тихоходки. Исходя из полученных данных, следует, что активный ил на протяжении всего периода наблюдения имел удовлетворительный микробиологический состав.

Данные влияния антибиотика на микроорганизмы активного ила при многократном добавлении эритромицина представлены в табл. 3.

Таблица 2 Видовой состав микроорганизмов активного ила при однократном добавлении эритромицина

Время инкубации, ч	Видовой состав	Количество организмов	
		Контрольная проба	Опытная проба
24	Amoeba	–	–
	Testacea	п	п
	Flagellata	м	–
	Нитчатые	ед.	–
	Rotaria	п	п
	Vaginicola	м	м
	Панцирные	п	п
	Epistylis	–	п
	Nematoda	ед.	–
	Oligichaeta	ед.	–
48	Amoeba	–	–
	Testacea	п	п
	Flagellata	–	–
	Нитчатые	–	–
	Rotaria	м	ед
	Vaginicola	–	–
	Панцирные	м	м
	Epistylis	–	п
	Nematoda	–	–
	Oligichaeta	ед.	–
72	Amoeba	–	–
	Testacea	п	п
	Flagellata	–	м
	Нитчатые	–	–
	Rotaria	–	–
	Vaginicola	–	р
	Aspidisca	п	п
	Панцирные	–	–
	Epistylis	–	–
	Nematoda	–	–
	Oligichaeta	–	–
	Тихоходка	м	м

Примечание: ед – единично, м – мало, р – редко, п – порядочно, «–» отсутствуют

При многократном введении эритромицина через 48 часов инкубации ил становился рыхлым, контур флока был нечеткий. Наблюдалось уменьшение видового состава микроорганизмов. Микроорганизмы в ходе эксперимента, в виду неблагоприятных для них условий, погибали.

Таким образом, микробиологические показатели свидетельствуют о негативном воздействии на микроорганизмы активного ила в результате многократного введения 100 мг эритромицина на 1 г биомассы активного ила. Установлено, что при однократном введении антибиотика такое воздействие не наблюдалось, микробиологический состав был удовлетворителен, не наблюдалось помутнение надиловой жидкости, как в многократном введение, флок имел округлую форму, четкий контур и плотную структуру.

Таблица 3 Видовой состав микроорганизмов активного ила при многократном добавлении эритромицина

Время инкубации, ч	Видовой состав	Количество организмов	
		Контрольная проба	Опытная проба
24	Amoeba	–	–
	Testacea	п	п
	Flagellata	–	м
	Нитчатые	–	–
	Rotaria	–	–
	Vaginicola	–	ед.
	Aspediska	п	п
	Панцирные	–	–
	Epistylis	–	–
	Nematoda	ед.	–
	Oligichaeta	–	–
	Тихоходка	–	м
48	Amoeba	–	–
	Testacea	п	–
	Flagellata	–	–
	Нитчатые	–	–
	Rotaria	м	–
	Vaginicola	–	–
	Панцирные	–	–
	Epistylis	–	–
	Oligichaeta	–	–
	Тихоходка	ед.	–
72	Amoeba	–	–
	Testacea	п	–
	Flagellata	–	–
	Нитчатые	м	–
	Rotaria	м	–
	Vaginicola	–	–
	Aspediska	–	–
	Панцирные	–	–
	Epistylis	–	–
	Nematoda	–	–
	Oligichaeta	–	–
	Тихоходка	ед.	–

Примечание: ед – единично, м – мало, п – порядочно, «–» отсутствуют

ЛИТЕРАТУРА

1. Lindberg, R.H. Screening of human antibiotic substances and determination of weekly mass flows in five sewage treatment plants in Sweden / R.H. Lindberg, P. Wennberg, M.I. Johansson et all // Environ. Sci and Technol. – 2005. – Vol. 39. – № 10. – P. 3421–3429.

2. Маслова, Е.В. Лекарственные препараты в окружающей среде / Е.В. Маслова, З.Е. Мащенко, И.Ф. Шаталаев // Аспирантский вестник Поволжья. -2017. – № 1–2. – С. 215–217.

3. Демина, М.В. Рекомендации по проведению гидробиологического контроля на сооружениях биологической очистки с аэротенками. Методическое пособие // Пермь: ОГУ «Аналитический центр», 2004. – 52 с.

4. ПНД Ф СБ 14.1.77–96. Методическое руководство по гидробиологическому и бактериологическому контролю процесса биологической очистки на сооружениях с аэротенками. – М.: АКВАРОС, 2009. – 106 с.

УДК 616.36–003.826:616.153–008.843.6

УРОВЕНЬ ЖЕЛЧНЫХ КИСЛОТ ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ПАТОЛОГИИ ПЕЧЕНИ

А.Х. Кодиров, Н.Ю. Самандаров, Х.С. Рахимова, Г.З. Пиров, Н.Б. Бораджабова

Гастроэнтерология, Душанбе, Таджикистан
АМН МЗ и СЗН Республики Таджикистан, Душанбе, Таджикистан
Институт химии им. В.И. Никитина, Душанбе, Таджикистан

В последние годы неуклонно возрастает число исследований, посвященных роли желчных кислот в организме человека. Так как от нехватки или повышенного содержания желчных кислот в сыворотке крови всегда наблюдается обострение различных патологических состояний больных.

Многие исследования затруднялись в объяснении развития многих заболеваний особенно при неврологии [1], пульмонологии [2], гематологии [3], кардиологии [4], эндокринологии [5] и ряда других болезней печени [6].

Особенно изменения содержания желчных кислот наблюдается при неалкогольной жировой болезни печени (НЖБП). В данном случае поражение печени протекает с развитием стеатоза, стеатогепатита, фиброза и цирроза, что касается механизма поведения желчных кислот в этом направлении неизвестно.

В связи с этим, цель и задачи нашего исследования были направлены на оценку содержания желчных кислот в крови при различных патологиях печени. Целью исследования было установление содержания желчных кислот в сыворотке крови 30-здоровых людей, 15 больных хроническим холециститом, 15 больных хроническим активным гепатитом, 10 больных хроническим персистирующим гепатитом, 28 больных циррозом печени, 24 больных стеатозом печени I-стадии, 40 больных стеатозом II-стадии, 18 больных стеатозом III-стадии и 30 больных стеатогепатитом. Анализ проводился методом газожидкостной хроматографией. В качестве внутреннего стандарта использована 3α, 7α-дигидрокси-12-кето-5β-холановая кислота.

Для выполнения этой задачи, нами была исследована сыворотка крови 30 практически здоровых людей в возрасте от 22 до 52 лет, среди которых 18 женщин и 12 мужчин.

Содержание сывороточных желчных кислот определяли газохроматографическим мето – дом. У здоровых людей составило ЛХК -0,0010; ДХК – 0,0033; ХДХК – 0,0066; ХК – 0,0068 мг/мл.

Далее рассматривали содержание желчных кислот сыворотки крови больных холециститом в зависимости от особенности сократительной функции желчного пузыря, в сравнении, с данными у здоровых лиц.

Больным и здоровым лицам проводили полное клиническое обследование, диагноз был документирован другими методами и исследованиями.

Газохроматографический анализ содержания желчных кислот в сыворотке крови у больных с хроническим холециститом, с нарушением сократительной способности желчного состава желчных кислот показал, что в данном случае концентрация желчных кислот больных с указанной патологией оказались значительно выше, чем у лиц контрольной группы.

Надо отметить, что причина повышения желчных кислот – это попадание их в системный кровоток путем экстрапортальной циркуляции вследствие абсорбции через воспаленную стенку желчного пузыря.

В данном случае общая концентрация желчных кислот достоверно повышается ($P < 0,001$) и составляет: (ЛХК – 0,039 ± 0,006; ДХК – 0,10 ± 0,008; ХДХК – 0,09 ± 0,01; Дег. ХК – 0,029 ± 0,006; ХК – 0,18 мг/мл) (Таблица).

Эти данные показывают, что в условиях застоя желчных кислот при образованиим холевой кислоты, как правило, преобладает над синтезом хенодезоксихолевой кислоты. Повышение концентрации холевой кислоты способствует в печени резсинтезу дезоксихолевой кислоты и переходу его к холевой.

Известно, что дезоксихолевая кислота синтезируется в кишечнике из холевой [7]. Уровень дезоксихолевой кислоты у больных хроническим холециститом, с уменьшением моторной функции желчного пузыря увеличивается из-за возрастания выброса холевой кислоты в кишечник, в связи с синтезом дезоксихолевой кислоты в самой печени.

Из приведенных анализов можно отметить, что при холециститах нарушается процесс холатообразующей функции печени, при такой ситуации степень нарушения ее коррелирует с нарушительным поведением моторной функции желчного пузыря. Такой вариант изменения содержания желчных кислот у больных холециститом свидетельствует о функциональном состоянии гепатоцитов. Далее, нами, было исследовано содержание желчных кислот в зависимости от поражения печени при гепатитах.

Определение содержания желчных кислот и их соотношение в сыворотке крови имеет важное диагностическое значение в оценке функционального состояния гепатоцитов [8]. При проведении газохроматографического исследования выявлено, что выраженное повышение содержания желчных кислот в сыворотке крови наблюдалось у больных хронически активным гепатитом.

В этом случае, суммарное количество желчных кислот составило 0,22 ± 0,02 мг/мл. (ХК – 0,071 ± 0,017, ХДХК – 0,048 ± 0,001; ДХК – 0,072 0,07; Дег. ХК -0,016 ± 0,005; ЛХК – 0,013 ± 0,03 мг/мл).

Повышение содержания желчных кислот в сыворотке крови у пациентов хронически активным гепатитом произошло за счет увеличения всех фракций кислот, по-видимому, вследствие нарушения синтетической и секреторной деятельности гепатоцитов. Установление концентрации желчных кислот является самый высокочувствительным тестом в распознавании раннего периода поражения печени. (табл. и рис).

Таблица. Содержание желчных кислот (M ± m) в сыворотке крови при различной патологии печени мг/мл.

Больные									
Желчные кислоты	Контроль (n = 30)	Хронический холецистит (n = 25)	Хронически актив гепатит (n = 15)	Хронически персистирующий гепатит (n = 6)	Цирроз печени (n = 28)	Стеатоз			Стеатогепатит n = 31
						I Стадия (n = 24)	II Стадия (n = 39)	III Стадия (n = 13)	
ЛХК	0,0010	0,039 ± 0,006	0,013 ± 0,003	0,011 ± 0,003	0,009 ± 0,001	0,19 ± 0,03	0,28 ± 0,04	0,31 ± 0,04	0,38 ± 0,04
ДХК	0,0030	0,10 ± 0,008	0,072 ± 0,07	0,038 ± 0,004	0,064 ± 0,005	0,48 ± 0,04	0,59 ± 0,04	0,89 ± 0,04	0,41 ± 0,03
ХДХК	0,0066	0,089 ± 0,001	0,048 ± 0,02	0,037 ± 0,005	0,052 ± 0,005	0,95 ± 0,07	0,88 ± 0,01	0,93 ± 0,1	1.1 ± 0,1
Дег. ХК	0,003	0,029 ± 0,006	0,015 ± 0,005	0,015 ± 0,009	0,012 ± 0,002	0,09 ± 0,02	0,22 ± 0,04	0,85 ± 0,01	0,15 ± 0,001
ХК	0,0068	0,18 ± 0,03	0,071 ± 0,01	0,036 ± 0,006	0,091 ± 0,001	5,5 ± 0,4	6,0 ± 0,04	7.3 ± 0,09	11.7 ± 0,8

Что касается пациентов с диагнозом хроническим персистирующим гепатитом, то содержание сывороточных желчных кислот оказалось сравнительно низким -0,13 ± 0,001 мг / мл (ХК – 0,036 ± 0,006; ХДХК – 0,037 ± 0,004; ДХК – 0,038 ± 0,005; Дег. ХК – 0,015 ± 0,009 и ЛХК 0,011 ± 0,003 мг/мл).

Исследовано содержание желчных кислот в сыворотке крови у 28 больных циррозом печени различной этиологии. Наряду с этим проводилось исследование по определению функционального потенциала печени.

В дальнейшем, нами, был проведён анализ желчных кислот в сыворотке крови у больных с циррозом печени. Результаты исследования показали, что содержание желчных кислот повышалось и составило: (ХК – 0,091 ± 0,01; ХДХК – 0,052 ± 0,005; ДХК – 0,064 ± 0,005; Дег. ХК – 0,012 ± 0,002 и ЛХК – 0,009 ± 0,001 мг/мл.).

Надо отметить, что газохроматографическое определение содержания желчных кислот в сыворотке крови даёт ценную информацию о функциональном состоянии гепатоцитов и в том, что уровень их в периферической крови во многом зависит от степени выраженности патологического процесса в печени при гепатите и циррозе. Дальнейшее, наше, исследование посвящено определению содержания желчных кислот в сыворотке крови у больных жировой болезни печени.

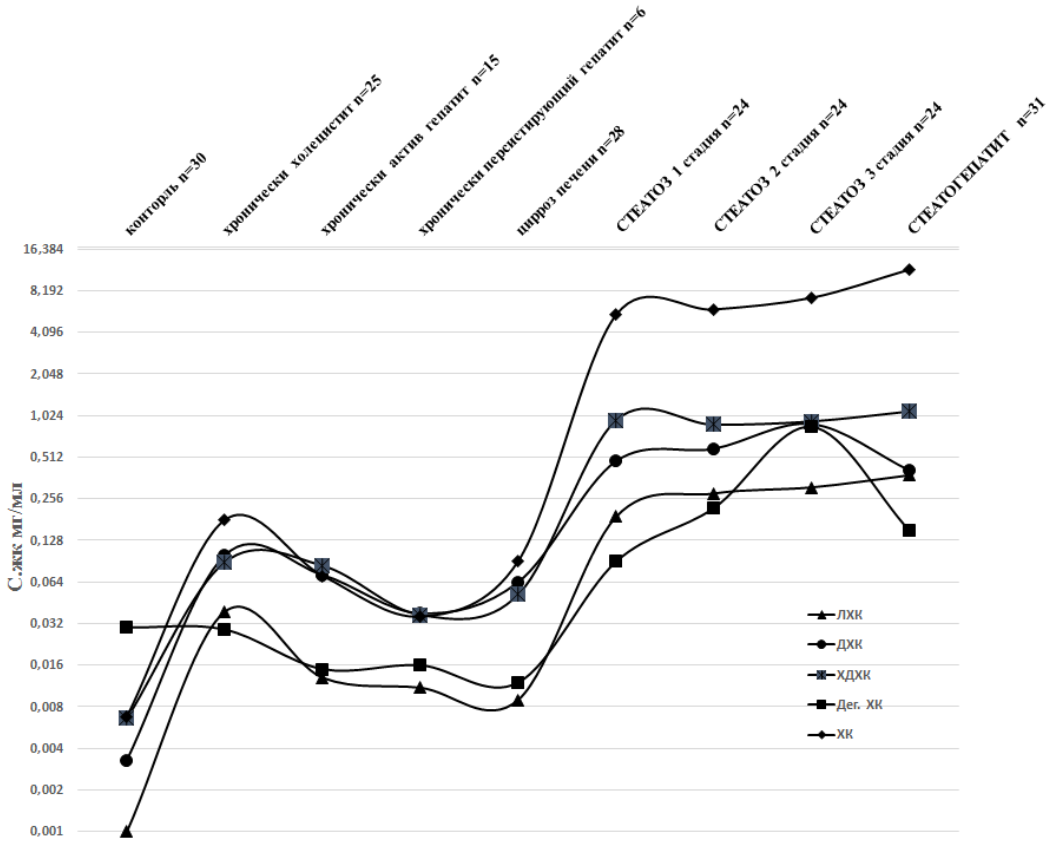


Рис. График зависимости содержания желчных кислот от заболеваемости

Известно, что неалкогольная жировая болезнь печени это систематическое развитие поражения печени начиная от стеатоза, стеатогепатита, фиброза до цирроза. [9]

Существует мнение о том, что при усилении синтеза высших жирных кислот в печени и при злоупотреблении алкоголем происходит уменьшение резерва желчных кислот на фоне лечения рядом препаратов. [10]

Надо отметить, что при жировой болезни печени увеличивается литогенность желчи. Это происходит при недостаточной секреции фосфолипидов или объясняется тем, что нарушается синтез первичных желчных кислот из холестерина и одновременно происходит изменение пропорции первичных и вторичных желчных кислот в сторону повышения пула малорастворимой дезоксихолевой кислоты.

Это мнение обусловлено перспективностью развития широких исследований по выявлению существующей связи между химическими свойствами холестерина, желчных и жирных кислот, а также других компонентов желчи на примере триглицеридов желчи и сыворотки крови, включая их трансформацию и методы определения.

В связи с этим, наши исследования направлены на определение содержания желчных кислот в сыворотке крови у больных жировой болезнью печени с целью того, что морфология жировой болезни печени не позволяет конкретно определить степень участия желчных кислот в развитии этой болезни.

Важно отметить, что преимущество данного прохода к диагностике жировой болезни печени заключается в том, что сдвиги в содержании желчных кислот в сыворотке крови у больных стеатозом на различных стадиях и стеатогепатитом наступают раньше, чем другие показатели изменения функционального потенциала печени, в связи с чем, они являются более информативными тестами. Материалом исследования служили данные клинико-биохимических исследований 107 больных ЖБП, из которых были женщины и 47 мужчин в возрасте от 45 до 70 лет. У 78 больных установлен диагноз стеатоза печени на различных стадиях его развития, и у 31-больного стеатогепатит [11].

Содержание желчных кислот в сыворотке крови у больных стеатозом печени и стеатогепатитом приведены в таблице.

Как видно из таблицы содержание всех пяти желчных кислот у больных с различными стадиями стеатоза печени оказался значительно выше. При этом содержание литохолевой кислоты составляет 0,19 ± 0,03; дезоксихолевой кислоты 0,48 + 0,004, ХДХК – 0,95 ± 0,07; дегидрохолевой кислоты 0,09 ± 0,02 и холевой кислоты 5,5 ± 0,4 мг/мл по сравнению с контрольной группой (табл).

Газохроматографический анализ желчных кислот показывает, что при второй стадии стеатоза печени происходит увеличение содержания вторичных желчных кислот. Составляет: литохолевая кислота 0,28 ± 0,04; дезоксихолевая 0,59 мг/мл, а холевая кислота повышается до 6,0 ± 0,04 мг/мл. в тоже время содержание хенодезоксихолевая кислота умерено снижается до 0,88 ± 0,1 мг/мл. что касается дегидрохолевой кислоты, то уровень достигает до 0,22 ± 0,04 мг/мл.

На третьей стадии стеатоза по сравнению с контрольной группой, происходит повышение концентрации литохолевой – 0,31 ± 0,04; дезоксихолевой – 0,89 ± 0,07; хенодезоксихолевой – 0,93 ± 0,1; дегидрохолевой – 0,85 ± 0,02 и холевой кислот повышается до 7,3 ± 0,09 мг/мл.

Эти данные свидетельствуют о том, что на стадии стеатоза печени желчь всегда пересыщается холестерином. При жировой болезни печени увеличивается литогенность желчи.

Надо отметить, что при недостаточной секреции фосфолипидов происходит перенасыщение холестерина и это способствует повышение уровня холестерина. При это идет нарушение синтеза первичных желчных кислот из холестерина и происходит баланс соотношения первичных и вторичных желчных кислот, в сторону малорастворимой дезоксихолевой кислоты.

Из проведенных исследований можно отметить, что на стадии стеатоза печени происходит нарушение синтеза желчных кислот в зависимости от тяжести заболеваемости и их содержание действительно влияет на развитие жировой болезни печени. При увеличении содержания натриевых солей желчных кислот и фосфатидилхолина уровень холестерина повышается, при этом усиливается от него синтез первичных желчных кислот особенно холевой и хенодезоксихолевой кислот. Это дает возможность повышению концентрации холевой и хенодезоксихолевой кислот в сыворотке крови у больных стеатозом печени на третьей стадии.

Другая причина повышения уровня желчных кислот в сыворотке крови у больных стеатозом печени и стеатогепатитом можно обосновать тем, что желчные кислоты соединяются с высшими жирными кислотами, образуя растворимые в воде комплексы (холиеновые кислоты), которые поступают в стенку кишечника и в эпителиальные клетки кишечных ворсинок, вновь распадаются на желчные и жирные кислоты.

Теперь рассмотрим результаты газохроматографического анализа содержания желчных кислот в сыворотке крови у больных стеатогепатитом, уровень которых продолжает расти по мере прогрессирования неалкогольной жировой болезни печени.

Как видно из данных таблицы, содержание литохолевой кислоты немного увеличивается и доходит до 0,38 ± 0,04 мг/мл. Дезоксихолевая кислота составляет 0,41 ± 0,03 мг/мл. Что касается холевой и хенодезоксихолевых кислот, то их содержание намного повышается и составляет 1,1 ± 0,1; 11,7 ± 08мг/мл.

Причиной незначительного присутствия содержания дезоксихолевой и литохолевой кислот, а также повышение концентрации первичных желчных кислот на примере холевой и хенодезоксихолевой кислот при развитии жировой болезни печени можно объяснить следующим образом. Свободный или этерифицированный холестерин секретируется активно, в желчь, а в желчные канальцы его переносит специальный насос [12].

Известно, что холестерин не растворим в воде, его присутствие в жидкой фракции желчи однозначно зависит от концентрации эмульгирующих солей желчных кислот и фосфолипидов, особенно фосфатидилхолина. Эти процессы способствуют увеличению содержания растворенного холестерина и легко переходит, в русло крови больных жировой болезнью печени.

При жировой болезни печени, начиная от стадии стеатоза печени до стеатогепатита нарушается процесс энтерогепатической циркуляции желчных кислот.

В последние десятилетия доказана роль энтерогепатической циркуляции желчных кислот в развитии жировой болезни печени. В данном случае особое значение в нарушении энтерогепатической циркуляции желчных кислот придается кишечной микрофлоре. При нарушенной

ЭГЦ желчных кислот лишь небольшая их часть теряется с фекалиями. Поэтому содержание вторичных желчных кислот на примере литохолевой и дезоксихолевой кислот при ЖБП в случае стеатогепатита незначительны.

На основе полученных газохроматографических данных получен график зависимости содержания желчных кислот от различных стадиях поражения печени. (Рис.)

Таким образом, газохроматографическим методом определено содержаниежелчныхкислот в сыворотке крови пациентов различной патологии печени и установлено, что у них статистически значимо выше, чем у здоровых людей. В результате проведенных анализов, нами, установлено, что в сыворотке крови у больных холециститом содержание желчных кислот составляет: ЛХК – 0,039 ± 0,0006; ДХК – 0,10 ± 0,008; ХДХК – 0,089 ± 0,01; Дег. ХК – 0,029 ± 0,006; ХК – 0,18 ± 0,18 ± 0,03 мг/мл. Всесторонне изучено содержание желчных кислот в сыворотке крови у больных хроническим гепатитом и циррозом печени. Выявлено, что при хронически активном гепатите содержание желчных кислот составляет: ЛХК – 0,013 ± 0,003; ДХК – 0,072 ± 0,07; ХДХК – 0,048 ± 0,01; Дег. ХК – 0,015 ± 0,005; ХК – 0,071 ± 0,01 мг/мл., у больных хронически персистирующий гепатитом составляет: ЛХК – 0,011 ± 0,003; ДХК – 0,038 ± 0,005; ХДХК – 0,037 ± 0,004; Дег. ХК – 0,016 ± 0,005; ХК – 0,0036 ± 0,006 мг/мл. У больных циррозом составляет: ЛХК – 0,009 ± 0,001; ДХК – 0,064 ± 0,005; ХДХК – 0,052 ± 0,005; Дег. ХК – 0,012 ± 0,002; ХК – 0,091 ± 0,01 мг/мл. Статистически значимая разница в содержании желчных кислот в сыворотке крови между пациентами со стеатозом печени на различных стадиях и стеатогепатитом существует в отношении первичных, вторичных и третичных желчных кислот. Так, при стеатозе печени в сравнении со стеатогепатитом уровень всех желчных кислот повышается. Концентрация первичных желчных кислот при стеатогепатите заметно увеличивается.

ЛИТЕРАТУРА

Parry G.J. Safety, tolerability and cerebrospinal fluid penetration of ursodeoxycholic acid in patients with amyotrophic lateral sclerosis / G.J. Parry, C.M. Rodriguez. M.M. Aranha et.al //Cein / Neuropharmacol.2010 – Vol.33, #1 / P.17–21.

Wang F., Zhao C., Tian Y., Yin Y., Effect of high blood levels of bile acid on respiratory functions of New Zealand rabbits // Nan Fang Yi Ke Da Xue, Xue Bao-2013-Vol 33, № 8. – P.1181–1184.

Magnusson M., Fischer B., Svensson J. et, al. Bile acids and coagulation factors: paradoxical association in children with chronic liver disease //Eur. J. Gastroenterol. Hepatol-2013-Vol.25, N2. – P-152–158.

Rainar P.P. Primessing U., Harenkamp S. et.al. Bile acids induce arrhythmias in human atrial myocardium-implications for serum bile acid composition in patients with atrial fibrillation // Heart – 2013 – Vol.99, N22. – P.1685–1692.

Taylor D.R. Alaghband – Zadeh J, Cross G.F. et.al. Urine bile acids relate to glucose control in patients with type 2 diabetes mellitus and body mass index below 30kg / m^2 // PLos One – 2014 – Vol.9, N4. – P.93 540

Буеверов А.О., Богомолов П.О., Маевская М.В. Патогенетическое лечение неалкогольного стеатогепатита: обоснование, эффективность, безопастность // Тер.архив – 2007 – Т 79. № 8 – С. 88–92.

Ильченко А.А. Синдром избыточного бактериального роста в тонкой кишке этиология, патогенез клинические проявления. А.А. Ильченко, Т.А. Мечетина // Эксперим и клин. гастроэнтерол-2009 № 5 – С. 99–109.

Fischer B., Bodin K., Stjernman H., et.al. Cholestatic liver discase in adults may be due to an inherited detect in bile acid biosynthesis // J. Intern. Med. – 2007 – Vol. 262-P. 254–262.

Абдурахмонов Д.Т. Алкогольная болезнь печени // Российский журнал гастроэнтерол, гепатол., колопроктол. – 2007 – Т-17 – № 6 с. 1–11.

Вовк, Е.И. Жировая болезнь печени в практике терапевта (Е.И. Вовк, Е.Ю. Тихоновская, А.Н. Комаровский // Терапевт, 2010 – № 4 – С. 5–17.

Мироджов Г.К. Влияние урсодезоксихолевой кислоты на содер-жание желчных кислот при неалкогольной жировой болезни печени / Г.К. Мироджов, Н.А. Алимова, А.Х. Кадыров, З.Н. Расулова, // Здравоохранение Таджикистана 2017. – № 4. – С. 19–24.

Marschall H.U. Gallston disease / H.U. Marschall, C. Einarsson //Journal of internal Medicine, 2007 2 // P/529–542.

УДК 578

СВЕРХРАННИЕ БЕЛКИ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСА УЧАСТВУЮТ В УСТАНОВЛЕНИИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ПРОТИВООПУХОЛЕВОМУ АНТИБИОТИКУ ДОКСОРУБИЦИНУ ИНФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК ЛЕЙКЕМИИ THP-1

Я.Ю. Чернорыж, К.И. Юрлов, Р.А. Симонов, Н.Е. Федорова, А.А. Кущ.

НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, РФ

Устойчивость опухолей к противоопухолевой терапии – актуальная проблема современной науки и здравоохранения. Резистентность к противоопухолевым препаратам не только снижает эффективность лечения злокачественных новообразований, но и способствует возникновению метастазов. В опухолях человека различного происхождения часто обнаруживаются гены цитомегаловируса человека (ЦМВ) [1]. Для определения вклада ЦМВ в установлении резистентности к противоопухолевым препаратам необходимо выяснить молекулярные механизмы действия вирусных факторов, участвующих в возникновении устойчивости. Однако в настоящее время данных, полученных при изучении этой проблемы, недостаточно.

Цель настоящей работы состояла в изучении влияния цитомегаловирусной инфекции на развитие резистентности к антибиотику доксорубицину клеток лейкемии человека THP-1 и в анализе вклада вирусных белков в выживание инфицированных клеток, обработанных доксорубицином.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали клетки THP-1, выделенные от больного острой моноцитарной лейкемией [2]. Клетки культивировали в среде RPMI с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки в атмосфере 5 % CO_2. Клетки заражали цитомегаловирусом человека (ЦМВ) штамм AD169. Присутствие ДНК ЦМВ выявляли методом ПЦР в реальном времени, экспрессию вирусных генов UL122, UL83, UL54, UL138 и UL82 – ОТ-ПЦР, белок ЦМВ IE1-p72 – методом иммуноблоттинга (ИБ). Чувствительность к доксорубицину, применяемому для лечения широкого спектра онкологических заболеваний [3], оценивали по влиянию на жизнеспособность клеток THP-1, которую анализировали с помощью микротетразолиевого теста (MTT) [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клетки THP-1 заражали ЦМВ (5 БОЕ/кл) и на 1, 7 и 14 сут определяли содержание вирусной ДНК методом ПЦР. Через 1 сут после инфицирования (с.п.и.) содержание вирусной ДНК составляло 15 ± 6 копий/кл и не изменялось в течение 14 сут (18 ± 5 копий/кл), $p < 0.05$. Методом ОТ-ПЦР изучали уровни мРНК генов, активных при литической инфекции (сверхраннего UL122 и ранних UL83, UL54), а также генов UL82 и UL138, экспрессия которых показана при латентной инфекции [5]. К 7 с.п.и. по сравнению с 1 с.п.и. уровень мРНК генов UL122 и UL54 возрастал в 5 и 3 раза соответственно, гена UL83 не изменялся, но к 14 с.п.и. уровни мРНК трех литических генов снижались относительно 7 с.п.и. в 10, 8 и 7 раз соответственно ($p < 0,05$). Транскрипционная активность латентно-ассоциированных генов UL82 и UL138 повышалась к 7 с.п.и. в 8 и 7 раз соответственно и сохранялась на высоком уровне до 14 сут (табл. 1).

Таблица 1. Относительное содержание мРНК сверхраннего UL122, ранних UL83, UL54 и латентных UL138, UL82 генов в клетках THP-1 в динамике ЦМВ инфекции.

Гены ЦМВ / Сутки после инфицирования	UL138	UL82	UL122	UL54	UL83
1*	1 ± 0.15	1 ± 0.25	1 ± 0.13	1 ± 0.04	1 ± 0.31
7	6** ±0.18	8.4 ± 1.03	5 ± 1.3	3.14 ± 0.12	1.4 ± 0.08
14	9 ± 3.46	7.23 ± 1.7	0.5 ± 0.02	0.4 ± 0.03	0.2 ± 0.07

* Уровни мРНК изученных генов через 1 сутки после инфицирования приняты за 1.

**Кратные изменения уровня мРНК генов ЦМВ

В ЦМВ-инфицированных клетках THP-1 в течение 14 суток не было выявлено продукции инфекционно-активного вируса. Совокупность данных позволяет заключить, что в клетках THP-1 наблюдаются 3 формы ЦМВ инфекции (ЦМВИ): активная (1 с.п.и.) с высоким уровнем мРНК литических генов и высоким содержанием соответствующих вирусных белков; переходная (7 с.п.и.) – с выраженной экспрессией одновременно литических и латентных генов ЦМВ; латентная (14 с.п.и.) – с наличием вирусной ДНК и повышенной активностью латентно-ассоциированных генов ЦМВ. Литическая форма ЦМВИ в клетках THP-1 не установлена.

Для изучения чувствительности к ДОКС через 1, 7 и 14 с.п.и. в культуру THP-1 вносили 5 мкг/мл ДОКС, инкубировали 1 сут и определяли жизнеспособность клеток методом МТТ. Через 1 с.п.и. и инкубации с ДОКС доля нежизнеспособных клеток в инфицированной культуре составила 34 ± 1 %, в неинфицированной – 80 ± 4 %. Обработка культуры через 7 с.п.и. приводила к гибели 24 ± 2 % ЦМВ-инфицированных клеток и 82 ± 2 % – неинфицированных, через 14 суток наблюдалась гибель 7 ± 2 % инфицированных клеток и 79 ± 5 % неинфицированных (рис. 2).

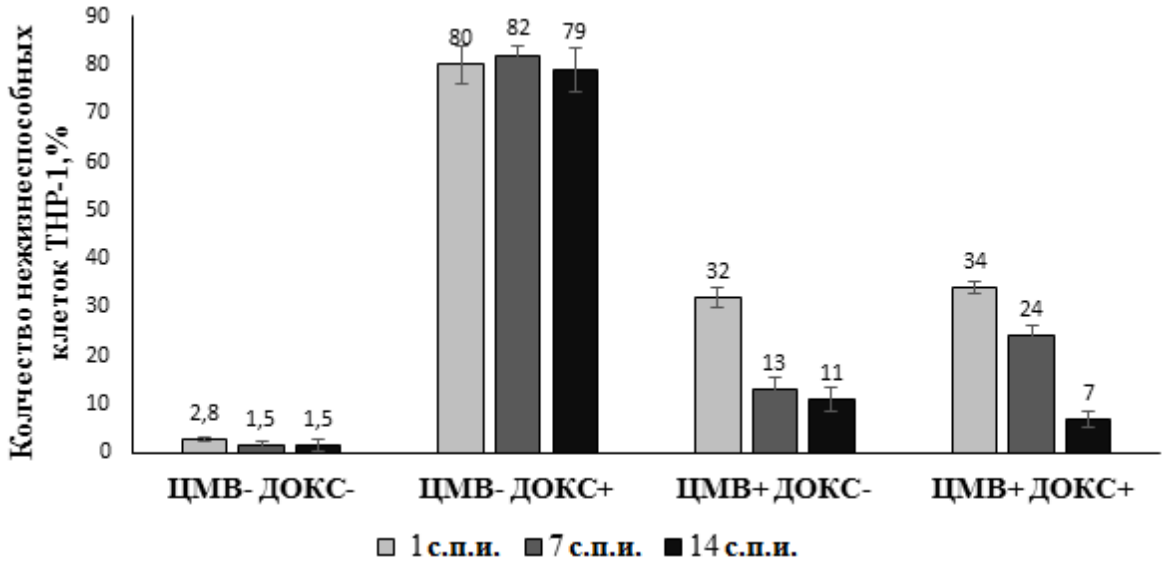


Рис. 2. Цитотоксическое действие ДОКС на ЦМВ инфицированные клетки THP-1 на 1, 7 и 14 сутки после инфицирования

Это означает, что латентно инфицированные клетки THP-1 (14 с.п.и.) также устойчивы к действию ДОКС, как и клетки с активной ЦМВИ (1 с.п.и.).

Оценивали действие ДОКС на клетки THP-1, зараженные ЦМВ, инактивированным УФ (30 Вт, 30 минут, на расстоянии 20 см., на льду). Через 4 часа после заражения в клетки вносили ДОКС (5 мкг/мл) и инкубировали 24 часа. Подсчет жизнеспособных клеток показал, что в результате обработки ДОКС инфицированной культуры количество погибших клеток составило 97 ± 0,29 %, неинфицированной культуры – 98 ± 1,04 % ($p > 0,05$) (рис. 3).

Полученные результаты показали, что после заражения инактивированным УФ ЦМВ клетки THP-1 сохраняют высокую чувствительность к действию ДОКС. Так как УФ облучение повреждает ДНК и подавляет репликацию ЦМВ [6], можно заключить, что репликация ЦМВ не является необходимым условием для установления резистентности инфицированных клеток THP-1 к ДОКС.

Сделанный вывод был подтвержден в опытах с ингибитором ДНК-полимеразы ЦМВ. Активность этого фермента необходима для продукции вируса при литической инфекции и является мишенью для использующихся противовирусных препаратов. Ганцикловир – нуклеозид (аналог гуанина), близкий по химической структуре к ацикловиру, является препаратом выбора при лечении ЦМВИ. Представляло интерес изучить, восстановит ли ганцикловир чувствительность инфицированных клеток THP-1 к действию ДОКС. Для этого клетки заражали ЦМВ и через 4 часа и 7 сут вносили ДОКС в концентрации 5 мкг/мл совместно с ганцикловиром в концентрации 25 мкг/мл и инкубировали 24 часа. Предварительно было показано, что в течение 7 сут после заражения

THP-1 транскрипционная активность гена ДНК-полимеразы ЦМВ UL54 была высокой. Ганцикловир через 24 часа воздействия вызывал гибель 20 ± 3,4 % инфицированных, и 22 ± 1,5 % не инфицированных клеток THP-1. При совместном добавлении к THP-1 ДОКС и ганцикловира через 4 часа после заражения в инфицированной популяции наблюдалась гибель 29 ± 10,1 % клеток, в то время как в неинфицированной – 90 ± 5,8 %. Через 7 суток после инфицирования ганцикловир совместно с ДОКС вызывал гибель 37 ± 14,9 % клеток, тогда как совместное действие на неинфицированные клетки THP-1 приводило к гибели 83 ± 3,5 % клеток (рис. 4). Полученные данные свидетельствуют о том, что при ингибировании синтеза вирусной ДНК сохраняется устойчивость THP-1 к ДОКС. Таким образом, присутствие в клетках репликативно-активного ЦМВ не требуется для установления резистентности инфицированных клеток. Кроме того, полученные данные свидетельствуют о том, что поздние белки ЦМВ, которые синтезируются после репликации вирусного генома [7], не влияют на установление резистентности клеток THP-1 к ДОКС.

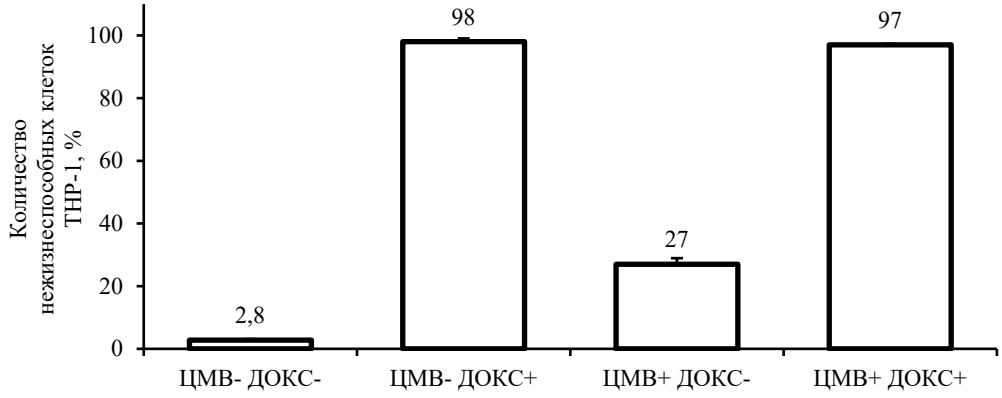


Рис. 3. Цитотоксическое действие ДОКС на клетки THP-1, инфицированные инактивированным УФ ЦМВ

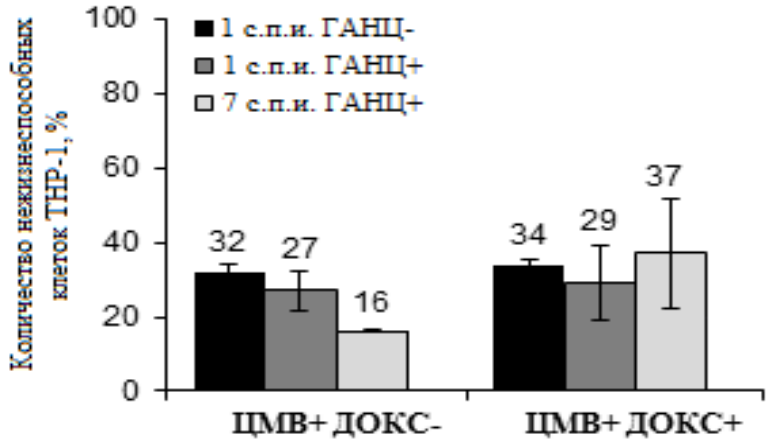


Рис. 4. Цитотоксическое действие ДОКС и ганцикловира на ЦМВ инфицированные клетки THP-1 через 4 часа и 7 сут после заражения

Представляло интерес выяснить участие сверхранних белков ЦМВ (IE) в устойчивости инфицированных клеток THP-1 к ДОКС. Сверхранние белки ЦМВ – транскрипционные факторы, которые регулируют не только экспрессию вирусных генов, но и координируют молекулярные процессы клеточной гибели [8]. Определяли IE1-p72 в лизатах THP-1 в различные сроки после инфицирования методом иммуноблота и обработкой полученных данных в программе ImageJ. (рис. 5). Было показано, что действие ДОКС через 1 с.п.и. приводило к увеличению количества IE1-p72 в 3 раза. При внесении ДОКС через 7 и 14 с.п.и. содержание белка повышалось в 4 и 17 раз, соответственно.

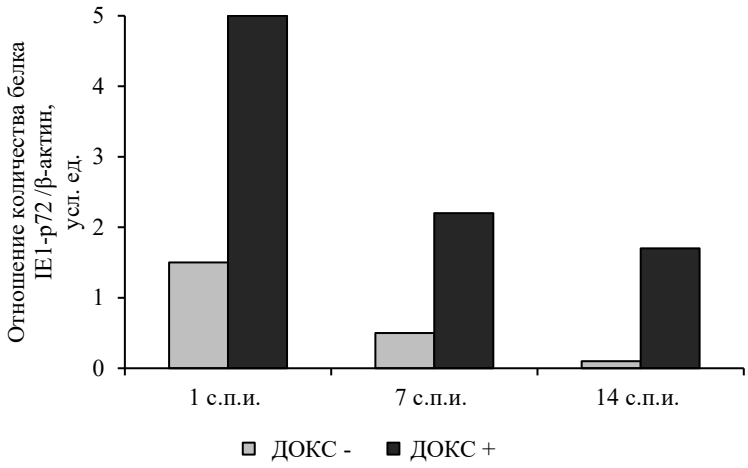


Рис. 5. Изменение содержания сверхраннего белка ЦМВ IE1-p72 под действием ДОКС в динамике ЦМВИ. Отношение IE1-p72/β-актин в усл. ед.

Важно отметить, что ДОКС индуцировал синтез IE1-p72 в клетках, содержащих ДНК ЦМВ в латентном состоянии, и это ассоциировалось с установлением резистентности к антибиотику. Это означает, что регуляторный вирусный белок IE1-p72 вовлечен в процесс формирования устойчивости к ДОКС лейкемических клеток, инфицированных ЦМВ.

Совокупность полученных данных позволяет заключить, что в установлении резистентности к ДОКС участвуют сверхранние вирусные белки, которые определяют судьбу опухолевой клетки при действии ДОКС: гибель или выживание. Таким образом, эта молекулярная мишень может стать основой для создания новых препаратов для лечения опухолей у пациентов, инфицированных ЦМВ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) грант № 17–04–00812.

ЛИТЕРАТУРА

1. Söderberg-Nauclér C., Johnsen J.I. Cytomegalovirus in human brain tumors: Role in pathogenesis and potential treatment options // World J Exp Med. 2015; 5(1): 1–10

2. Tsuchiya S., Yamabe M., Yamaguchi Y., et al. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1) // Int. J. Cancer 1980; 26: 171–176

3. Yang F., Teves S.S., Kemp C.J., Henikoff S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics // Biochim Biophys Acta 2014; 1845: 84–89

4. Tolosa L, Donato MT, Gómez-Lechón MJ. General Cytotoxicity Assessment by Means of the MTT Assay // Methods Mol Biol. 2015; 1250: 333–48.

5. Cheng S., Caviness K., Buehler J., et al. Transcriptome-wide characterization of human cytomegalovirus in natural infection and experimental latency // Proc Natl Acad Sci U S A . 2017; 114(49): p. E10586-E10595.

6. Arcangeletti M., Vasile S., Rodighiero I, et al. Human cytomegalovirus reactivation from latency: validation of a "switch" model in vitro // Virol J. 2016; 13(1): 179.

7. Mocarski E., Shenk T., Griffiths P.D., Pass F.R. Cytomegaloviruses. Knipe D.M., Howley P.M., editors. Fields Virology. 6th ed. Volume 2. USA: Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia; 2013.

8. Spector D.H. Human cytomegalovirus riding the cell cycle // Med Microbiol Immunol. 2015; 204(3): 409–419.

УДК 57.043 : 615.244 : 615.32

ПОКАЗАТЕЛИ СУММАРНОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ РАСТИТЕЛЬНОГО СБОРА ЖЕЛЧЕГОННОГО ДЕЙСТВИЯ ПРИ ТЕРМОДЕГИДРАТАЦИИ ПРИ 105° С

В.Н. Зеленков[1,2], А.А. Лапин[3], Е.В. Ферубко[1], Т.Д. Даргаева[1]

Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, Москва, Россия

[2] Всероссийский научно-исследовательский институт овощеводства – филиал Федеральный научный центр овощеводства, Московская область, Россия

[4] Казанский энергетический университет, Казань, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Применение лекарственных растений имеет широкие перспективы использования. особенно в комплексном лечении заболеваний гепатобилиарной системы, так как они обладают низкой токсичностью, мягкостью действия и редким возникновением аллергических реакций [1, 2].

В настоящее время актуальной задачей медицины является расширение исследований по изысканию источников для получения новых эффективных и безопасных лекарственных средств растительного происхождения, в том числе применяемых в гастроэнтерологической практике, учитывая, что ассортимент лекарственных растительных средств, применяемых в практическом здравоохранении, составляет более 40 %.

Нами разработан состав желчегонного средства: цветки бессмертника песчаного (Helichrysum arenarium L.), цветки пижмы обыкновенной (Tanacetum vulgare L.), плоды шиповника (Rosa sp.), листья крапивы двудомной (Urtica dioica L.), листья мяты (Mentha piperita L.), корни солодки (Glycyrrhiza glabra L.). Антиоксидантные свойства растительных средств обеспечиваются за счет комплекса природных веществ, извлекаемых из растительного сырья. В случае сборов, антиоксидантами являются водорастворимые вещества растений, входящие в состав исходного сбора: эфирные масла, аминокислоты, водорастворимые полисахариды, органические кислоты, фенольные соединения, гликокозиды терпеновых соединений, водорастворимые витамины и т. д. [3].

Целью настоящих исследований явилось изучение устойчивости показателя суммарной антиоксидантной активности для сбора желчегонного действия при испытании сбора в тесте термодегидратации при 105 ℃.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследований использовали сбор для лечения заболеваний гепатобилиарной системы следующего состава: цветки бессмертника песчаного – 300 г., цветки пижмы обыкновенной – 100 г., плоды шиповника – 100 г., листья крапивы двудомной – 100 г., листья мяты – 50 г., корни солодки – 50 г. и входящие в него растения. Растения взяты из биологической коллекции ФГБНУ ВИЛАР.

Образец навеской 0,60 г. заливали кипятком 60 мл (соотношение 1:100) и перемешивали на магнитной мешалке 15 минут. После охлаждения и отстаивания, аликвоту водного экстракта 0,1 см^3 вводил в ячейку кулонометра пипеточным дозатором в 10 кратной повторности. В качестве стандарта использовали спиртовый раствор рутина (Ru) который используют в качестве эталона при определении суммарной антиоксидантной активности (САОА) методом кулонометрического титрования по сертифицированной методике МВИ-01–00669068–13 в пересчете на стандартный образец Ru [4] через модальное значение (моду Мо) из 10 определений на сертифицированном приборе «Эксперт-006-антиоксиданты». Относительная ошибка определения САОА (Е отн.) при испытании исследованных нами образцов находилась в пределах 1,25–3,70 %. САОА определяли в г Ru в пересчете на 100 сухого (с.о.) или абсолютно сухого (а.с.о.) образцов. Термодегидратацию растительного сбора проводили на анализаторе влажности MX-50 (A&D Company, Япония). Сушку проводили при 105ºС с использованием инфракрасного излучателя. Термодегидратацию испытуемого образца прекращали при отсутствии изменений в его массе в течении нескольких минут при доведении скорости обезвоживания по остаточной влажности образца в 0,1 % / мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Антиоксидантная активность сбора желчегонного действия подтверждена в экспериментах на животных, проведенных в ФГБНУ ВИЛАР [5]. Ранее в работе [6] нами было показано, что для сбора желчегонного действия характерна не просто адитивность составляющих его компонентов, а синергизм их действия в проявлении суммарной антиоксидантной активности. Данные по определению САОА сбора желчегонного действия до и после термодегидратации представлены в таблице. Время проведения термодегидратации в эксперименте составило 7 минут для досушивания образца лекарственного сбора желчегонного действия от влажности 6,1 % до постоянного веса при достижении скорости досушивания 0,1 % сек образца при 105 ℃ при инфракрасном облучении.

Таблица – Суммарная антиоксидантная активность сбора желчегонного действия и ее устойчивость к термодегидратации при 105 ℃

Остаточная влажность, %	САОА в г рутина на 100 г. а.с.о.	САОА в г рутина на 100 г. а.с.о.	изменения САОА при термодегидратации, %
6,1	9,308 ± 0,124	8,740 ± 0,116 г.	–6,1

Как видно из таблицы, в процессе термодегидратации сбора желчегонного действия потери суммарной антиоксидантной активности составили 6,1 % от исходной, что говорит о высокой термостабильности этого показателя для лекарственного сбора.

ВЫВОДЫ

Определена суммарная антиоксидантной активность многокомпонентного лекарственного сбора действия после термодегидратации при 105 ℃. Показано, что при досушивании лекарственного сбора при температуре 105 ℃ в тесте термодегидратации с использованием инфракрасного облучения наблюдается незначительное снижение его суммарной антиоксидантной активности на 6,1 %, что подтверждает его термостабильность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ивашкин В.Т. Гастроэнтерология: национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 704 с.
2. Николаев СМ. Фитофармакотерапия и фитофармакопрофилактика заболеваний. – Улан-Удэ: Изд-во БГУ, 2012. – 286 с.
3. Лубсандоржиева П.-Н.Б. Разработка и стандартизация фитосредств для лечения и профилактики заболеваний органов пищеварения. – Улан-Удэ: Изд-во БНЦ СО РАН, 2016. – 280 с.
4. Лапин А.А. и др. Применение метода гальваностатической кулонометрии в определении антиоксидантной активности различных видов биологического сырья и продуктов их переработки. М.: МСХА имени. К.А. Тимирязева. 2011. 197 с.
5. Ферубко Е.В. и др. Гепатопротекторное действие многокомпонентного растительного экстракта // Медицинский вестник Башкортостана. 2018. Т. 13, № 5 (77). С. 47–50.
6. Е.В. Ферубко, В.Н. Зеленков, А.А. Лапин, Т.Д. Даргаева. Изучение антиоксидантной активности сбора антигепатотоксического действия и входящих в него компонентов: сборник научных трудов по материалам XIII Международного симпозиума. – Москва: РУДН, 2019. – С. 179–181.

УДК 328

ВЛИЯНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ НА СОСТАВ МИКРОБИОТЫ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

Л.В. Мацкова[1], Д.С. Кацеров[1], Е.С. Нерубенко[1], И.С. Алумянц[1], И.М. Титова[2].

[1]. Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, Калининград, Россия
[2]. Калининградский государственный технический университет, Калининград, Россия

Оптимизация использования сырья при производстве пищевых продуктов и исследование микробиоты желудочно – кишечного тракта (ЖКТ) человека являются актуальными задачами в настоящее время. Рациональное использование сырья является основным принципом создания новых рецептур продуктов, так как может обеспечить значительный прирост производства продуктов и оптимизировать микроэлементный состав продуктов. Влияние микробиоты человека на его здоровье и самочувствие является общепризнанным фактом, причём становится всё более очевидным, что не микробиота сама по себе, а её динамическое равновесие играет определяющую роль в поддержании здорового гомеостаза человеческого организма.

Целью данного исследования является изучение влияния новых функциональных продуктов на микробиоту ЖКТ молодых здоровых людей. Продукты составлены по новой рецептуре сотрудниками Калининградского Государственного Технического Университета – КГТУ (одобрены Роспотребнадзором) и на 15 % покрывают рекомендуемую суточную дозу в пищевых волокнах, при этом, не изменяя привычного рациона питания.

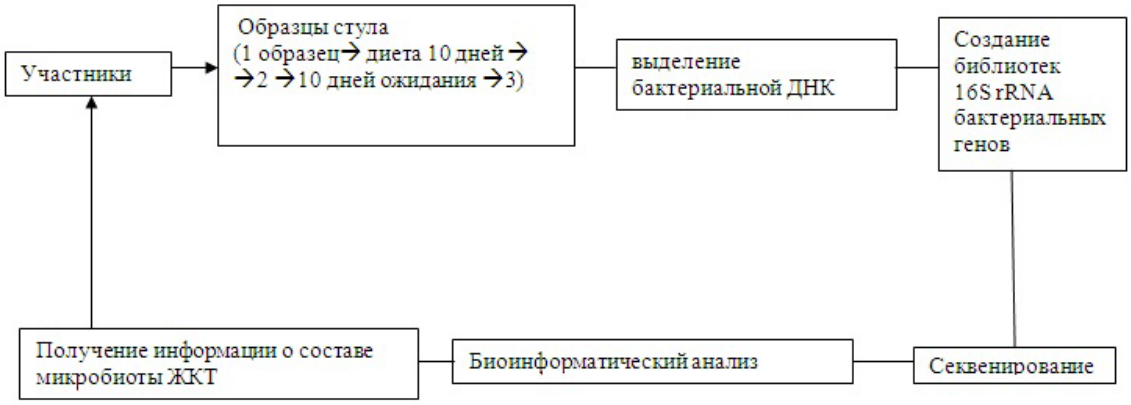


Рисунок 1. Дизайн исследования

Предлагаемые функциональные продукты – формованные полуфабрикаты на основе рыбных субпродуктов, обогащенных пищевыми волокнами, состоит из рыбного фарша, варьирующего растительного компонента, лука и соли. В качестве растительного компонента используют один из порошков. Порошки изготавливают из выжимок яблок, смородины и моркови, которые являются вторичным сырьем при производстве соковой продукции прямого отжима Внесение яблочного, смородинового или морковного порошка, в качестве растительного компонента в рыбный фарш, позволяет обогатить продукт пищевыми волокнами, органическими кислотами, минеральными веществами, витаминами и антиоксидантами, а также улучшить технологические свойства фарша и снизить потери массы полуфабриката в процессе тепловой обработки при доведении продукции до кулинарной готовности. Рыбный фарш формуют в виде тефтелей, котлет или изделий заданной формы, замораживают, упаковывают и маркируют.

Потребление пищевых волокон на уровне физиологических потребностей способствует нормализации функционирования желудочно – кишечного тракта человека, уменьшению концентрации холестерина в крови человека, снижению сахара в крови и стабилизации его уровня, а также выведению тяжелых металлов из организма.

Библиотеки бактериальных генов созданы. Секвенирование библиотек находится в процессе.

По результатам работы можно будет:

1. Предположить влияние новых функциональных продуктов на состав ЖКТ. Например, происходит ли обогащение микробиоты ЖКТ представителями родов Odoribacter, Oscillibacter, Pseudoflavonifracter и снижение рода Blautia. Ранее отметили позитивную корреляцию рода Blautia с наличием диабета у пациентов. Такие роды как Odoribacter, Oscillibacter, Pseudoflavonifracter имели отрицательную корреляцию к инсулиновой резистентности [1].

2. Предположить степень подверженности индивидуальных микробиот ЖКТ воздействиям окружающей среды (в данном случае, изменениям в диете), оценить устойчивость динамического равновесия микробиот ЖКТ, которая может служить в дальнейшем диагностическим признаком.

Данное исследование направлено на выяснение возможности манипулирования составом микробиоты ЖКТ в результате персонально составленной диеты, что уже завоевало признание как один из подходов персонализированной медицины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wenyu Zhou, M. Reza Sailani, Kévin Contrepois, et al. Longitudinal multi-omics of host–microbe dynamics in prediabetes. Nature 2019; 569: 663–671.

УДК 54.057

ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ДИБЕНЗО[B, D] ПИРАН-6-ОНА НА МОДЕЛИ СТРЕПТОЗОТОЦИН ИНДУЦИРОВАННОГО ДИАБЕТА У КРЫС

Н.И. Кащенко[1], И.В. Свиридов[1], Т.Г. Горностай[2]

[1] Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, Россия
[2] Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, Россия

Сахарный диабет (СД) – известное метаболическое заболевание, характеризующееся анормальным постпрандиальным (возникающим после еды) повышением уровня глюкозы в крови. В структуре эндокринных заболеваний СД занимает лидирующее положение. Вследствие быстрого роста заболеваемости, высокой смертности, ранней инвалидизации лиц молодого, трудоспособного возраста, снижения качества жизни, СД представляет важную не только медицинскую, но и серьезную социальную проблему [1].

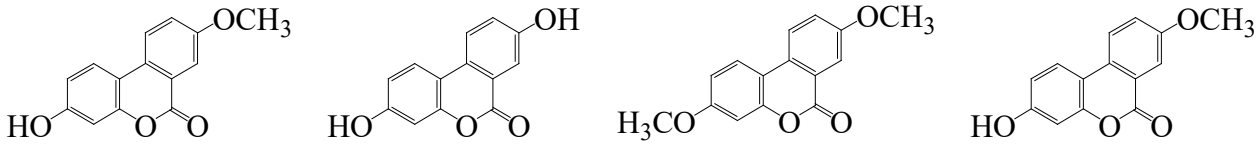
Анализируя сведения последних обзорных работ по данному направлению, можно отметить, что особый интерес вызывают у исследователей соединения фенольной природы [2]. Эллаготаннины как высокомолекулярные полифенольные соединения растительного происхождения обладают широким спектром биологической активности [3,4]. Однако, согласно последним данным научной литературы, эллаготаннины обладают низкой биодоступностью, и за проявление биологических эффектов в живом организме отвечают уролитины – производные дибензо [b, d] пиран-6-она, которые продуцируются микробиотой кишечника человека из эллаготаннинов и усваиваются значительно лучше своих предшественников [5]. Данный класс соединений наименее изучен и является перспективным для поиска и создания высоактивных антидиабетических средств. Следует отметить, что выделение уролитинов из биологических жидкостей человека – многоэтапный и затратный процесс. В свою очередь, целенаправленный химический синтез уролитинов в условиях in vitro достаточно легко реализуем [6]. Нами были синтезированы производные дибензопиран-6-она, структурные формулы которых приведены на рисунке 1.

8-О-метилуролитин А (3-гидрокси-8-метокси-дибензо-[b, d] пиран-6-он). 2-Бром-5-метоксибензойную кислоту (1 г), резорцин (1 г) и NaOH (0,4 г) в воде (5 мл) нагревали с обратным холодильником в течение 30 минут. После добавления водного $CuSO_4$ (5 %, 2 мл) смесь кипятили с обратным холодильником 10 минут, в течение которых 8-О-метилуролитин А (0,70 г.) осаждался в виде белого порошка. Осадок отфильтровывали и подвергали колоночной хроматографии на силикагеле для очистки.

Уролитин А (3,8 – дигидрокси-дибензо-[b, d] – пиран-6-он). Раствор 2-бром-5-метоксибензойной кислоты (2,5 г) и $AlCl_3$ (7,5 г) в хлорбензоле (75 мл) кипятили с обратным холодильником в течение 2,5 часов. После охлаждения смесь экстрагировали диэтиловым эфиром (3×125 мл). Эфирные извлечения выпаривали, получая 2-бром-5-гидроксибензойную кислоту (2 г). 2-бром-5-гидроксибензойную кислоту (1,5 г), резорцин (1,6 г) и NaOH (0,6 г) в воде (8 мл) нагревали с обратным холодильником в течение 30 минут. После добавления водного $CuSO_4$ (5 %, 3 мл) смесь кипятили с обратным холодильником еще 10 минут, в течение которых уролитин А (1 г) осаждался в виде белого порошка. Осадок отфильтровывали и подвергали колоночной хроматографии на силикагеле для очистки.

3,8 – диметокси-дибензо-[b, d] – пиран-6-он. K_2CO_3 (31 г.) и диметилсульфат (26,5 г) добавляли к раствору 8-О-метилуролитина А (0,5 г) в ацетоне (300 мл). Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 40 мин. Осадок отфильтровывали, растворяли в этилацетате (30 мл) и промывали водой (3×50 мл). Органическую фазу отделяли, высушивали (Na_2SO_4), фильтровали и концентрировали в вакууме. Осадок отфильтровывали и подвергали колоночной хроматографии на силикагеле для очистки.

3-гидрокси-дибензо-[b, d] – пиран-6-он. Раствор 2-бромбензойной кислоты (2 г), резорцина (2 г) и NaOH (0,4 г) в воде (20 мл) кипятили с обратным холодильником в течение 30 мин. Затем к смеси добавляли 10 % водный раствор $CuSO_4$ (0,5 мл) и реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение еще 1 часа. Осадок отфильтровывали и подвергали колоночной хроматографии на силикагеле для очистки.



8-О-метилуролитин А | Уролитин А | 3,8 – диметокси-дибензо-[b, d] – пиран-6-он. | 3-гидрокси-дибензо-[b, d] – пиран-6-он

Рисунок 1. Структурные формулы синтезированных соединений

Гипогликемические свойства синтезированных производных дибензо [b, d] пиран-6-она были исследованы на модели стрептозотоцин-индуцированной гипергликемии, принцип действия которой заключался в частичном разрушении бета-клеток островков Лангерганса диабетогенным агентом стрептозотоцином (STZ), приводившему к недостаточному выделению инсулина [7]. Недостаточное высвобождение инсулина вызывало гипергликемию, что приводило к окислительному повреждению путем образования реакционноспособных видов кислорода и развития диабетических осложнений.

Крысам линии Вистар внутрибрюшинно вводили STZ, растворенный в свежеприготовленном 0,1 М цитратном буфере (pH 6,5) в дозе 60 мг/кг. Животные контрольной группы получали равный объем раствора диметилсульфоксида в воде (1:1). Через 3 дня после введения STZ определяли уровень глюкозы в крови у всех крыс. Крысы с уровнем глюкозы в крови более 250 мг/дл считались больными диабетом. Крысам с выявленным диабетом вводили инсулин, данная группа характеризовалась как положительный контроль. Уровень глюкозы в крови натощак у всех крыс определяли до начала эксперимента. Крысы были разделены на следующие группы: (1) контрольная группа, получавшая только раствор диметилсульфоксида в воде (1:1) (300 мкл/кг/раз в день, ежедневно); (2) группы крыс, инъецированные стрептозотоцином (10 мг/кг/день) и принимавшие: (3) 8-О-метилуролитин А (300 мг/кг/день); (4) уролитин А (300 мг/кг/день); (5) 3,8–диметокси-дибензо-[b, d]–пиран-6-он (300 мг/кг/день); (6) 3-гидрокси-дибензо-[b, d]–пиран-6-он; (7) инсулин (5 ед./кг/день); крысы без диабета, которым вводили (8) 8-О-метилуролитин А (300 мг/кг/день); (9) уролитин А (300 мг/кг/день); (10) 3,8–диметокси-дибензо-[b, d]–пиран-6-он (300 мг/кг/день); (11) 3-гидрокси-дибензо-[b, d]–пиран-6-он. Исследованные уролитины растворяли в растворе диметилсульфоксида и воды (1:1) и ежедневно вводили крысам через желудочный зонд, инсулин вводили подкожно. Период исследования продолжался в течение 21 дня, содержание глюкозы в крови натощак у животных определялось на 1, 7, 14 и 21 день. Плазменный инсулин определяли с помощью энзим-связанного иммуносорбентного анализа (набор ELISA для инсулина крыс / мышей). Общий гемоглобин (Hb) и гликозилированный гемоглобин A_{1c} (HbA_{1c}) определяли хроматографическим методом с использованием катионообменной смолы (комплект гемоглобина A_{1c}, BioSystem S.A.) и количественно определяли спектрофотометрическим методом при 415 нм.

По результатам экспериментальных исследований наблюдалась сильная потеря веса у животных, получавших STZ, по сравнению с контрольной группой (Таблица 1). Механизм его неясен. Это может быть связано со многими факторами, такими как потеря аппетита, увеличение мышечной потери и потери белков ткани. Значительное снижение уровня инсулина в плазме (6.04 ед./л против 16.01 ед./л в контрольной группе) и общего гемоглобина (7.31 мг/дл против 15.07 мг/дл в контрольной группе) наблюдалось в группе крыс, больных диабетом, а также наблюдалось значительное повышение уровня гликозилированного гемоглобина (HbA_{1C}; 12.48 % Hb против 5.35 % Hb в контрольной группе). Все упомянутые изменения свидетельствуют о неудовлетворительном гликемическом контроле, данные результаты соответствуют диабету 2 типа. Пероральное введение производных дибензо [b, d] пиран-6-она увеличивало массу тела у крыс с диабетом по сравнению с группой STZ. Наибольшее увеличение массы тела наблюдалось в группе крыс, получавших уролитин А, наименьший прирост – в группе крыс, принимавших 3,8 – диметокси-дибензо-[b, d] – пиран-6-он (207 г. против 164 г.). Снижение уровня глюкозы в крови зависело от дозы и наблюдалось с седьмого дня обработки у диабетических крыс, получавших уролитин А и инсулин, достигая максимальных значений через 21 день. У STZ диабетических крыс уролитин А проявлял большую гипогликемическую активность с постепенным снижением гликемии до достижения максимума через 21 день. Применение уролитина А показало низкую активность в снижении ответа уровня глюкозы в крови натощак, достигая максимального значения через 21 день. Обработка недиабетических крыс производными дибензо [b, d] пиран-6-она не влияла на уровень глюкозы в крови натощак в течение 21 дня эксперимента.

Таблица 1. Параметры массы тела, инсулина, общего гемоглобина и гликозилированного гемоглобина контрольной и экспериментальной групп, среднее значение ± SD

Экспериментальная группа	Масса тела, г.		Инсулин, ед./л	Общий гемоглобин, мг/дл	Гликозилированный гемоглобин, %Hb
	0 день	21 день			
Контроль	201 ± 6	231 ± 5	16.01 ± 1.07	15.07 ± 0.89	5.35 ± 0.44
STZ	197 ± 7	124 ± 7	6.04 ± 1.14	7.31 ± 0.91	12.48 ± 0.32
STZ + 8-O-метилуролитин A	199 ± 5	191 ± 6	10.01 ± 1.22	9.07 ± 0.86	8.32 ± 0.25
STZ + Уролитин A	196 ± 6	207 ± 4	11.08 ± 0.99	10.88 ± 0.77	7.51 ± 0.29
STZ + 3,8-диметокси-дибензо-[b, d]-пиран-6-он.	197 ± 7	164 ± 7	8.22 ± 1.12	8.14 ± 0.64	9.12 ± 0.30
STZ + 3-гидрокси -дибензо-[b, d]-пиран-6-он	200 ± 4	187 ± 5	8.64 ± 1.03	9.31 ± 0.80	8.56 ± 0.27
STZ + Инсулин	197 ± 5	226 ± 6	15.87 ± 1.09	14.99 ± 0.79	5.33 ± 0.33
8-O-метилуролитин A	198 ± 4	225 ± 5	15.94 ± 1.01	14.94 ± 0.69	5.59 ± 0.26
Уролитин A	198 ± 4	229 ± 7	15.21 ± 1.12	14.71 ± 0.67	5.46 ± 0.28
3,8-диметокси-дибензо-[b, d]-пиран-6-он	195 ± 6	226 ± 6	15.36 ± 1.33	14.23 ± 0.73	5.41 ± 0.34
3-гидрокси-дибензо-[b, d]-пиран-6-он	199 ± 5	228 ± 7	15.64 ± 1.24	14.85 ± 0.76	5.92 ± 0.25

Было выявлено, что уровень инсулина был снижен у крыс с диабетом по сравнению с животными без диабета. Введение производных дибензо [b, d] пиран-6-она приводило к повышению уровня инсулина в плазме у крыс, инъецированных STZ. Максимальное повышение уровня инсулина в плазме наблюдалось в группе уролитина A. Введение крысам с диабетом производных дибензо [b, d] пиран-6-она увеличивало дозозависимым образом уровень общего гемоглобина (Hb) и снижало уровень гликозилированного гемоглобина (HbA_{1c}). Параметры недиабетических групп, получавших производные дибензо [b, d] пиран-6-она, были близки к контрольной группе, не демонстрируя влияния на здоровых животных. Таким образом, среди исследованных синтезированных производных дибензо [b, d] пиран-6-она уролитин A максимально снижал уровень глюкозы в сыворотке и нормализовал вес и параметры крови (содержание инсулина, общего и гликозилированного гемоглобина) на модели стрептозотоцин индуцированного диабета у крыс. Наблюдаемое повышение уровня инсулина в плазме указывает на то, что уролитин A стимулирует секрецию инсулина из существующих или регенерированных клеток. Полученные результаты показывают, что уролитин A может улучшить метаболические нарушения, вызванные диабетом. Тем не менее, необходимы дальнейшие исследования, чтобы лучше понять его потенциальное терапевтическое влияние и точный механизм действия.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18–33–00414 мол_а.

ЛИТЕРАТУРА

World Health Organization. Global Report on Diabetes; WHO: Geneva, Switzerland, 2016.

Xiao, J., Kai, G., Yamamoto, K., Chen, X. Advance in dietary polyphenols as α-glucosidases inhibitors: A review on structure-activity relationship aspect. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2013, 53, 818–836.

Yuan, T., et al. Antidiabetic ellagitannins from pomegranate flowers: Inhibition of α-glucosidase and lipogenic gene expression. Org. Lett. 2012, 20, 5358–5361.

Juśkiewicz et al. Blood glucose lowering efficacy of strawberry extracts rich in ellagitannins with different degree of polymerization in rats. Pol. J. Food Nutr. Sci. 2016, 66, 109–117.

Tomás-Barberán, F.A., et al. Urolithins, the rescue of "old" metabolites to understand a "new" concept: Metabotypes as a nexus among phenolic metabolism, microbiota dysbiosis, and host health status. Mol Nutr Food Res. 2017, 61, DOI: 10.1002/mnfr.201500901.

Bialonska, D. et al. Urolithins, intestinal microbial metabolites of Pomegranate ellagitannins, exhibit potent antioxidant activity in a cell-based assay. J Agric Food Chem. 2009, 57, 10181–10186.

Wu, K.K., Huan, Y. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. Curr Protoc Pharmacol. 2008, Chapter 5, Unit 5.47.

УДК 328

ДИАГНОСТИКА РАКА ТОЛСТОЙ КИШКИ НА ОСНОВЕ ЦЕЛОСТНОСТИ МОЛЕКУЛ ДНК

Г.М. Бутрович, Е.Д. Мирлина, О.А. Вострюхина

Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт, Гатчина, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Колоректальный рак (КРР, рак толстой кишки) – злокачественная опухоль из элементов эпителия толстой кишки. КРР является четвертой ведущей причиной смертности от рака у мужчин и третьей ведущей причиной у женщин во всем мире (Jemal et al., 2011). Частота встречаемости КРР и явная зависимость успешного излечения от раннего обнаружения заболевания оправдывают регулярное обследование здоровых людей, особенно входящих в группу риска. Вследствие этого разработка неинвазивных методов ранней диагностики КРР, становится все более актуальной. В фекалиях человека обнаруживается небольшое количество клеток кишечного эпителия как следствие физиологического слущивания при прохождении каловых масс.

Возможность выделять ДНК человека из образцов фекалий и проводить ее анализ была продемонстрирована за два последних десятилетия достаточно многочисленными группами исследователей (Carozzi et al., 2013; Imperiale et al., 2014). Колоректальные раковые клетки наряду с нормальными попадают в стул человека, представляя таким образом материал для исследования. Boynton в своей работе показал, что фрагменты ДНК, выделенные из стула больных с колоректальными опухолями, имели большую молекулярную массу нежели фрагменты, полученные из стула здоровых индивидуумов (Boynton et al., 2003). Следовательно, анализ целостности фрагментов ДНК, выделенной из образцов стула, предоставляет большие возможности для диагностики КРР.

Цель работы – разработка способа ранней неинвазивной диагностики колоректального рака на основе анализа целостности молекул ДНК, выделенных из фекалий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Отбор образцов. Образцы фекалий были предоставлены ПСПбГМУ им. И.П. Павлова и ФГБУ "НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова". Образцы были получены у 103 человек, из них 79 пациентов с КРР и 24 здоровых добровольца (контрольная группа). Около 5 г стула было отобрано у каждого индивидуума. Сразу после дефекации пробы помещались в герметичные пластиковые контейнеры, содержащие 1 мл 0,5 М буфера ЭДТА и хранились при +4º С. Выделение геномной ДНК производили в промежуток от 6 до 24 часов после отбора пробы. Для пациентов с КРР были предоставлены демографические данные, диагноз был подтвержден гистологически и получены клинико-патологоанатомические данные опухолей. Наличие или отсутствие опухоли у пациентов и контрольной группы было установлено методом колоноскопии.

Выделение ДНК. Выделение геномной ДНК производили с использованием набора «ДНК-сорб-В» фирмы «АмплиСенс» ЦНИИЭ Роспотребнадзора (Москва). ПЦР-анализ. С целью проверки успешности выделения ДНК и отсутствия ингибирования ПЦР предварительно проводили амплификацию двух коротких фрагментов длиной менее 200 н.п. из разных участков генома: фрагмент гена *TP53* длиной 141 н.п. и фрагмент гена *BLM* длиной 153 н.п. ПЦР проводили в стандартных условиях с использованием нуклеозидтрифосфатов фирмы «Медиген» (Новосибирск), праймеров производства НПО «Синтол» (Москва) и Taq-полимеразы фирмы НПО «СибЭнзим» (Новосибирск). Для оценки целостности геномной ДНК методом ПЦР–анализа *использовали два протяженных фрагмента: фрагмент* гена TP53 *длиной 800 н.п. (TP53 800) и* фрагмент гена MLH1 длиной 2340 н.п. (MLH1 2340). Полимеразную цепную реакцию проводили при помощи набора «Encyclo Plus PCR kit» (ЗАО «Евроген, Москва) в соответствии с инструкциями производителя.

Визуализация полученных результатов. Для визуализации полученных продуктов амплификации проводили одномерный электрофорез в 6 %-м ПААГ или 1 %-м агарозном геле с последующим окрашиванием нитратом серебра или бромидом этидия.

Статистический анализ. Для анализа данных использовали программу Graphpad Instat. Различия между группами считали достоверными на уровне 95 % вероятности при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После отбора образцов фекалий пациентов содержащаяся в них ДНК, как правило, деградирует, что может снизить эффективность молекулярного анализа. Было показано, что добавление стабилизирующего буфера в образцы сразу после дефекации предотвращает деградацию ДНК в течение нескольких дней и повышает эффективность молекулярных тестов. Нами предложены следующие условия хранения и транспортировки образцов фекалий, обеспечивающие максимальную их сохранность – от 6 часов до 3-х суток в 0,5 М буфере ЭДТА при +4 °С и pH = 8.

Поскольку геномная ДНК в норме при прохождении через желудочно – кишечный тракт расщепляется до фрагментов 190–210 н.п., то при оптимальных условиях для ПЦР фрагменты длиной 141 и/или 153 н.п. обнаруживаются в фекалиях как здоровых индивидуумов, так и больных колоректальном раком. Полученные короткие ПЦР-фрагменты свидетельствуют о выделении достаточного количества ДНК для проведения дальнейших экспериментов (амплифицирования протяженных фрагментов) и об отсутствии ингибирования ПЦР-реакции. Интенсивность электрофоретических зон коротких фрагментов ДНК визуально практически не отличалась у группы больных и контрольной группы.

На следующем этапе методом ПЦР-анализа выявляли протяженные фрагменты ДНК, по присутствию которых судили о наличии у пациента КРР. При подборе протяженных фрагментов ставили задачу охватить оба основные генетические пути развития КРР, в которых задействованы две разные группы генов. Соответственно, предполагали использовать фрагменты, которые принадлежат генам, относящимся к разным группам.

Наиболее оптимальными были признаны фрагмент гена TP53, включающий 7, 8 и 9 экзоны (TP53 800) и фрагмент гена MLH1 (MLH1 2340). Данные фрагменты ДНК были обнаружены в стуле 60 из 79 пациентов с КРР, в том числе TP53 800 – в 51 случаях, MLH1 2340 – в 49 случаях, а оба фрагмента выявлены в стуле 36 пациентов. В контрольной группе протяженные фрагменты ДНК в стуле отсутствовали. Использование двух фрагментов из разных участков генома позволило повысить достоверность полученных результатов. Чувствительность и специфичность метода с использованием комбинации из фрагментов двух генов составили, соответственно, 76 и 100 % ($P < 0{,}0001$); общая чувствительность была выше по сравнению с каждым отдельным фрагментом.

Был проведен анализ чувствительности данного метода в зависимости от стадии заболевания, от локализации опухоли (для разных отделов толстой кишки), а также в зависимости от клинико-патологоанатомических характеристик новообразования (эндофитного либо экзофитного роста опухоли, наличия в ней некроза, степени дифференцировки опухоли). С уровнем статистической достоверности более 95 % не выявлено статистически значимых различий между чувствительностью метода для пациентов с I–II (82 %) и III–IV (76 %) стадией, что демонстрирует возможности метода для ранней диагностики КРР.

Показано, что чувствительность метода для прямой кишки по сравнению с другими отделами толстой кишки достоверно выше – 85 против 62.5 % ($P = 0.0314$). Принимая во внимания принцип действия рассматриваемого метода, результат ожидаемый, т. к. раковые клетки, происходящие из наиболее удаленных от анального отверстия отделов толстой кишки, находятся в просвете кишечника существенно большее время, чем клетки из прямой кишки и в большей степени подвергаются разрушительному действию ферментов, в результате чего их ДНК больше деградирует. Чувствительность метода диагностики КРР при выявленном в опухоли некрозе составила 89 %, а в отсутствие некроза – 69 %; эти различия статистически не являются достоверными ($P = 0.0562$), но можно говорить о заметной тенденции в повышении чувствительности при наличии некроза. Не выявлено статистически значимых различий между чувствительностью метода в отношении опухолей с эндофитным или экзофитным ростом ($P = 0.4087$), а также в отношении опухолей с разной степенью дифференцировки.

ЛИТЕРАТУРА

Jemal A. et al. Global cancer statistics // CA Cancer J Clin. – 2011. – V.61. – P.69–90.

Carozzi F.M. and Sani C. Fecal Collection and Stabilization Methods for Improved Fecal DNA Test for Colorectal Cancer in a Screening Setting // Journal of Cancer Research. – 2013.

Imperiale T.F., Ransohoff D.F., Itzkowitz S.H. Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening // N Engl J Med. – 2014. – V.370. – P.1287–1297.

Boynton K.A. et al. DNA integrity as a potential marker for stool-based detection of colorectal cancer. // Clin Chem. – 2003. – V.49. – P.1058–1065.

УДК 328

ЛИПОСОМАЛЬНЫЙ ПРЕПАРАТ, СОДЕРЖАЩИЙ ДВЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СУБСТАНЦИИ КАРНОЗИН И ЛИПОЕВУЮ КИСЛОТУ: ПОЛУЧЕНИЕ И ВЛИЯНИЕ НА АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ

В.А. Щелконогов[1,2,3], Б.Т. Адулждаббар[1], Е.С. Дарнотук[1], Г.М. Сорокоумова[1], Н.С. Шастина[1], О.А. Баранова[2], А.В. Чеканов[2], К.Д. Казаринов[3], В.П. Мудров[4], Э.Ю. Соловьева[2], А.И. Федин[2]

[1] МИРЭА-Российский технологический университет, Москва, Россия
[2] Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия
[3] Институт радиотехники и электроники имени В.А. Котельникова РАН, Московская обл., Россия
[4] 9-й лечебно-диагностический центр Минобороны России, Москва, Россия

Сосудистые заболевания головного мозга находятся на втором месте среди всех причин смерти, уступая заболеваниям сердечно-сосудистой системы и опережая онкологическую патологию. Не менее, важен фактор ишемии в развитии хронических нарушений мозгового кровообращения, вследствие чего образуется сосудистая деменция. Поэтому ишемический инсульт следует рассматривать в качестве ключевого патогенетического фактора развития самых разнообразных нозологических форм в рамках сосудистой патологии головного мозга и, в первую очередь, инсульта [1]. В результате ишемического повреждения происходит уменьшение мозгового кровотока, возникновение и прогрессирование окислительного стресса; микроциркуляторные нарушения, воспалительные реакции, повреждение гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и др. [2]. В связи с этим создание рациональных лекарственных форм, позволяющих увеличивать биодоступность фармацевтических субстанций и их направленной доставки к месту патологии – важнейшие задачи при создании новых лекарственных форм известных препаратов.

Настоящая работа посвящена созданию комбинированной липосомальной лекарственной формы, содержащей одновременно две субстанции: карнозин (К) и липоевую кислоту (ЛК). Эти оба вещества проявляют антиоксидантные свойства и применяются при различных патологиях, в том числе и при нейродегенеративных расстройствах. К сожалению, они характеризуются низкой биодоступность, т. к. ЛК – плохо растворяется в воде, а К – быстро расщепляется ферментом карнозиназой. Для увеличения растворимости ЛК и защиты К от фермента нами предложено использовать их липосомальную форму.

Липосомы получали как из природного липида соевого фосфатидилхолина (с-ФХ), так и синтетического липида – дипальмитоил – ФХ в присутствии холестерина и без него. Для включения ЛК применяли метод пассивной загрузки, а для К – метод активной загрузки с использованием сульфата аммония. Все образцы оценивали по эффективности включения ЛК и К, морфологии и размерам частиц. Результаты проведенных исследований представлены в Таблице 1.

В результате проведенных исследований было установлено, что наиболее оптимальные условия создания липосом (метод «активная» загрузка) позволяют получить сферические наночастицы, имеющие диаметр 245 нм, а эффективность включения составляет для ЛК – 50 % и для К – 30 % (Табл.1). Полученные липосомы обладают высокой стабильностью (в течение 9 месяцев) при хранении при комнатной температуре.

Таблица 1. Характеристики липосомального препарата содержащего одновременно карнозин и липоевую кислоту

Состав липосом Слипидов = 40мг/мл	Лекарственное вещество		pH среды	ЭВ, %		Размер частиц, нм
	ЛК Сисх., мг/мл	Карнозин Сисх., мг/мл		ЛК	Карнозин	
пассивная загрузка						
ФХ	5	20	7,4	50 ± 10	12 ± 5	245
активная загрузка						
ФХ	5	20	7,4	47 ± 10	33 ± 10	245
ФХ + Хол.	5	20	7,4	50 ± 10	31 ± 10	245
ДПФХ	5	20	7,4	48 ± 10	27 ± 10	245

Приём материалов статей по адресу: actbio@mail.ru

Исследование антиоксидантной активности этих двух субстанций в модельной системе (реакция Фентона) показало, что при одновременном их использовании в концентрации 10 мМ – К и 24 мМ – ЛК, значительно (в 12 раз) снижается содержание продуктов окисления липидов (ТБК-активных продуктов)

Изучение влияния комбинированного липосомального препарата, содержащего и К и ЛК на агрегацию тромбоцитов (Тц) крови условно здоровых доноров показало, что препарат, содержащий К – 1,8 мМ и ЛК – 1 мМ, ингибировал агрегацию тромбоцитов, индуцированную арахидоновой кислотой на 32 %. Важно отметить что водорастворимые препараты карнозина (1,8 мМ) и липоевой кислоты (1 мМ) никак не влияли на агрегацию Тц, обусловленную АК. Вероятно, это связано с плохой способностью проникать в клетку этих препаратов, тогда как липосомальный комбинированный препарат более легко проникает через клеточную мембрану путём её слияния с мембраной тромбоцита.

Таким образом, нами получен эффективный комплексный препарат, содержащий одновременно два антиоксиданта и проявляющий антиагрегационные свойства в отношении тромбоцитов человека.

Работа выполнена в рамках Государственного задания (№ госрегистрации 1 04 011 056).

ЛИТЕРАТУРА

1. С.Г. Бурчинский. Ишемия головного мозга: возможности комплексной фармакологической коррекции. Статьи института геронтологии АМН Украины // Т. 14, 2006, 15–18.

2. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. // М.: "Медицина", 2001., 328 с.

УДК 577

АНАЛИЗ АНТИМИКРОБНОЙ И ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ ИОННОЕ СЕРЕБРО ИЛИ НАНОЧАСТИЦЫ СЕРЕБРА

Е.В. Владимирова[1], Д.С. Орлов[2], Н.Ю. Ульянова[3], О.Б. Иванченко[1]

[1] Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия
[2] Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
[3] Институт Химии силикатов им. А.В. Гребенщикова РАН, Санкт-Петербург, Россия

Актуальность: Успешное внедрение антибиотиков и их широкое применение привело к появлению устойчивых штаммов микроорганизмов, что толкает исследователей на поиск антибиотиков принципиально нового механизма действия [1]. Различные формы серебра рассматриваются в качестве перспективных препаратов для борьбы с антибиотикорезистентными патогенами [2]. Антимикробные свойства серебра известны человечеству с древних времен. Серебро в различных формах все более широко применяется в качестве эффективных антибактериальных и противогрибковых средствах в перевязочных материалах и раневых покрытиях, медицинской технике, в водных фильтрах. Соли серебра использовали для лечения психических заболеваний, эпилепсии, никотиновой зависимости, гастроэнтерита, стоматита и заболеваний, передаваемых половым путем, (сифилис, гонорея и др.) [3, 4].

Механизмы микробоцидного действия как ионных форм серебра, так и его наночастиц, остаются, тем не менее, не до конца изученными. Предполагают, что ионы серебра способны связываться с тиоловыми группами различных бактериальных ферментов и белков, нарушая их функции, подавляют деление клетки, вызывают морфологические изменения, взаимодействуют с нуклеиновыми кислотами, а именно с основаниями ДНК [5]. Основной мишенью действия наночастиц предположительно являются мембраны бактерии. Сорбция на них происходит благодаря электростатическим взаимодействиям [3]. Некоторые считают, что наносеребро нарушает работу дыхательной цепи, что может приводить к генерации активных форм кислорода; нарушением электрохимического градиента [3, 6]. Показана зависимость антимикробной активности наночастиц от их формы и размера. Более мелкие обладают большей цитотоксичностью, при этом они обнаруживаются в значительных количествах и во внутриклеточных компартментах. [6, 7].

Однако показана токсичность обеих форм серебра и по отношению к эукариотическим клеткам. Токсичность наночастиц связывают с выделением ионных форм серебра. Тем не менее, показано, что наночастицы обладают собственной, отличной от ионов токсичностью. При действии наносеребра на эукариотическую клетку наблюдается ее сморщивание, угнетение дыхательной активности митохондрий, снижение содержания АТФ и связанное с этим нарушение репарации ДНК.

Отмечено, что действие ионов серебра не сопровождается подобным эффектом в отношении митохондрий. Токсичность наночастиц, как и антибактериальная активность, возрастает с уменьшением их размеров [7]. Показано, что они способны запускать клеточную гибель по пути апоптоза [8].

Крайне важно добиться того, чтобы антимикробные препараты наряду с бактерицидным действием оказывали как можно менее выраженный токсический эффект на клетки человека. На данный момент нет единого мнения по поводу наименее токсичной для человека формы серебра. В связи с этим актуальной представляется оценка цитотоксического действия серебра в различных формах на клетки человека и его сравнение с показателем антимикробной активности.

Целью настоящей работы является сравнение антимикробной и цитотоксической активности препаратов, содержащих ионное серебро и наночастицы серебра.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали образцы наноматериалов, изготовленных на основе природных силикатов, содержащих серебро в форме ионов либо наночастиц в сходных концентрациях. Наночастицы серебра были получены путем химического восстановления с использованием нитрата серебра. Размер частиц составлял около 20 нм. Провели сравнительное изучение антимикробной и гемолитической активности двух образцов:

– образец № 1, содержащий ионное серебро;

– образец № 2, содержащий наночастицы серебра.

Антимикробную активность образцов определяли методом серийных разведений в жидкой питательной среде, содержащей микроорганизмы [9].

Оценка антимикробной активности проводилась в отношении грамположительной бактерии Staphylococcus aureus 1399/17, а также в отношении грамотрицательных бактерий Pseudomonas aeruginosa 522/17 MDR, Klebsiella pneumoniae ESBL 344 / (микроорганизмы были любезно предоставлены сотрудниками Института эпидемиологии и микробиологии им. Л. Пастера) и Escherichia coli ML-35 (предоставлена профессором Р. Лерером (Калифорнийский университет Лос-Анджелеса, США)).

В эксперименте использовали культуры бактерий в логарифмической фазе роста с концентрацией 1×10^5 колониеобразующих единиц (КОЕ) в мл. Бактерии выращивали в 2,1 % бульоне Мюллера-Хинтона M391 (HiMedia, Индия).

Двукратные серийные разведения исследуемых образцов проводили в 0,01 М натрий-фосфатном буфере, содержащем 0,1 % бычьего сывороточного альбумина и вносили по 5 мкл в лунки стерильной микрокамеры Терасаки. В эти же лунки вносили эквивалентное количество бактериальной суспензии. В качестве контролей служили: контроль стерильности среды и контроль жизнеспособности бактерий. Микрокамеры инкубировали при температуре 37 °С в течение 16–20 часов.

За минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) принимали наибольшую концентрацию вещества, при которой не наблюдали рост микроорганизмов в соответствующих лунках микрокамеры.

Для определения возможности исследуемых образцов повреждать мембраны эукариотических клеток использовали гемолитический тест [9]. Для определения гемолитической активности использовали эритроциты человека. К 90 мкл 2,8 %-ной суспензии эритроцитов в забуференном физиологическом растворе (ЗФР) добавляли 10 мкл анализируемого образца, серийные разведения которого готовили в 0,01 % уксусной кислоте. После добавления образцов получали 2,5 %-ные суспензии эритроцитов.

Для получения положительного контроля (100 % лизис эритроцитов) к 90 мкл суспензии эритроцитов добавляли 10 мкл детергента Triton X-100, разведенного в 10 раз в водном растворе 0,01 % уксусной кислоты. Для получения негативного контроля (0 % лизис эритроцитов) к 90 мкл суспензии эритроцитов добавляли 10 мкл 0,01 % уксусной кислоты.

Анализируемые растворы (по 3 параллели для каждой из исследуемых проб) инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. Реакцию останавливали добавлением 150 мкл охлажденного ЗФР. Затем пробы центрифугировали при 10000 об/мин в течение 4 мин. Отбирали 200 мкл супернатанта и вносили в ячейки 96-луночного планшета (Costar, Corning Inc.).

Измерение оптической плотности проб производили на планшетном спектрофотометре SpectraMax 250 (Molecular Devices, Sunnyvale, США) при длине волны 540 нм. По оптической плотности судили о содержании в супернатанте гемоглобина, вышедшего из разрушенных эритроцитов.

Процент гемолиза рассчитывали по формуле:

$$\text{Гемолиз (\%)}=\frac{OD_{540}(\text{образца})- OD_{540}(0\%\ \text{лизис})}{OD_{540}(100\%\ \text{лизис})- OD_{540}(0\%\ \text{лизис})}\times 100\%$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определены минимальные ингибирующие рост микроорганизмов концентрации исследуемых образцов в отношении различных бактерий, результаты представлены в таблице 1 как выборочные медианы, рассчитанные по данным серии 3–4 независимых экспериментов по 3 параллели проб в каждом.

Таблица 1 Минимальные ингибирующие рост микроорганизмов концентрации исследуемых образцов

Бактерии	МИК, мг/мл	
	Образец № 1	Образец № 2
E.coli ML-35 p	0,03125	0,125
P. aeruginosa 522/17 MDR	0,03125	0,125
K.pneumoniae ESBL 344/1	0,03125	0,25
S. aureus 1399/17	0,03125	0,5

Из таблицы 1 видно, что оба образца обладают антимикробной активностью в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий, но микроорганизмы более чувствительны к ионному серебру, чем к наночастицам серебра.

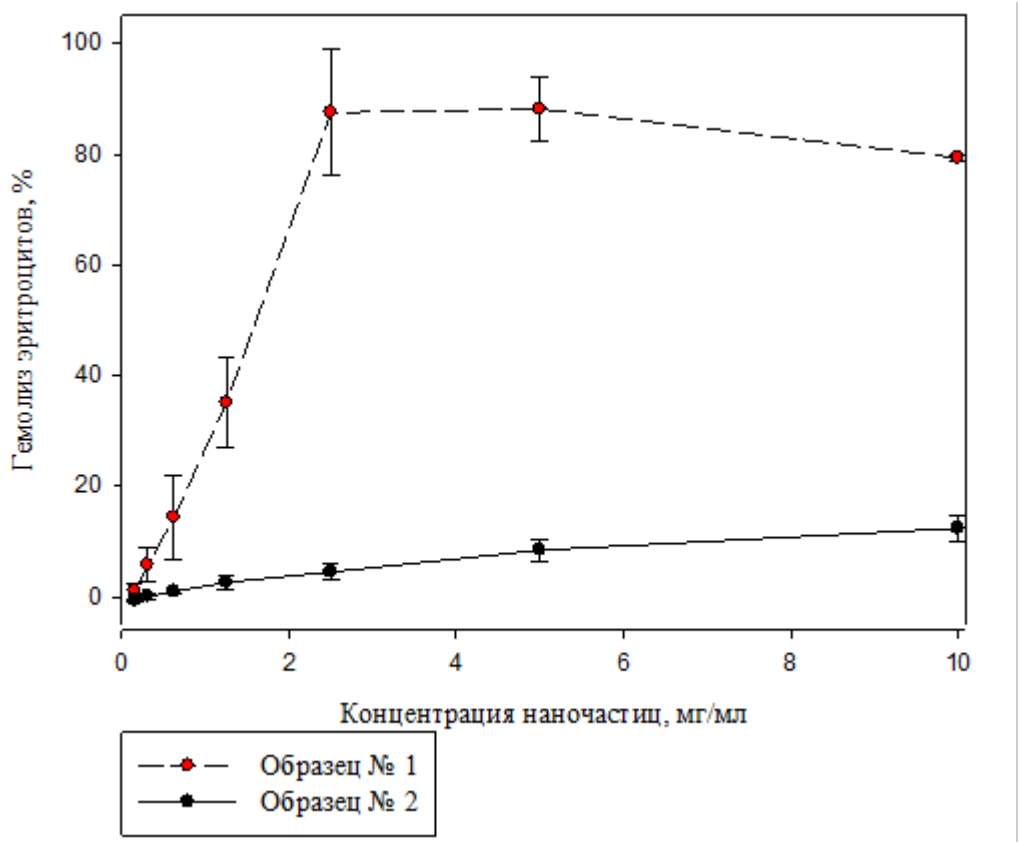


Рис. 1. Гемолитическая активность исследуемых образцов

Однако, кроме наличия антимикробной активности, необходимо отсутствие токсичности по отношению к клеткам человека. Гемолитический тест позволяет провести первичную оценку токсичности препаратов для эукариотических клеток. Процент гемолиза оценивали по данным трех независимых экспериментов, в каждом из которых имелось по три параллели исследуемых проб. Исходя из результатов гемолитического теста, представленных на рисунке 1, видно, что образец с ионным серебром вызывает гемолиз эритроцитов, в то время как образец с наночастицами серебра такой активностью в диапазоне исследуемых концентраций не обладает. Таким образом, получены новые данные, подтверждающие концепцию о преимуществах практического применения антимикробных препаратов на основе наночастиц серебра по сравнению с препаратами, содержащими ионное серебро.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lewies A., Du Plessis L.H., Wentzel J.F. Antimicrobial Peptides: the Achilles' Heel of Antibiotic Resistance? //Probiotics and antimicrobial proteins. – 2019. – V. 11, №. 2. – P. 370–381.

2. Rai M.K. et al. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria //Journal of applied microbiology. – 2012. – V. 112, № 5. – P.841–52.

3 Lara H.H. et al. Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds //Journal of nanobiotechnology. – 2011. – V.9. – E.30.

4. Kim J.S. et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles //Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. – 2007. – V.3. – P. 95–101.

5. Jung W.K. et al. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in Staphylococcus aureus and Escherichia coli //Appl. Environ. Microbiol. – 2008. – V. 74, №. 7. – P. 2171–2178.

6. Durán N. et al. Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action //Journal of the Brazilian Chemical Society. – 2010. – V.21, № 6. – P.949–959.

7. Durek A. et al. New antibacterial therapeutics and strategies //Pol J Microbiol. 2011. V. 60, № 1. P.3–12.

8. Park E.J. et al. Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism // Toxicology in vitro. – 2010. – V. 24, № 23, – P. 872–878.

9. Shafer W.M. (ed.). Antibacterial peptide protocols. – Humana Press, 1997. – V. 78. – 255 p.

УДК 615.453.4:577.164.2

РАЗРАБОТКА КАПСУЛЯРНОЙ ФОРМЫ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Э.В. Сынгеева, Н.Д. Ипатова, А.А. Толмачева, С.Д. Жамсаранова

Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления, Улан-Удэ, Россия

Витамины являются необходимыми веществами для реализации важнейших биохимических и физиологических процессов в организме человека [1]. Большинство из них не синтезируются в организме, поэтому возникает потребность получения витаминов с пищей [2]. На основе исследований американских биохимиков было установлено, что по сравнению с 1950 годом, в современных фруктах и овощах содержание витаминов снизилось, в частности, витамина С стало меньше на 15 % [3]. Аскорбиновая кислота с биологической точки зрения является антиоксидантом, который индуцирует инактивацию свободных радикалов, восстановителем и коферментом отдельных ферментов метаболических процессов, ее основная функция связана с поддержанием окислительно-восстановительного потенциала клетки [4]. В настоящее время в рационе питания современного человека наблюдается дефицит витамина С, что приводит к различным нарушениям в организме и его ослаблению [5,6]. Главной причиной этой недостаточности является его неустойчивость, малоусваиваемость, недостаточное поступление с пищей и потери при технологической переработке и хранении пищевого сырья. Витамин С легко разрушается в процессе пищеварения, приготовления и хранения продуктов [7]. Суточная норма потребления составляет 80 мг/сутки. По данным ФГБНУ «НИИ питания» (2015 г.) у 8 % взрослого населения наблюдается дефицит витамина С и у 30–40 % – витамина Е [3]. Для лучшего усвоения ученые рекомендуют употреблять аскорбиновую кислоту вместе с каротиноидами, витамином Е и флавоноидами [8].

Витамин Е способствует повышению антиоксидантного действия аскорбиновой кислоты [1], является основным жирорастворимым антиоксидантом в организме [9]. Токоферол защищает клеточные мембраны и другие липиды от окислительного повреждения, задерживает начальную фазу окислительного процесса [10]. Физиологическая потребность в витамине Е составляет 15 мг/сутки [3].

В настоящее время ученые уделяют большое внимание обогащению продуктов питания витаминами и микроэлементами, что приводит к развитию новых технологий, которые имеют широкий спектр применения в пищевой промышленности [4]. Системы носителей на основе фосфолипидов являются одними из наиболее перспективных технологий инкапсуляции, используемых в быстро растущей области нанотехнологий [8]. Наиболее эффективным решением является использование липосомальной структуры, которая является контейнером для доставки различных биологически активных веществ в клетки организма [4, 13]. Липосомы – это замкнутые двухслойные везикулы, образованные из фосфолипидных молекул, которые могут быть получены с использованием полностью натуральных ингредиентов, они биосовместимы с клеточными мембранами [8, 13]. Заключенное в липосомы вещество будет защищено от воздействия ферментов, что увеличивает эффективность препарата и повышает усваиваемость аскорбиновой кислоты.

Цель работы – разработка липосомальной формы водорастворимого витамина С.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения липосом был использован лецитин соевый гранулированный ТУ 9146–008–5883768–2005, содержащий 97 % фосфолипидов, ООО «Протеин» (г. Санкт-Петербург). В качестве растворителя использовали спирт этиловый 1 сорта ГОСТ Р 51652–2000. В качестве инкапсулируемых веществ использовали аскорбиновую кислоту, ОАО «Марбиофарм», α – токоферола ацетат, «Мелиген». Определение суммарного содержания водорастворимых антиоксидантов липосомальных продуктов проводили амперометрическим методом по ГОСТ Р 54037–2010. Условия хранения липосомальной формы витамина С определяли согласно МУК 4.2.1847–04 «Санитарно-эпидемиологическая оценка обоснования сроков годности и условий хранения пищевых продуктов». Перекисное число определяли титриметрическим методом по ГОСТ 26593–85, кислотное число по ГОСТ 52110–2003, pH определяли на pH-метре Mettler Toledo. Степень включения витамина С в липосомальную структуру определяли на спектрофотометре Cary 300, при этом не включившийся витамин С отделяли от липосом методом гель-фильтрации.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение липосомальных субстанций с использованием микронутриентов осуществляли по ранее используемой технологии, которая предусматривает смешивание двух предварительно подготовленных фаз: растворенного в спирте соевого лецитина с витамином Е (доза внесения 10 мг / 100 мл), используемого в качестве антиокислителя липидной фазы, и раствора витамина С в буфере. Исследовали 3 различные концентрации витамина С (100, 200, 300 мг / 100 мл). После трехкратного цикла замораживания-оттаивания липосомальной субстанции проводили формирование липосом через мембранные фильтры с диаметром пор 100 нм на мини-экструдоре Liposomal Fast-Basic (AVESTIN, Canada) нечетное количество раз [12].

Зависимость суммарного содержания водорастворимых антиоксидантов от дозы внесения аскорбиновой кислоты представлена на рисунке 1.

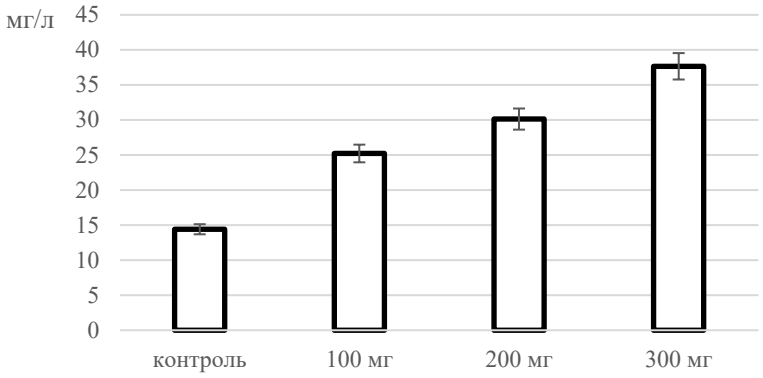


Рисунок 1 – Суммарное содержание водорастворимых антиоксидантов в липосомальной форме витамина С (контроль – липосомы без добавления витаминов; 100 мг, 200 мг, 300 мг – концентрации витамина С)

С увеличением дозы внесения аскорбиновой кислоты (100, 200, 300 мг) увеличивалось суммарное содержание антиоксидантов в исследуемых образцах, которое составило, соответственно, 25,22 ± 2,04; 30,13 ± 1,56; 37,66 ± 4,03 мг/л. В контрольном образце содержание составило 12,71 ± 1,43 мг/л.

На следующем этапе оценивали условия хранения в соответствии с МУК 4.2.1847–04 при разных температурных режимах (20 ± 5° С и 4 ± 2° С). В результате хранения при комнатной температуре в течении 21 дня в образцах наблюдалось появление плесени, поэтому данный температурный режим в дальнейшем не исследовался. При хранении в холодильнике в течении 21 дня не наблюдалось отклонений. Таким образом, рекомендуемый режим хранения липосомальной формы витамина С составил 4 ± 2° С.

Далее были исследованы показатели окислительной порчи при температуре хранения 4 ± 2° С в течение 3 месяцев. В процессе хранения кислотное число образцов с содержанием 200 и 300 мг аскорбиновой кислоты на 100 мл после 90 дней хранения составило 3,99 ± 0,2 и 4,46 ± 0,1 мг КОН/г, соответственно, что превысило регламентируемые показатели СанПин 2.3.2.1078–01 (не более 4 мг КОН/г). Кислотное число у образцов с концентрацией витамина С (100 мг / 100 мл) после 90 дней хранения составило 1,92 ± 0,03 мг КОН/г, что не превышало предельно допустимый показатель. Перекисное число также почти не изменилось в процессе хранения, у опытного образца оно составило 1,2 ± 0,1 моль O_2/кг, тогда как регламентируемый показатель не должен превышать 10 моль O_2/кг (СанПин 2.3.2.1078–01).

В таблице 1 представлена характеристика липосомальной формы витамина С в концентрации 100 мг / 100 мл, которая имела следующие органолептические показатели: вязкая, однородная масса молочно-белого цвета, нейтрального вкуса, без запаха. Степень включения витамина С в липосомы составила в среднем 73 %.

Таблица 1 – Характеристика липосомальной формы витамина С в концентрации 100 мг / 100 мл

Показатели	Характеристика
Цвет	Молочно-белый
Вкус	Нейтральный
Запах	Без запаха
Консистенция	Вязкая, однородная
pH	6,95
Степень включения, %	73,13 ± 8,05

Таким образом, наиболее оптимальные характеристики были получены для липосомальной формы витамина С в буферном растворе в концентрации 100мг / 100мл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проделанной работы мы ввели витамины С и Е в липосомальную структуру, разработали технологическую схему получения биологически активной добавки, содержащей водорастворимый витамин С в липосомальной форме, определили качественные характеристики липосомальной формы витаминов, установили условия хранения. Полученные образцы липосомальной формы витамина С в концентрации 100 мг / 100 мл характеризовались стабильными качественными показателями в течение 90 дней хранения при температуре 4 ± 2° С без существенных изменений. Обладали антиоксидантным эффектом, суммарное содержание водорастворимых антиоксидантов составило 25,22 ± 2,04 мг / 100 мл.

Разработанный липосомальный витаминный премикс обладал хорошими органолептическими показателями, содержал достаточно высокое включение витамина С в биодоступной форме, предохраняемой от воздействия физико-химических, биологических факторов. По данным Khorasani et all, находящаяся в водной полости липосом аскорбиновая кислота, может регенерировать α-токоферол [8]. В комплексе витамины С и Е биосовместимы и усиливают действие друг друга [4, 8].

В дальнейшем планируется оптимизация соотношения витаминов С и Е с целью повышения эффективности витамина Е в данной липосомальной форме и разработка функционального ингредиента с высоким содержанием не только витамина С, но и витамина Е, и обладающих значительным антиоксидантным действием.

ЛИТЕРАТУРА

Общая биохимия: витамины / Докучаева Е.А., Сяхович В.Э., Богданова Н.В. // Под ред. Сахарова А.Д., Бокутя С.Б. – Минск: 2017. – 52 с.

Коденцова В.М. и др. Обеспеченность населения России микронутриентами и возможности ее коррекции. Состояние проблемы // Вопросы питания – 2017. – Т.86 – № 4. – С. 114–118.

Коденцова В.М., Погожева А.В., Громова О.А. и др. Витаминно-минеральные комплексы в питании взрослого населения // Вопросы питания – 2015. – Т.84 – № 6. – С. 142–144.

Marsanasco M. et al.. Liposomes as vehicles for vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment // Food Research International. 2011. № 44. С.3039–3046.

Быковченко И. Витаминная проблема и ее решения // Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской технике – 2013. – С. 42–45.

Геворкян А.К. Дефицит витаминов и микроэлементов: мнение практикующего педиатра // Обучение обучающих – образовательные программы для родителей. – 2011 г. – С. 125–126.

Что могут витамины: Парадоксы правильного питания / Спиричев В.Б. // Под ред. Деревянко Т. – 2013. – 288 с.

Khorasani S., Danaei M., Mozafari M.R. Nanoliposome technology for the food and nutraceutical industries // Trends in Food Science & Technology – 2018. – № 79 – С. 106–115.

Касимова А.Р., Колбин А.С. Возможно ли расширение показаний к применению жирорастворимых витаминов у детей? Взгляд с позиции доказательной медицины // Медицинские технологии. Оценка и выбор – 2016. – № 4. – С. 79–86.

Кличханов Н.К., Маяхи М.Т.Д., Исмаилова Ж.Г. и др. Влияние витаминов-антиоксидантов С и Е на свободно-радикальные процессы в крови крыс // Медицинский альманах – 2013. – № 3. – С. 56–57.

Vivek K. Bajpai, Madhu Kamle, Shruti Shukla. Prospects of using nanotechnology for food preservation, safety, and security // Science Direct – 2018. – № 26 – С.1201–1214.

Сынгеева Э.В., Ламажапова Г.П., Жамсаранова С.Д. Оптимизация условий получения липосомальной формы концентрата полиненасыщенных жирных кислот // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология – 2017. Т. 7 – № 1. – С. 82–91.

Толчева Е.В., Оборотова Н.А. Липосомы как транспортное средство для доставки биологически активных молекул // Российский биотерапевтический журнал – 2006. Т.5 – № 1. – С. 54–61.

УДК 328

ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ СВОЙСТВА ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ РОДА BACILLUS

С.А. Лазарев, Н.А. Михайлова

Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Россия, Москва

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время перспективными по терапевтическому потенциалу лекарственными средствами для коррекции дисбиоза являются метабиотики – препараты на основе продуктов жизнедеятельности пробиотических микроорганизмов [1, 2].

В этом аспекте представляют интерес бактерии рода Bacillus, метаболиты которых могут оказывать положительные эффекты на макроорганизм [3, 4].

Механизм пробиотического действия бацилл связан с синтезом антибиотикоподобных веществ с широким спектром антагонистической активности в отношении патогенных и условно патогенных микроорганизмов [5]. По своей структуре они близки к противомикробным пептидам, синтезируемым в организме человека. Их действие направлено на формирование мембранных пор, приводящих к гибели патогенных бактерий, что делает невозможным формирование устойчивости к препаратам на их основе [6]. Этот факт позволяет предположить, что при использовании метабиотиков может быть решена проблема антибиотикорезистентости условно патогенных микроорганизмов – возбудителей различных инфекций (в том числе ВБИ). Кроме того, препараты на основе метаболитов бактерий рода Bacillus по сравнению с антибиотиками будут лишены побочных эффектов [7], что делает возможным их применение больным со сниженным иммунитетом, в случае необходимости проведения противомикробной терапии.

Известно, что бактерии рода Bacillus, а в частности B. Subtilis, продуцируют ферменты различных классов, активность которых зависит от индивидуальных особенностей штаммов. Особенно хорошо развита у этих микроорганизмов система гидролаз [8]. О высокой активности ферментов свидетельствует тот факт, что бактерии рода Bacillus используют в пищевой промышленности для ферментативной обработки изготавливаемых продуктов, снижая их аллергенный потенциал [9].

Подбор наиболее функциональных штаммов бактерий рода Bacillus или их консорциума поможет в дальнейшем создать новый биопрепарат–метабиотик с широким терапевтическим диапазоном.

Ранее в ФГБНУ НИИВС им. Мечникова РАМН были выделены и охарактеризованы штаммы Bacillus, обладающие высокой антагонистической активностью в отношении широкого круга условно патогенных бактерий и грибов: Bacillus subtilis 1719, Bacillus subtilis 3H, Bacillus Pumillus «Пашков» [10–12]. Однако их ферментативные свойства были изучены не достаточно.

Целью проведенных исследований явилась сравнительная оценка ферментативной активности штаммов: Bacillus Pumillus «Пашков» и Bacillus subtilis 1719 и 3H.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили штаммы: Bacillus Pumillus «Пашков», Bacillus subtilis 1719, Bacillus subtilis 3H.

Выращивание штаммов проводили методом периодического гомогенного глубинного культивирования в течение 24 часов в условиях аэрации и перемешивания при температуре 37 °С на полусинтетической питательной среде.

Для отделения метаболитов от клеточной массы (получение супернатанта) проводили центрифугирование при 8000 об/мин в течение 30 минут.

Для определения протеолитической активности использовали чашки Петри с агаризованным 2 % раствором казеина на 0,1 М трис–HCl буфере, в котором вырезали лунки диаметром 5 мм. Стерильным шприцом в опытные лунки вносили супернатант, в контрольные – физиологический раствор. Чашки термостатировали при температуре 37 °С 24 часа. Результат оценивали по диаметру прозрачных зон гидролиза, образующихся в течение 3 минут после добавления в чашки 5 % раствора трихлоруксусной кислоты.

Определение продукции амилазы осуществляли в чашках Петри с картофельным агаром. Стерильным шприцом в опытные лунки диаметром 5 мм вносили супернатант, в контрольные – физиологический раствор. Далее чашки термостатировали при 37 °С 24 часа. Результат оценивали по диаметру прозрачных светло–коричневых зон, образующихся в течение 5 минут после добавления в чашки 5 мл раствора Люголя.

Для определения продукции липазы в чашках Петри с агаризированной средой, содержащей твин-20, вырезали лунки диаметром 5 мм. Стерильным шприцом в опытные лунки вносили супернатант, в контрольные – физиологический раствор. Затем чашки термостатировали при 37 °С 24 часа. Результат оценивали по диаметру прозрачных зон гидролиза вокруг лунок.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении протеолитических свойств штаммов выявлены различия в активности: зоны гидролиза у штаммов сенной палочки оказались в два раза больше, чем у B. Pumillus. (табл. 1). Амилолитические свойства также были более выраженными у штаммов B. Subtilis 1719 и 3H, чем у B. Pumillus «Пашков». Активность сенной палочки в 2–2,5 раза оказалась выше (табл. 2). При исследовании липолитической активности диаметр зон гидролиза штаммов сенной палочки почти в 3 раза был больше, чем у B. Pumillus «Пашков» (табл. 3)

Таблица 1. Протеолитическая активность Bacillus Pumillus «Пашков», Bacillus subtilis 1719, Bacillus subtilis 3H

Штаммы		Диаметр зоны гидролиза, мм
1.	Bacillus Pumillus «Пашков»	11,0 ± 0,8
2.	Bacillus subtilis 1719	28,0 ± 1,1
3.	Bacillus subtilis 3H	25,0 ± 0,7

Таблица 2. Амилолитические свойства Bacillus Pumillus «Пашков», Bacillus subtilis 1719, Bacillus subtilis 3H

Штаммы		Диаметр окрашенной зоны, мм
1.	Bacillus Pumillus «Пашков»	9,0 ± 0,3
2.	Bacillus subtilis 1719	24,0 ± 0,6
3.	Bacillus subtilis 3H	23,0 ± 0,7

Таблица 3. Липолитическая активность Bacillus Pumillus «Пашков», Bacillus subtilis 1719, Bacillus subtilis 3H.

Штаммы		Диаметр зоны гидролиза, мм
1.	Bacillus Pumillus «Пашков»	5,0 ± 0,3
2.	Bacillus subtilis 1719	13,0 ± 0,7
3.	Bacillus subtilis 3H	14,0 ± 0,3

Полученные результаты свидетельствуют о высокой ферментативной активности штаммов Bacillus subtilis 1719, Bacillus subtilis 3H., что согласуется с данными литературы [8]. При изучении антагонистических свойств нами получены данные, свидетельствующие о наиболее высокой активности именно у штамма B. Pumillus «Пашков» [12]. Исходя из этого, можно предположить, что противомикробные и ферментативные свойства бактерий рода Bacillus имеют штаммовые функциональные особенности, что необходимо учитывать при создании метабиотических препаратов широкого спектра действия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные в настоящей работе результаты расширяют представление о ферментативных свойствах бактерий рода Bacillus и позволяют установить, что штаммы B. Subtilis(3H и 1719) обладают более высокими ферментативными свойствами, чем штамм B. Pumillus «Пашков».

ЛИТЕРАТУРА.

Shenderov B.A., Metabiotics: novel idea or natural development of probiotic conception // Microb Ecol Health Dis. 2013. Vol.24(1). Doi: 10.3402/mehd.v24i0.20399

Волынец Г.А., Хавкин А.И. Современное представление о способах коррекции кишечной микробиоты при дисбиозе. // Вопросы практической педиатрии. -2018. – № 3. – С. 41–51

Hong, H.A., Duc L.H., Cutting S.M. The use of bacterial spore formers as probiotics // FEMS Microbiol. Rev. – 2005. – Vol. 29, № 4. – P. 813–835.

Сорокулова, И.Б. Перспективы применения бактерий рода Bacillus для конструирования новых биопрепаратов // Антибиотики и химиотерапия. – 1996. – Т. 41, № 10. – С. 13–15.

Михайлова Н.А., Гринько О.М. Бактерии рода Bacillus – продуценты биологически активных веществ антимикробного действия. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2010, № 3, С. 85–89

Antimicrobial peptides of the genus Bacillus: a new era for antibiotics / Sumi C.D, Yang B.W., Yeo I.C., Hahm Y.T. // Can. J. Microbiol. – 2015. – Vol. 61, № 2. – P. 93–103.

Осипова, И.Г., Михайлова, Н.А., Сорокулова, И.Б., Васильева, Е.А., Гайдеров, А.А. Споровые пробиотики // Ж. микробиол. – 2003. – № 3. – С. 113–119.

Заборицкий Н.А. Биологически активные вещества, синтезируемые пробиотическими микроорганизмами родов Bacillus и Lactobacillus // Журнал научных статей здоровье и образование в 21 веке. 2015. № 3.– С. 80–90

Савустьяненко А.В. Механизмы действия пробиотиков на основе Bacillus subtilis. // Актуальная инфектология. – 2016. – № 2. – С. 35–44

Михайлова Н.А., Гатауллин А.Г. Штамм бактерий Bacillus subtilis 1719 – продуцент антагонистически активной биомассы в отношении болезнетворных микроорганизмов, а также протеолитических, амилолитических и липолитических ферментов. // Патент РФ № 2298032. 2007

Михайлова Н.А. и др. Штамм бактерий Bacillus subtilis, несущий свойство антибиотикорезистентности, используемый для получения препарата «Бактиспорин» // Патент РФ № 2067616. 1996

Гринько О.М. и др. Штамм бактерий Bacillus Pumilus «Пашков» – продуцент биологически активных веществ, обладающих антагонистической активностью в отношении условно-патогенных, патогенных бактерий, дрожжевых грибов и вирусов. // Патент РФ № 2405821. 2010

УДК 328

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ВВЕДЕНИИ РЕКОМБИНАНТНОЙ ВАКЦИНЫ СИНЕГНОЙНОЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ЖИВОТНЫМ

Е.О. Калиниченко, А.В. Солдатенкова, Е.М. Зимина, С.А. Лазарев, А.А. Калошин, А.А. Поддубиков, Н.К. Ахматова, Н.А. Михайлова

Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Россия, Москва

В рамках доклинических испытаний вакцины против Pseudomonas aeruginosa «РВС» на основе рекомбинантных антигенов OprF и анатоксина, проводимых в ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова [1,2] выполнено исследование биологических свойств и иммунного ответа: острой и хронической токсичности, пирогенности, аллергизирующих свойств, влияния на фагоцитарную и бактерицидную активность лейкоцитов, созревание дендритных клеток и иммуногенность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Острую токсичность РВС изучали на белых мышах и морских свинках, хроническую – на крысах и морских свинках при однократном и многократном введении 1 ч.д. и 10 ч.д.

Пирогенность оценивали в ЛАЛ-тесте и опыте на кроликах.

Определение иммуногенной активности проводили на аутбредных белых мышах после двукратного введения РВС с двухнедельнным интервалом и последующего заражения живой вирулентной культурой Pseudomonas aeruginosa.

Местное действие исследовали на морских свинках после подкожного введения 1 прививочной дозы РВС и последующего обследования места инъекции, местно-раздражающее действие оценивали по реакции конъюнктивы кроликов в ответ на инстилляцию РВС на слизистую оболочку.

Иммунотоксичность РВС определяли по способности вырабатывать антителобразующие клетки в ответ на иммунизацию мышей эритроцитами барана.

Способность вызывать ГЗТ и ГНТ определяли на морских свинках.

Фагоцитарную активность изучали по поглощению нейтрофилами и моноцитами периферической крови иммунизированных животных убитых микробных клеток Staphylococcus aureus.

Для оценки влияния вакцины на бактерицидную активность лейкоцитов использовали живую культуру S. aureus.

Оценку иммунофенотипа ДК и уровня цитокинов осуществляли методом проточной цитометрии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований показано отсутствие токсического действия РВС на системы и органы лабораторных животных в опытах острой и хронической токсичности. Не выявлено пирогенности в ЛАЛ-тесте и испытаниях на кроликах, а также местного и местно-раздражающего действия. В тесте «анафилактический шок» на морских свинках отмечены слабо выраженные аллергизирующие свойства только при ведении 10 ч.д., степень выраженности симптомов не превышала категорию Б (т. е. единичные чихания и почесывания). В тесте моделирования индукции реакции ГЗТ показано отсутствие аллергизирующего действия.

В тесте реакции антителобразующих клеток (АОК) в ответ на иммунизацию эритроцитами барана (ЭБ) показано, что вакцина не обладает супрессивной активностью в отношении В-лимфоцитов селезенки. Выявлено стимулирующее действие вакцины на дендритные клетки (усиление синтеза цитокинов), на бактерицидную и фагоцитарную активности лейкоцитов периферической крови. РВС обладала иммуногенными свойствами, защищая от заражения экспериментальных животных.

ЛИТЕРАТУРА

Калошин А.А., Солдатенкова А.В., Зимина Е.М., Михайлова Н.А. Разработка экспериментальной рекомбинантной синегнойной вакцины // Актуальная биотехнология, 2017, № 2 (21)

Михайлова Н.А., и др. доклинические исследования рекомбинантной вакцины синегнойной (РВС) // Биотехнология: состояние и перспективы развития Материалы международного конгресса. 2019. С. 167–169.

УДК 616–097

ТВЕРДОФАЗНЫЕ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЕ ТЕСТ-СИТЕМЫ В МОНИТОРИНГЕ ГЛАЗНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Б.Р. Назмутдинов[1,2], Л.А. Хасанова[1], Н.Н. Курчатова[2], З.М. Хасанова[1]

[1] Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы, Уфа, Россия
[2]Всероссийский центр глазной и пластической хирургии Минздрава Российской Федерации, Уфа, Россия

Разработаны твёрдофазные иммуноферментные тест-системы для оценки тканеспецифического иммунного ответа в комплексном иммунологическом обследовании офтальмологических больных.

Известно, что аутоиммунные реакции, спровоцированные появлением антител к тканеспецифическим антигенам глаза имеют место в патогенезе самых разных офтальмологических заболеваний. Несмотря на очевидную актуальность применения иммунологических методов для точной лабораторной диагностики глазных болезней в настоящее время отсутствуют эффективные отечественные тест-систем для определения аутосенсибилизации к тканеспецифическим антигенам глаза [1–4].

На основании клинических и биохимических показателей крови условно здоровых доноров, а также пациентов с диагнозами увеит и посттравматическая субатрофия глазного яблока определяли наличие антител к белку BCP-54 роговицы, α-кристаллину хрусталика, S-антигену сетчатки в сыворотке донорской крови, а также выявляли клеточную сенсибилизацию лимфоцитов в реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ). Определение антител к белку BCP-54 роговицы, α-кристаллину хрусталика, S-антигену сетчатки в сыворотке крови здоровых доноров выявило, что частота встречаемости положительных результатов составила всего 4 % от числа обследованных доноров. Однако у больных увеитом в среднем антитела к белку BCP-54 роговицы в сыворотке крови определялись у 64 % пациентов, α-кристаллину хрусталика – у 68 % пациентов, S-антигену сетчатки – у 52 % пациентов. При посттравматической субатрофии глазного яблока антитела к белку BCP-54 роговицы были выявлены у 48 % пациентов, α-кристаллину хрусталика – у 72 % пациентов, S-антигену сетчатки – у 64 % пациентов.

С очевидностью можно утверждать целесообразность использования офтальмоспецифического иммунологического мониторинга с помощью твердофазных иммуноферментных тест-систем для выявления глазных заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

Слепова О.С. Органоспецифический аутоиммунитет при воспалительной патологии сетчатки и увеального тракта (патогенез, диагностика, обоснование терапии). // Дисс. докт. биол. наук. – М. – 1991. – 407 с.

Яковлева В.Г. Твердофазная иммуноферментная тест-системы для выявления антител к ретинальному S-антигену и ее использование в комплексном иммунологическом обследовании офтальмологических больных // диссертация Челябинск – 2000 – С. 6–7.

Nussenblatt R.B., Kuwabara T., DeMonasterio F.M., Wacker W.B. S-antigen uveitis in primates: A new model for human disease // Arch Ophthalmol. -1981. – V.99. – P.1090.

Nussenblatt R.B., Palestine A.G., El-Saied M. et al. Long term antigen specific and non-specific T-cell lines and clones in uveitis. // Curr. Eye Res. – 1984. – V.3. – P.299–305.

УДК 602.44

МОДЕРНИЗАЦИЯ И ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОИЗВОДСТВА ЛАКТОГЛОБУЛИНА ПРОТИВ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ И САЛЬМОНЕЛЛ

Г.С. Алешукин, А.В. Алешукина, К.Г. Маркова

ФБУН Ростов НИИ микробиологии и паразитологии, г. Ростов-на-Дону, Россия

Лактоглобулин (ЛГ) – уникальный отечественный иммунобиологический препарат представляет собой очищенную фракцию глобулинов иммунного молозива коров и содержит антитела к S.thyphimurium, S.enteritidis, S.dublin, P.mirabilis, P.vulgaris, K.pneumoniae, P.aeruginosa. ЛГ предназначен для лечения острых кишечных инфекций и коррекции нарушений микробиоты кишечника после антибиотикотерапии. Производителем ЛГ является ФБУН Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии. ЛГ был удостоен Государственной премии Российской Федерации [1]. В 2010 г. выпуск ЛГ был временно приостановлен из-за физического и морального старения производства. Возобновление выпуска ЛГ актуально в связи с ростом антибиотикорезистентных условно-патогенных бактерий (УПБ) в качестве альтернативного средства, не вызывающего привыкания.

Цель работы: Проведение модернизации и оптимизации процесса получения препарата.

ЛГ против УПБ и сальмонелл получают методом спиртового осаждения по Кону. Затем используют многоступенчатую фильтрацию и лиофилизацию [2,3]. Контроль специфичности осуществляют ИФА на базе тест-системы с использованием белка А S.aureus конъюгированным с пероксидазой хрена. Электорофорез на ацетатной пленке, ВЭЖХ и масс-спектрометрия были использованы для контроля идентичности ЛГ и его чистоты [4].

Уменьшение времени производства достигнуто введением 2-х ступенчатого центрифугирования лактосыворотки (1,5 час. вместо 18 час) Выход концентрата ЛГ возрастает в 5 раз. Модифицирована очистка ЛГ фильтрацией на современных фильтрационных установках и сокращен этап получения раствора ЛГ(с 12 час. до 1,5 часов). Розлив ЛГ с использованием высокоэффективного дозировочного модуля дает сокращение времени с 6 час. до 1 час. на 1000 флаконов.

Проведена работа по уменьшению производственных отходов. Очистка спиртосодержащего центрифугата от примесей фильтрацией и его восстановление для повторного использования в цикле сократило расход этанола на 20–30 %. Побочный продукт – молозивный творог используется как основа для питательных сред для культивирования лактобацилл, бифидобактерий, грибов рода Candida. Отработаны подходы по использованию сливок и молозивного творога в качестве биологически-активных добавок для повышения массы тела и стабилизации иммунитета у ослабленных и беременных лабораторных животных.

Оптимизация технологического процесса получения ЛГ на основе нового высокотехнологичного оборудования и использование побочных продуктов делает производство препарата высокоэффективным и экономически выгодным.

ЛИТЕРАТУРА

Соболева С.В. Лактоглобулины-препараты нового поколения для лечения и профилактики острых кишечных инфекций и дисбактериозов у детей. / Сборник докладов Юбилейная научно-практическая конференция, посвященная 100-летию Ростовского научно-исследовательского института микробиологии и паразитологии, Ростов-на-Дону, 23–24 сентября 2009 года. – Ростов-на-Дону, – 2009 г. – с. 251–256.

ФСП 42–0425662705. Лактоглобулин против условно-патогенных бактерий и сальмонелл коровий, лиофилизат для приготовления раствора для применения внутрь. Ростов-на-Дону, 2005, – 10 с.

ПР04/0412 от 16.04.2012 г. Лактоглобулин против условно-патогенных бактерий и сальмонелл коровий Ростов-на-Дону. – 102 с.

Алешукин Г.С. и др. Оптимизация модификации производства лактоглобулина против условно-патогенных бактерий и сальмонелл. Сборник научно-практических работ VII Межрегиональной научно-практической конференции «Воздушно-капельные инфекции: микробиология, эпидемиология, биотехнология», Ростов-на-Дону. 2018.

УДК 66.047

РЕКОМБИНАНТНЫЕ АНТИГЕНЫ PSEUDOMONAS AERUGINOSA: ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

А.А. Калошин, Е.М. Зимина, Н.А. Михайлова

НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

Известно, что в формировании защиты от бактериальных инфекций важную роль играют поверхностные белки. У Pseudomonas aeruginosa такими свойствами обладают белки F, L и I наружной мембраны (OprF, OprL и OprI). Особую роль в генерализации инфекции и повреждающем действии оппортунистических бактерий играют экзотоксины. Наиболее опасным фактором патогенности P. aeruginosa является экзотоксин А, ингибирующий белковый синтез. Поэтому в качестве объектов исследований нами выбраны поверхностные белки OprF, OprL и OprI, а также экзотоксин А.

Последовательности целевых генов амплифицировали с помощью ПЦР, используя в качестве матрицы геномную ДНК P. aeruginosa PA-103. В результате амплифицированы последовательности генов мембранных белков oprF, oprL и oprI, которые встроили в плазмиду pQE-30 (QIAGEN). В результате экспрессии в клетках Escherichia coli штамма M15 (QIAGEN) синтезированы рекомбинантные продукты со следующими молекулярными массами: 38,9 кДа (OprF), 19,2 кДа (OprL) и 10,1 кДа (OprI). При клонировании экзотоксиновой последовательности амплифицированный ген toxA встроили в плазмиду pET-28b(+) (Novagen). Экспрессию проводили в клетках E. coli штамма BL21(DE3). Таким образом, синтезировали высокотоксичный для мышей и культуры эукариотических клеток рекомбинантный белок (экзотоксин А) с молекулярной 73,8 кДа. Далее с помощью специфических рестриктаз, вырезали из гена toxA фрагмент размером 1,6 kb, который встроили в плазмиду pET-28b(+). В результате экспрессии последней конструкции получили рекомбинантную атоксическую форму (анатоксин) с молекулярной массой 65,8 кДа, у которой был нарушен третий домен, отвечающий за цитотоксическую функцию. Синтез рекомбинантных белков, с использованием созданных продуцентов, проводили путем индукции экспрессии с помощью ИПТГ. Очистку рекомбинантных белков осуществляли методом хелатной хроматографии с использованием Ni-сефарозы. Белковые продукты анализировали электрофорезом в полиакриламидном геле по методу Лэммли и в иммуноблоттинге.

Протективные свойства препаратов, сорбированных на геле гидроокиси алюминия, оценивали на мышах, которых иммунизировали внутрибрюшинно. Через две недели после последнего введения препаратов животным внутрибрюшинно инъецировали патогенный материал. Наиболее эффективной оказалась схема двукратного введения с двухнедельным интервалом. В экспериментах с мембранными белками использовали нетоксигенный штамм PA-170015, характеризующейся отсутствием синтеза экзотоксинов, а при исследовании протективных свойств анатоксина использовали рекомбинантный экзотоксин А и штамм PA-103, обладающий основными факторами патогенности. Наиболее выраженные протективные свойства проявляли рекомбинантные белки OprF, OprL и анатоксин. Рекомбинантный белок OprI обладал низкой иммуногенностью, что вероятно связано с его малым молекулярным весом. При введении комплексов рекомбинантных белков наблюдали аддитивный эффект, с наилучшим результатом у смеси рекомбинантных OprF и анатоксина.

Используя результаты исследования отдельных рекомбинантных антигенов, создали различные варианты слитных рекомбинантных белков: OprF-OprI, ΔOprF-OprI, OprF-ΔOprI, ΔOprF-ΔOprI, OprF-aTox, OprF-aTox-ΔOprI, штаммы-продуценты которых были получены в результате слияния генов oprF, oprI и atoxA (ген анатоксина) в одном векторе для экспрессии. Установлено что слитые рекомбинантные белки обладали более выраженными иммуногенными свойствами по сравнению с моноантигенами. Среди слитых вариантов наиболее эффективными оказались OprF-ΔOprI и OprF-aTox-ΔOprI.

Таким образом, в результате проведенных исследований получены рекомбинантные белки, обладающие защитными свойствами от экспериментальной инфекции P. aeruginosa и отобран комплекс двух рекомбинантных белков (OprF и анатоксина), а также слитые рекомбинантные белки, которые могут быть использованы для разработки антисинегнойных вакцин.

УДК 66.047

СИНЕГНОЙНАЯ ИНФЕКЦИЯ – СОВРЕМЕННЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИММУНОПРОФИЛАКТИКИ

Н.А. Михайлова, А.А. Калошин, Е.М. Зимина, А.В. Солдатенкова, Е.О. Калиниченко

НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

Синегнойные инфекции широко распространены в стационарах различного профиля. Синегнойная палочка одним из главных возбудителей оппортунистических инфекций, предпосылками для развития которых являются ослабление иммунной системы больного и высокая резистентность патогена к широкому кругу химиотерапевтических средств, применяемых в клиниках. Этими обстоятельствами объясняется низкая эффективность антибиотиков третьего и четвертого поколения, а также высокая летальность при синегнойных осложнениях. Одним из путей решения этой проблемы может явиться создание специфических иммунобиологических средств, в частности, вакцин.

Разработки антисинегнойных вакцин активно проводятся за рубежом и в России более полувека, однако препараты, создаваемые по традиционным технологиям, оказались недостаточно эффективными и реактогенными. В настоящее время в практике российского здравоохранения используют польскую вакцину Псевдовак, созданную на основе водорастворимых антигенов бактериальной клетки Pseudomonas aeruginosa, которая в ряде случаев вызывает побочные эффекты в виде выраженных местных реакций, обусловленных составом вакцины, включающей полисахарид и фенол. Другим направлением разработки противосинегнойных вакцин является использование генно-инженерных методов для получения протективных антигенов, лишенных токсичности. Современные технологии позволяют получать рекомбинантные белки как в виде отдельных антигенов, так и в виде слитых рекомбинантных композиций. В ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова в течении ряда лет проводились исследования по этим двум направлениям. В частности, создан прототип рекомбинантной синегнойной вакцины (РВС), которая основана на рекомбинантном белке F наружной мембраны (OprF) и делеционной атоксической формы экзотоксина А (анатоксин), сорбированных на гидроокиси алюминия.

К настоящему времени вакцина РВС прошла все этапы доклинического исследования в соответствии с руководством под редакцией А.Н. Миронова. В результате изучения показателей качества трех серий РВС подтверждены ее подлинность, стерильность, апирогенность и отсутствие аномальной токсичности. Оценку иммуногенной активности проводили в опытах при двукратной иммунизации мышей с последующим заражением вирулентной культурой синегнойной палочки штамма РА-103. Индекс эффективности вакцины составил 3,0 и более. Этот показатель сохранил стабильность при хранении всех экспериментальных серий вакцины в течении двух лет.

При изучении показателей безопасности на животных показано, что экспериментальные серии вакцины не обладали острой и хронической токсичностью, не вызывали местного и местно-раздражающего действия, не проявляли аллергезирующих свойств, а также стимулировали клеточный и гуморальный иммунитет. Успешно прошедшие доклинические исследования позволили рекомендовать вакцину РВС для клинических испытаний.

В настоящее время продолжаются исследования по изучению иммунобиологических свойств слитых рекомбинантных белков.

Работа выполнена в соответствии с Государственным Контрактом от 28 апреля 2017 г. № 14.N08.11.0135 в рамках ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» по теме «Доклинические исследования вакцины на основе рекомбинантных протективных антигенов, предназначенной для профилактики инфекций, вызываемых синегнойной палочкой».

УДК 615.33

РЕЗИСТЕНТНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ КАК ОДНА ИЗ КЛЮЧЕВЫХ ПРОБЛЕМ МЕДИЦИНЫ, ВЕТЕРИНАРИИ, БИОТЕХНОЛОГИИ

А.Ю. Искусных[1], Д.О. Искусных[2]

[1] ВГМУ им. Н.Н. Бурденко Минздрава России, Воронеж, Россия
[2] Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Открытие антибиотика пенициллина микробиологом А. Флеммингом в начале прошлого века совершило переворот в науке, и в настоящий момент медицина немыслима без антибиотиков.

Антибиотики применяют в ряде отраслей народного хозяйства (растениеводство, животноводство, ветеринария, пищевая промышленность и др.), где они используются более широко, чем в медицине, например, для лечения сельскохозяйственных животных, борьбы с фитопатогенными микроорганизмами, а также для увеличения биомассы животных (биомицин – производное тетрациклина). Антибиотики используются при исследовании механизмов биосинтеза белка, нуклеиновых кислот и структуры клеточных стенок бактерий и др.

В настоящее время известно более 10 000 соединений подобного действия, большая часть из них проявляет высокую токсичность, поэтому в клинике нашли применение только около 200.

Современная промышленность занимается вопросами получения высокопродуктивных продуцентов (отбор перспективных образцов, применение индуцированного мутагенеза для повышения продуктивности), разработкой и усовершенствованием технологических приемов промышленного производства антибиотиков (подбор сред, выделение, очистка и т. д.), контролем качества, а также изысканием новых форм антибиотиков, и эта задача выходит на первый план из-за развития резистености ко многим известным антибиотикам и широкого распространения мультирезистентности и панрезистентности.

Проблема резистентности микроорганизмов настолько серьезна, что затрагивает все страны, касается всех членов мирового сообщества, и в настоящий момент ВОЗ считает ее решение одной из первостепенных задач [1]. Основными причинами возникновения проблемы стало нерациональное использование антибактериальных препаратов в медицине и сельском хозяйстве, широкое повсеместное использование антисептических средств. Антибиотикорезистентность как адаптивный процесс лежит в основе экологических взаимоотношений микроорганизмов и возникла задолго до появления человека. Антибиотики относят к числу сигнальных молекул, с помощью которых осуществляется обмен информацией в бактериальных сообществах в природной среде. Мишенью антибиотиков служат чаще всего ферменты, участвующие в процессах биосинтеза клеточной стенки, синтезе нуклеиновых кислот и метаболитов.

Гены устойчивости также существовали миллиарды лет, они найдены у микроорганизмов повсеместно, даже в вечной мерзлоте, и выполняли свои функции, например, ген бета-лактамазы был необходим в процессе синтеза клеточной стенки, гены эффлюксных помп – в удалении из клетки продуктов обмена [2].

В качестве природных биохимических механизмов устойчивости выступает изменение проницаемости мембран, детоксикация антибиотика, выведение его из клетки с помощью эффлюксных помп и др. Грамотрицательные бактерии способны к большей резистентности, т. к. осуществляют детоксикацию, например, бета-лактамных антибиотиков, в периплазматическом пространстве. Приобретенная резистентность на биохимическом уровне может быть связана с инактивацией антибиотика, с изменениями в конформации мишеней (фосфорилирование, ацетилирование, метилирование рецепторов), а также с активным выбросом антибиотика из клетки. Ключевую роль в формировании резистентности играют бактериальные ферменты, например, бета-лактамазы, разрушающие бета-лактамное кольцо антибиотиков, эстеразы, гидролизующие макролиды и т. д.

В ходе эволюции в связи с давлением отбора и необходимостью развития резистентности возникло 4 известных типа лактамаз – классы A, B, C, D, большая часть которых в активном центре имеют аминокислоту серин, реагирующую своей гидроксильной группой с бета-лактамным кольцом антибиотика и при последующем гидролизе разрушающую его. Цефалоспорины обладают устойчивостью к действию лактамаз, но при их активном использовании возникли варианты этих ферментов, способные гидролизовать новые антибиотики.

Гены, кодирующие лактамазы, локализуются и в хромосомах, и в плазмидах.

Резистентность может передаваться путем трансдукции, трансформации, бактериальной конъюгации и транспозиции. При рекомбинации генов разных конъюгативных транспозонов возможно формирование новых классов генов резистентности.

Широкое применение антибиотиков в медицине и сельском хозяйстве привело к значительному эволюционированию механизмов резистентности и устойчивость к новым препаратам наступает все быстрее.

В настоящее время резистентность бактерий, являющихся этиологическим фактором инфекционных и воспалительных заболеваний, определяется к наиболее часто применяемым антибиотикам из группы синтетических пенициллинов, цефалоспоринов 1 и 2 поколения, некоторым макролдидам и фторхинолонам.

В последние годы растет число мультирезистентных штаммов микроорганизмов, которые проявляют резистентность одновременно к нескольким антибиотикам разных классов. Возникновению антибиотикорезистентности способствует неграмотное и неоправданное терапевтическое использование антибиотиков, профилактическое использование антибиотиков и использование их в качестве стимуляторов роста у животных.

Резистентные штаммы бактерий могут передаваться от животных к человеку, как при непосредственном контакте, так и через пищевую цепочку. Бактерии от животных могут передавать свои гены возбудителям болезней человека. Наиболее высокоустойчивые, высококонтагиозные и вирулентные штаммы циркулируют в больницах, где и происходит накопление генов устойчивости и формирование мульти- и панрезистентности у возбудителей инфекций, что затрудняет лечение и ухудшает прогноз. Часто встречаются штаммы, наиболее резистентные к определенным видам антимикробных препаратов. К ним относят Staphylococcus spp., Enterococcus spp., Pseudomonas aeruginosa и др. Множественноустойчивые (резистентные более чем к трем классам антибиотиков) и панрезистентные (устойчивые к большинству классов антибактериальных средств) бактерии встречаются не только в стационарах, но и вне больниц, например, в организованных коллективах.

Формированию резистентности способствует и сам человек, бесконтрольно используя антибиотики в ветеринарии и для самолечения при отсутствии признаков бактериальной инфекции. Антибиотики активно используют в пищевой промышленности при консервировании свежевыловленной рыбы, повышения стойкости мяса, в ряде отраслей бродильной промышленности, в хлебобулочной и молочной продукции для увеличения сроков реализации.

При попадании антибиотиков в пищевое сырье при лечении животных и применении в качестве стимуляторов роста происходит изменение микрофлоры, что сказывается на технологическом процессе производства продуктов, ухудшает их качество и создает опасность для развития резистентной микрофлоры. Сельскохозяйственные животные могут служить резервуаром антибиотикорезистентныцх бактерий Salmonella spp., Campylobacter spp., Escherichia coli, Staphylococcus aureus и др. [3].

В растениеводстве антибиотики используют для протравливания посадочного материала и других целей. Во всех случаях применения антибиотиков в производстве пищевых продуктов необходимо учитывать возможность их попадания в небольших количествах в организм человека. Подпороговые дозы не проявляют фармакологического действия, но могут влиять на резистентность микроорганизмов. Следует не допускать применения в пищевой промышленности антибиотиков, использующихся в лечебных целях.

Более половины антибиотиков, применяемых в сельском хозяйстве, относятся или близки к тем классам препаратов, которые используются в медицине. Остаточные антибиотики в продуктах могут вызвать аллергические, токсические реакции, дисбактериозы, возрастание резистентности, мутагенное и тератогенное действие. Пищевые продукты нередко контаминированы бактериями, в результате формируется еще один путь передачи резистентных форм от животных человеку. В экспериментах на животных показано тератогенное действие малых доз пенициллина и стрептомицина и их не следует применять в первые три месяца беременности. Кроме того, в настоящее время происходит стремительное сокращение выведения на рынок новых классов антибиотиков, наука уже не успевает за быстро эволюционирующими и легко приспосабливающимися микроорганизмами. Ведется поиск альтернативных путей борьбы с их устойчивостью.

Получение новых антибиотиков связано в основном не с их выделением из природных объектов, а с химической модификацией уже известных форм, т. е. созданием полусинтетических веществ с меньшей токсичностью и на которые микроорганизмы реагируют меньшей резистентностью. Другой подход борьбы с устойчивостью – применение одновременно с антибиотиком специфического ингибитора резистентности, например, клавулановой и оливановой кислот.

Еще одно направление – активное изучение фаголизинов – ферментов бактериофагов, разрушающих клеточную стенку бактерий, и успешно уничтожающих микроорганизмы с любой степенью резистентности [3].

Следует признать, что победить резистентность, в силу ее природных свойств как адаптивного процесса, невозможно. В наших силах научиться контролировать этот процесс. Существенными моментами контроля над резистентностью может стать мониторинг патогенов, лабораторная диагностика и корректная оценка антибиотикочувствительности, поиск ингибиторов устойчивости и новых природных антибактериальных компонентов, введение серьезных ограничений на применение антибиотиков в медицине и сельском хозяйстве.

Вызов, который бросают инфекционные заболевания, требует выполнения общих научно-исследовательских проектов при участии специалистов разных областей науки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Козлов Р.С. Резистентность к антимикробным препаратам как реальная угроза национальной безопасности // РМЖ – 2014, № 4. – С. 321–323.

2. Дебабов Д.В. Устойчивость к антибиотикам: происхождение, механизмы, подходы к преодолению // Биотехнология, 2012, № 4. – С. 7–17.

3. Данилов А.И., Жаркова Л.П. Антибиотикорезистентность: аргументы и факты // Клин. фармакол. тер., 2017, 26 (5). – С. 6–9.

УДК 573.6.086.835

НОВЫЕ КОМПОЗИЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ГЕЛЕЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ С АНТИБИОТИЧЕСКИМИ И БИОСТИМУЛИРУЮЩИМИ СВОЙСТВАМИ

Н.А. Кленова, З.П. Белоусова, Т.И. Васильева, Д.А. Евдокименко, И.С. Мажанова, В.С. Соболева, Т.В. Шарова

Самарский национальный исследовательский университет им. С.П. Королева, Самара, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Целлюлоза бактериального происхождения способна сорбировать и удерживать большое количество воды, выдерживать высокие температуры (до 150 °С, а после химической обработки до 275 °С), что позволяет высушивать ее без повреждения структуры. В то же время она обладает хорошей упругостью, пластичностью и эластичностью. Низкие адгезивные свойства к раневой поверхности и инертность для метаболизма человека позволяют успешно использовать материал в качестве органической матрицы при создании композитов путём внесения в гель-плёнки и гели эффективных антибактериальных и биостимулирующих компонентов. Нами уже были получены и исследованы свойства ряда композитов, созданных на основе гель-пленок и гелей бактериальной целлюлозы [1, 2].

Цель работы – получение и изучение свойств новых композитов с использованием в качестве основы бактериальной целлюлозы, обладающих биостимулирующими, регенерирующими и антибиотическими свойствами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы гелей и «вторичных» гель-пленок бактериальной целлюлозы (БЦ) получали путем культивирования штамма Gluconacetobacter sucrofermentans ВКПМ В-11267 как описано в предыдущих работах [1, 2]. Пектиновые пленки бактериальной целлюлозы получали добавляя в состав среды яблочный пектин в количестве 10 г./л.

В качестве биостимулирующих и антибиотических добавок использовали экстракты календулы и алоэ. Спиртовой экстракт алоэ готовили по аптечной рецептуре. Экстракт алоэ жидкий получали из биостимулированных листьев алоэ древовидного. Для биостимуляции листья алоэ хранили в темноте при температуре 4–8 °С в течение 21 сут. Затем их мыли, обсушивали, удаляли зубчики, пожелтевшие концы и измельчали.

Экстрагирование проводили 70 %-ным этиловым спиртом в соотношении 1:2. Фильтровали через сложенную в 2–3 раза марлю. Хранили в темной посуде и защищенном от света прохладном месте в течение 7 суток. Для приготовления экстракта календулы лекарственной 1 г сухих цветков заливали 10 мл 70 %-ного спирта и настаивали в течение суток. Фильтровали через 2–3 слоя марли и хранили в темной посуде при температуре 10–12°.

Антибиотические свойства композитам придавали, добавляя известные препараты демилсульфоксид, хлоргексидин и мирамистин, а также вновь синтезированное нами соединение: 2-амино-1-[α-бензотриазолил-1-метил] – хинолиний хлорид. Производные 8-гидроксихинолина обладают бактерицидными и фунгицидными свойствами, а их галогенпроизводные, например, 8-гидрокси-7-иод-5-хлорхинолин – «виоформ», являются амебоцидами. Бактерицидные свойства данных соединений связаны с присутствием хелатного комплекса с железом. Производные меди (II) обладают противоплесневой активностью. 5-нитро-8-оксихонолин (5-НОК) является общепризнанным и очень эффективным антибиотиком. В связи с этим синтез и испытание новых производных хинолина представляет значительный интерес.

Синтез 2-амино-1-[α-бензотриазолил-1-метил] хинолиний хлорида. К 1,68 г. (10 ммоль) растворенного в ацетонитриле (25 мл) 1-хлорметилбензотриазола прибавили 1,44 г. (10 ммоль) 2-аминохинолина. Смесь кипятили с обратным холодильником в течение 14 ч. Затем образовавшийся кристаллический осадок отфильтровали. К фильтрату добавили 50 мл воды, упарили раствор до половины первоначального объема и выдерживали в течение 5 ч при охлаждении. Затем отфильтровали выпавшие кристаллы, повторяли процедуру охлаждения-фильтрования 4 раза.

Выход 2,31 г. (74 %) 2-амино-1-[α-бензотриазолил-1-метил] хинолиний хлорида в виде светло-желтых кристаллов. Его водный раствор проявляет заметную флуоресценцию.

В качестве тест-объектов для изучения антибактериального действия были использованы культуры Escherichia coli M-17 и Staphylococcus epidermidis NCTC8325–4, использовали суточные инокуляты в мясо-пептонном бульоне с плотностью популяций от 0,15 до 0,44 ед. оптической плотности ($\boldsymbol{\lambda}$ = 670 нм, l = 0,5 см). Тест-объекты для исследования антифунгального действия – Penicillum sp. и Aspergillus niger. Для посевов использовали инокуляты в минеральной среде Чапека с плотностью популяций от 0,07 до 0,1 ед. оптической плотности ($\boldsymbol{\lambda}$ = 670 нм, l = 0,5 см). Об антибактериальном и антифунгальном действии судили по зонам отсутствия роста вокруг образцов после 1–3-х суточного роста на МПА и агаре Чапека при температуре 30^{O}С.

Получение композитов на основе гелей БЦ. Для получения композитов с биостимулирующими и антибиотическими свойствами в гель добавляли экстракт алоэ или экстракт календулы, водный раствор хлоргексидина биглюконата и диметилсульфоксид. Композит содержал 33 % экстракта, 16 % хлоргексидина и 3 % диметилсульфоксида (ДМСО). Полученные композиты гелей бактериальной целлюлозы с экстрактом календулы или алоэ, водным раствором хлоргексидина и ДМСО формировались в виде шаровидных образцов с помощью пинцета и стеклянных палочек. В качестве контроля использовались гели с добавлением 96 % этилового спирта в соотношении 1:1.

Получение композитов на основе «вторичных» гель-пленок БЦ. Для получения композитов «вторичных» гель-пленок в гель бактериальной целлюлозы добавляли экстракт календулы или алоэ в соотношении 1:1. Композиты распределяли тонким слоем по полиэтиленовой пленке и сушили в кристаллизаторе до постоянного веса. В качестве контроля использовались «вторичные» гель-пленки с добавлением 96 %-ого этилового спирта в соотношении 1:1. На часть «вторичных» гель-пленок наносили 0,5 %-ый раствор хлоргексидина биглюконата в количестве 10 мкл на каждый образец площадью 0,25 см^2 после помещения его на свежие посевы бактерий.

Перед использованием композиты подвергались стерилизации с помощью УФ-облучения или термообработки горячим или сухим паром.

«Вторичные» пленки бактериальной целлюлозы, пропитанные 2-амино-1-[α-бензотриазолил-1-метил] хинолиний хлоридом, получали следующим способом. С гелей бактериальной целлюлозы удаляли избыток влаги фильтровальной бумагой, помещали их в растворы 2-амино-1-[α-бензотриазолил-1-метил] хинолиний хлорида разной концентрации: 1,5; 0,75; 0,15; 0,075 % и перемешивали в шейкере-инкубаторе (EnvironmentalShaker-IncubatorES-20/60) 20 минут, режим перемешивания – 250 об/мин. Полученные смеси выкладывали в чашки Петри на полиэтиленовую пленку. Часть гель-пленок высушивали до постоянной массы при 80 °С, часть использовали во влажном состоянии.

Химическое строение гель-пленок БЦ исследовалось на инфракрасном спектрофотометре SPECTRUM 100 (PerkinElmer, США). Для записи спектров была использована приставка нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) фирмы PikeTechnologiesInc.

Пектино-целлюлозную пленку выдерживали в растворе мирамистина и образцы пленок помещали на свежие посевы бактерий либо во влажном состоянии, либо после высушивания.

Исследование аллергической реакции немедленного типа. В качестве испытуемых были выбраны 10 студентов Самарского Университета в возрасте от 20 до 25 лет, выразивших согласие на проведение исследования. Среди участников эксперимента был проведен опрос на предмет наличия аллергии на компоненты, содержащиеся в образцах. Трое из десяти не смогли дать точный ответ, у остальных аллергия на используемые вещества отсутствует. За 48 часов до исследования испытуемые не принимали противоаллергические препараты.

Композиты накладывали на внутреннюю часть предплечья. Участки кожи предварительно были очищены. По истечение 20 минут образцы снимались и фиксировались изменения кожных покровов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Использование гелей бактериальной целлюлозы показало, что гель, содержащий этиловый спирт не сдерживал рост Escherichia coli, однако обладал выраженным антибактериальным действием по отношению к Staphylococcus epidermidis. Добавление в гели экстрактов календулы или алоэ, хлоргексидина и DMSO характеризовалось антибактериальным действием против Escherichia coli, давая задержку роста около 9–11 мм (таблица 1). Но большую эффективность гели оказывали на рост Staphylococcus epidermidis. Наблюдаемый эффект был выше более, чем в 2 раза по сравнению с Escherichia coli.

Антифунгальный эффект композиты проявляли только по отношению к аспергиллу, на посевах пенициллума зоны ограничения практически не меняются по сравнению с контролем (табл. 1).

Использование «вторичных» гель-пленок в составе композитов показали сходные результаты по отношению к бактериальным тест-объектам (табл. 2).

Таблица 1 – Зоны задержки роста бактерий, мм вокруг образцов композитов на основе гелей БЦ с экстрактами календулы и алоэ, хлоргексидином и ДМСО

Тест-объекты	Зоны задержки роста, мм		
	Образцы гелей + этиловый спирт (контроль)	Композит геля + экстракт календулы + хлоргексидин + ДМСО	Композит геля + экстракт алоэ + хлоргексидин + ДМСО
Escherichia coli	нет зон	11,00 ± 0,87Δ	8,90 ± 0,23Δ
Staphylococcus epidermidis	14,3 ± 2,04*	23,80 ± 1,17×Δ	20,80 ± 0,41×Δ
Aspergillus niger	10,6 ± 0,96	18,3 ± 2,79×Δ	19,60 ± 2,34×Δ
Penicillum sp.	8,75 ± 1,00	10,86 ± 1,09	11,00 ± 1,10

*P < 0,01 по отношению к Escherichia coli и Penicillum sp. Δ P < 0,01 по отношению к контролю

Таблица 2 – Зоны задержки роста бактерий, мм вокруг образцов композитов на основе «вторичных» гель-пленок БЦ с экстрактами календулы и алоэ, хлоргексидином и ДМСО

Тест-объекты	Зоны задержки роста, мм		
	«Вторичная» гель-пленка с добавлением этилового спирта в соотношении 1:1 (контроль)	«Вторичная» гель-пленка с добавлением экстракта календулы в соотношении 1: 1 + 10 мкл хлоргексидина	"Вторичная" гель-пленка с добавлением экстракта алоэ в соотношении 1: 1 + 10 мкл хлоргексидина
Escherichia coli	нет	18,70 ± 2,13	18,20 ± 1,95
Staphylococcus epidermidis	нет	24,60 ± 1,18*	20,50 ± 1,75

*P < 0,05 по отношению к Escherichia coli

«Вторичная» гель-пленка с экстрактом календулы и хлоргексидином наиболее эффективна по отношению к грам-положительным бактериям рода Staphylococcus. Замена экстракта календулы на экстракт алоэ нивелирует этот эффект, антибиотическое действие для Escherichia coli и Staphylococcus epidermidis становиться сопоставимым.

Полученные нами пектиново-целлюлозные пленки приобрели новые свойства в отличие от обычных бактериальных целлюлозных пленок. Пектины представляют собой группу высокомолекулярных полисахаридов, входящих в состав клеточных стенок и межклеточных образований растений, он локализован в первичной клеточной стенке у всех высших растений [3]. Биологическая активность пектинов в значительной мере зависит от их молекулярной массы и степени этерификации. В зависимости от наличия свободных и этерифицированных карбоксильных групп, пектины проявляют различные свойства, например, слабую антибактериальную активность [4] и сорбционные свойства.

Мы наблюдали значительную антибактериальную активность «вторичных» пленок БЦ с 2-амино-1-[α-бензотриазолил-1-метил] – хинолиний хлоридом в концентрациях 1,5 % и 0,75 %, где площадь подавления роста Escherichia coli на третьи сутки культивирования составила 4,19 ± 0,48 см^2 и 1,83 ± 0,26 см^2 соответственно. В то время как в контрольных чашках отметили практически сплошной газонный рост на самих образцах «вторичных» пленок и вокруг них (табл. 3).

Таблица 3 – Площадь задержки роста E. Coli (3-и сутки культивирования) на плотной среде вокруг «вторичных» гель-пленок БЦ с 2-амино-1-[α-бензотриазолил-1-метил] – хинолиний хлоридом различных концентраций

Проба	Площадь зоны ограничения роста вокруг образца, см^2
Контроль: «вторичная» гель-пленка БЦ	Зарастание
«Вторичная» гель-пленка БЦ + 0,075 %-ый раствор 2-амино-1-[α-бензотриазолил-1-метил] – хинолиний хлорида	Зарастание
«Вторичная» гель-пленка БЦ + 0,15 %-ый раствор 2-амино-1-[α-бензотриазолил-1-метил] – хинолиний хлорида	0,61 ± 0,07
«Вторичная» гель-пленка БЦ + 0,75 %-ый раствор 2-амино-1-[α-бензотриазолил-1-метил] – хинолиний хлорида	1,83 ± 0,26*
«Вторичная» гель-пленка БЦ + 1,5 %-ый раствор 2-амино-1-[α-бензотриазолил-1-метил] – хинолиний хлорида	4,19 ± 0,48*

P < 0,01 по отношению к предыдущему разведению 2-амино-1-[α-бензотриазолил-1-метил] хинолиний хлорида*

Таким образом, «вторичные» пленки БЦ с 2-амино-1-[α-бензотриазолил-1-метил] хинолиний хлоридом обладают достаточно высокими антибактериальными свойствами, поэтому такие пленки могут служить эффективными покрытиями для защиты раневых поверхностей кожи и пораженных участков ногтей. «Вторичные» пленки БЦ удобны в применении: хорошо фиксируются на коже и ногтях и свободно отдают лекарственные препараты.

Пектиново-целлюлозная пленка проявляет слабовыраженные антибактериальные свойства по сравнению с пленкой из чистой бактериальной целлюлозы (табл. 4), вероятно, за счет присутствия пектина в составе композита.

Пектиново-целлюлозная пленка имеет слабый отрицательный заряд за счет наличия в пектиновой молекуле свободных карбоксильных групп [5], поэтому способна удерживать положительно заряженные молекулы. Поэтому нами был использован мирамистин, представляющий собой катионное поверхностно-активное соединение. Пектиново-целлюлозные пленки, выдержанные в мирамистине проявляли выраженное антибактериальное действие, наиболее значительное по отношению к Staphylococcus epidermidis. По отношению к Escherichia coli были более эффективны влажные пектиново-целлюлозные пленки.

Для композитов, приготовленные на основе геля бактериальной целлюлозы, растительных экстрактов, хлоргексидина и ДМСО были проведены исследования на выявление аллергической реакции немедленного типа. Композит, состоящий из геля БЦ, экстракта календулы, хлоргексидина и ДМСО, не выявил наличия аллергической реакции на компоненты ни у одного из 10-ти испытуемых. Композит, содержащий экстракт алоэ, хлоргексидин и ДМСО, вызвал у одного из 10-ти появление зуда и покраснение вокруг пробы (положительная проба).

Таблица 4 – Зоны подавления роста Staphylococcus epidermidis и Escherichia coli вокруг дисков из различных носителей

	Диаметр зоны подавления роста микроорганизмов, мм	
	E.coli (размер диска 5 мм)	S. epidermis (размер диска 10 мм)
Сухая пектиново-целлюлозная пленка	6,3 ± 0,7	12,0 ± 0,1
Сухая целлюлозная пленка	0 сплошной рост	0 сплошной рост
Сухая пектиново-целлюлозная пленка, заранее выдержанная в мирамистине	5,3 ± 0,3	16,3 ± 0,3 *
Влажная пектиново-целлюлозная пленка, заранее выдержанная в мирамистине	7,6 ± 0,8°	14,8 ± 0,3*

°P < 0,05 по отношению к высушенной пленке *P < 0,05 по отношению к Escherichia coli

Полученные новые композиционные материалы на основе гелей и пленок бактериальной целлюлозы, обладают антибиотическими и биостимулирующими свойствами за счет входящих в их состав компонентов и могут быть использованы для приготовления покрытий раневых поверхностей.

ЛИТЕРАТУРА

Ревин В.В. Кленова Н.А., Белоусова З.П. и др. Получение и изучение свойств композитов на основе бактериальной целлюлозы и поли-N, N-диметил – 3,4 – метиленпирролидиний хлорида // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология, 2017. Т.7. № 1. С. 102–110.

Кленова Н.А., Овчинникова Т.А., Маркова Ю.А. и др. Получение, свойства, использование и скорость деградации пленок и гелей бактериальной целлюлозы, продуцируемой Gluconacetobacter sucrofermentans // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова, 2018. № 1. С. 27–31.

Аверьянова Е.В., Школьникова М.Н. Пектин: методы выделения и свойства. Бийск: Изд-во Алтайского государственного технического университета им. И.И. Ползунова. 2015. 41 с.

Потиевский Э.Г., Дроздов В.Н. Антибактериальное действие пектина в эксперименте и клинике. Омск, 1997. – 96 с.

Хотимченко, Ю.С., Кропотов, А.В., Хотимченко, М.Ю. Фармакологическое свойство пектинов // Эффективная терапия, 2001. Т.7, № 4.С. 22–36.

УДК 616.33

БЫСТРЫЕ УРЕАЗНЫЕ ТЕСТЫ – НАДЕЖНЫЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИИ HELICOBACTER PYLORI

Е.Б. Аронова[1], Ю.Г. Базарнова[1], М.А. Дмитриенко[2]

[1] Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия
[2] ООО «Ассоциация Медицины и Аналитики, Санкт-Петербург, Россия

Инфекция Helicobacter pylori (HP) имеет глобальное значение и широкое распространение в мире, в том числе, в России, где по эпидемиологическим данным инфицированы более 80 % взрослого населения.

Воспаление слизистой оболочки желудка, вызванное Helicobacter pylori, составляет 90 % среди всех форм гастритов [1]. Хронический HP-ассоциированный гастрит все чаще выявляется у людей молодого трудоспособного возраста, включая их в группу высокого риска развития рака желудка кишечного типа. Поэтому разработка и совершенствование методов ранней и точной диагностики данной инфекции являются одним из приоритетных направлений современных исследований в области медицины и биотехнологии [2].

На сегодняшний день известны и широко применяются инвазивные и неинвазивные методы диагностики инфекции Helicobacter pylori.

Неинвазивные тесты на наличие хеликобактерной инфекции включают в себя определение титра антител в крови к антигенам HP, определение наличия антигенов HP в кале, а также UBT – мочевинные дыхательные тесты.

Тем не менее, одним из самых надежных методов диагностики инфекции Helicobacter pylori считается исследование биоптатов, получаемых во время эндоскопического обследования желудка и двенадцатиперстной кишки. Взятую при биопсии ткань можно подвергнуть гистологическому или культуральному исследованию, можно определить в биоптате наличие уреазы или провести полимеразно-цепную реакцию (ПЦР).

Согласно положению 3 Маастрихт V [3] в клинической практике при диагностике хеликобактерной инфекции в случае показания процедуры ФГДС и отсутствия противопоказания к взятию биоптата применимы быстрые уреазные тесты (БУТ). При положительном результате тестирования необходимо срочно приступать к лечению.

БУТ имеют преимущество прикроватной диагностики, позволяя определить текущий статус инфекции попутно с эндоскопической процедурой, однако, критикуются в связи с косвенным принципом детектирования бактерии. Это связано с тем, что тесты не выявляют саму бактерию, а определяют наличие уреазной активности в исследуемом биологическом материале.

Известно, что в желудке человека, помимо Helicobacter pylori, обитают и другие уреазопродуценты, такие как Staphylococcus aureus, Proteus mirabilis, Klebsiella pneumonia. Поэтому исследователи опасаются ложноположительной реакции на данные бактерии. Однако, проведенные исследования, описанные в [4], доказали аналитическую специфичность тест-системы ХЕЛПИЛ®, которая является БУТ, выпускаемым ООО «Ассоциация Медицины и Аналитики, Санкт-Петербург. Экспериментально полученное подтверждение специфичности быстрых уреазных тестов является очень важным моментом в подтверждении того факта, что данный способ диагностики позволяет однозначно определить наличие именно инфекции Helicobacter pylori у пациента и своевременно назначить необходимую терапию для ее лечения.

Исходя из морфологических и культуральных особенностей бактерии HP, ни один из методов диагностики хеликобактерной инфекции не является полностью достоверным и защищенным от диагностических ошибок. Для постановки точного диагноза пациенту врачу необходимо правильно сочетать различные методы диагностики данной инфекции.

Важным также является тот факт, что в настоящее время эффективность теста принято оценивать по показателям диагностической чувствительности и специфичности. Для их определения часто используют метод Латинского квадрата.

a	b
c	d

a – истинно положительные результаты; b – ложно положительные результаты; c – ложно отрицательные результаты; d – истинно отрицательные результаты.

Для определения параметров a, b, c, d проводится диагностика инфекции выбранным методом и полученные результаты сравниваются с так называемым «золотым стандартом», в качестве которого принято выбирать гистологический метод (или другой референсный метод).

Чувствительность (Se): $Se = \frac{a}{a+c}$

Специфичность (Sp): $Sp = \frac{d}{b+d}$

Результаты оценки величин a, b, c, d являются достаточно субъективными. Каковы критерии достоверности результатов оценки этих параметров?

Во-первых, существуют критерии исключения пациентов из рассмотрения, а именно:

Возраст пациента больше 65 лет.

Прием препаратов:

– Де-Нола, антибиотиков, препаратов висмута или прохождение эрадикационной терапии в течение 6 недель перед данным исследованием;

– антацидов, ингибиторов протонной помпы или H_2-блокаторов, противовоспалительных средств, антисекреторных препаратов и анальгетиков в течение 2 недель перед данным исследованием.

3. Перенесенные операции по удалению частей желудка.

Желудочно-кишечное кровотечение.

Первично выявленные онкологические заболевания верхних отделов пищеварительного тракта.

Хронические заболевания в стадии обострения, острые состояния.

Во-вторых, исключаются пациенты, у которых в случае одного из референсных методов – гистологии – выявлены кокковые формы более 80 % (в случае идентификации методом ПЦР, что это бактерия HP, пациенты с кокковыми формами менее 80 % учитываются при расчете диагностических показателей). Если кокковые формы составляют около 100 %, то такие пациенты исключаются из группы респондентов рассмотрения однозначно.

В-третьих, возникает вопрос, сколько методов сравнивать как референсные? И методы должны быть из одной группы или из разных?

Основными причинами получения на практике ложно отрицательных результатов принято считать следующие:

– нарушение методики отбора биоптата;

– неравномерная бактериальная колонизация слизистой оболочки желудка;

– преобладание кокковой формы, не имеющей характерных признаков при световой микроскопии;

– продолжительное время транспортировки биопсийного материала;

– окраска гистологического среза малочувствительным красителем;

– нарушение методики приготовления гистологического среза;

– опыт гистолога / эндоскописта.

При морфологическом исследовании биоптата выявляют непосредственно бактерии (прямой метод), в то время как при проведении уреазного теста можно судить о наличии инфекции не прямым, а косвенным методом – путем обнаружения уреазы HP, накопленной в слизистой желудка. Именно это различие может являться ключевым фактором несовпадения результатов различных методов.

Рекомендации Маастрихт V советуют использовать в качестве референсных методы из различных групп.

В целом, можно сделать вывод, что единых рекомендаций по методике определения значений a, b, c, d, а следовательно, диагностических параметров чувствительности и специфичности нет, полученные результаты являются субъективными и могут получаться различными.

На сегодняшний день быстрые уреазные тесты достаточно широко представлены на рынке медицинских изделий, причем тесты отечественного производства по своим характеристикам не уступают зарубежным аналогам.

Для получения достоверного результата БУТ и диагностики инфекции Helicobacter pylori с использованием быстрых уреазных тестов необходимо строго соблюдать рекомендации по проведению тестирования, а именно: необходим отбор 2 биоптатов из антрального отдела и 1 биоптата из тела желудка при первичной диагностике инфекции Helicobacter pylori и 2 биоптатов из тела желудка и 1 биоптата из антрального отдела желудка при контроле эффективности эрадикационной терапии, учитывая вероятность миграции бактерии из антрального отдела в тело желудка на фоне лечения.

Результаты исследований биоптатов, отобранных для анализа согласно предложенным рекомендациям, используются в клинической практике, позволяют получать высокие показатели специфичности и чувствительности тест-систем, в частности, быстрых уреазных тестов, что подтверждено рядом публикаций [2, 5].

ЛИТЕРАТУРА

1. Бунова С.С., и др.. Методы диагностики инфекции Helicobacter pylori: современное состояние вопроса // Молодой ученый – 2012. – № 12. – С. 540–543.

2. Аронова Е.Б. Быстрый уреазный ХЕЛПИЛ®-тест: от моделирования к клинической практике / Е.Б. Аронова [и др.] // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2017.– № 3. – С. 25–30.

3. Malfertheiner P. et al. Management of Helicobacter pylori infection – the Maastricht V / Florence Consensus Report. 2017; 66 (1): 6–30.

4. Милехина А.Ю., и др. Специфичность быстрых уреазных тестов // Материалы научной конференции с международным участием. ВШБТиПТ. – 2018. – С. 96–98.

5. Дмитриенко М.А. и др. Развитие быстрых уреазных тестов для диагностики инфекции Helicobacter pylori // Дневник казанской медицинской школы. – 2016. – II (IV). – С. 81–86.

УДК 619:579:614:31

ЖИЗНЕСПОСОБНЫЕ НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫЕ КЛЕТКИ МИКРООРГАНИЗМОВ И ИХ ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Л.П. Блинкова[1], А.М. Абдуллаева[2], Ю.Д. Пахомов[1], М.Л. Альтшулер[1], Т.А. Першина[2]

1. НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия
2. Московский Государственный Университет Пищевых Производств, Россия

Формирование и характеристика жизнеспособных некультивируемых клеток

В настоящее время существенно вырос интерес к жизнеспособным некультивируемым клеткам (ЖНК) – прежде всего бесспоровых бактерий со стороны не только специалистов теоретических биологических дисциплин, но и со стороны медицинских и санитарных микробиологов, генетиков, биотехнологов, экологов, эпидемиологов и др. [1–4, 6, 11, 14–16]. Следует отметить значительный вклад наших ученых в эту проблему [1, 2, 14]. По этому вопросу проводятся международные конференции.

Такие клетки обратимо теряют способность расти на традиционных средах. Они изменяют форму и размер. Палочки могут преобразовываться в шарообразную, спиралевидную, нитевидную формы, измельчаются. Может утолщаться стенка. Не очень активно экспрессируются гены и идет метаболизм. Изменяется и ряд других свойств. Исследователям пока неясно, являются ли ЖНК бесспоровых микроорганизмов заменяющим споры способом переживать неблагоприятные условия или это этап отмирания культуры. Помимо термина «жизнеспособные некультивируемые клетки», для подобных бактерий существует термин «дормантные клетки», т. е. спящие клетки, находящиеся в состоянии покоя. Некоторые ученые видят различия между ЖНК и покоящимся состоянием, считая, что в отличие от дормантных бактерий ЖНК имеют метаболическую активность [14]. Один из авторитетов в этой проблеме Oliver J.D. [15] считает это 2-мя терминами одного и того же физиологического состояния, главным признаком которого является некультивируемость.

Для многих представителей бактерий и грибов установлено НС. Среди них имеются возбудители опасных инфекций, например, такие как бруцеллы, псевдомонады, сальмонеллы, легионеллы, стафилококки, стрептококки, микобактерии, вибрионы и др. [2. 5, 7–9, 11, 13, 15, 18, 19]. Наличие ЖНК установлено у Candida albicans var. stellatoidea и Brettanomyces, с которыми связывают порчу пива [10, 12].

Известен ряд факторов, которые могут стать стрессовыми факторами, индуцирующими некультивируемое состояние (НС).

Количество стрессовых агентов, приводящих к переходу клеток в НС, продолжает увеличиваться. Это – экстремальные температуры, голодание, окислительный стресс, облучение (УФ-лучи, радиация), электрическое поле, высушивание, лиофилизация, химические вещества, среди них дезинфектанты и консерванты, пищевые красители и т. д. [1, 2, 8–10, 19], ряд биологических факторов, например, экстракты водорослей [2], где, на наш взгляд, стрессорным агентом могут быть альготоксины.

В настоящее время механизм формирования ЖНК не совсем понятен [17]. Наиболее признаваемой считается гипотеза, включающая несколько ключевых объяснений возникновения ЖНК. Экстремальные условия могут привести к потере клеточной активности и переходу в НС. При этом ЖНК имеют стратегию выживания, а не отмирания, адаптируясь к неблагоприятным факторам [15]. Формирование ЖНК является результатом генной регуляции [3, 4]. Основным геном при переходе микроорганизмов в НС оказался ген rpoS, контролирующий белок RpoS, который появляется в стационарной фазе роста популяции и способствует выживанию бактерий в экстремальных условиях [5]. Предположительно, белок RpoS улучшает адаптацию и резистентность клеток к различным стрессам, но тормозит переход адаптированных бактерий в НС. Однако мутации в гене rpoS приводят к потере или накоплению важной сигнальной регуляторной молекулы (р) ppGpp, влияющей на количество белка RpoS. Если происходит снижение уровня белка RpoS, то, соответственно, уменьшается адаптация бактерий и может осуществляться более быстрый переход в НС. При этом RpoS повышает стрессоустойчивость возникших ЖНК. Считается также, что перед формированием ЖНК нормальные клетки бактерий становятся клетками-персистерами. В этом состоянии клетки не растут, но могут быстро восстанавливать культивируемость. Персистентное состояние Ayrapetyan, один из очень результативных исследователей, относит к состоянию покоя [3, 4].

Среди источников ЖНК патогенов выявлены: вода питьевая, грунтовая, прудовая, морская; почва; пыль; кухонная утварь; лечебные средства; пищевые продукты: сырое мясо животных, птицы, рыба, морские продукты, яйца, молоко и молочные продукты, растительная пища, фрукты, салат, шпинат, соленья и т. д. [7, 10–13, 18]

Нами выявлены ЖНК в биотехнологической продукции: в промышленных препаратах пробиотиков лактобациллы (это впервые обнаружено нами); ЖНК в лиофилизованных коммерческих препаратах пробиотиков, возраст которых превысил 30 лет [1, 6].

Реверсия микроорганизмов из некультивируемого состояния.

Способность ЖНК к реверсии является важнейшим экологическим свойством. Реанимация (реверсия, восстановление) ЖНК патогенов до физиологически активного состояния, превращая их в биологически опасные микробные клетки, возникает под действием ряда факторов, которые постепенно выявляются исследователями. К таким факторам относятся физические, химические и биологические факторы: увеличение концентрации питательных веществ или витаминов в средах выращивания, т. е. использование обогащенных питательных сред; изменение температурных условий; использование химических соединений, стимулирующих рост и размножение бактерий; совместное культивирование ЖНК с клетками организма-хозяина или его метаболитами (культуры клеток, транзит через кишечник грызунов, выращивание с клетками простейших и т. д. [2, 16, 19]. Впервые о реверсии сообщили Roszak et al. [18], предложившие этот термин. Следует отметить, что восстановление ЖНК до нормального состояния происходит не всегда и не у всех культур, т. е. условия реверсии должны быть подобраны даже до конкретного штамма [13, 17, 18]. Так, удачная реанимация ЖНК гемолитического штамма E. coli с помощью аминокислот оказалась неэффективной для другой культуры E. coli O157:H7. В некоторых ситуациях по неизвестной причине ЖНК не удавалось реанимировать.

Механизмы реанимации ЖНК так же, как и переход микроорганизмов в НС, остаются нераспознанными на многих этапах этих процессов. Однако появление современных методик, в частности, в молекулярной биологии, позволяет надеяться на успешность изучения этих вопросов. Так, было показано, что белки реанимации Rpf (лизоцимоподобные, в их составе до 220 аминокислот) действуют как цитокины. Они выделяются в среду растущими микробами и связываются с поверхностными рецепторами дормантных клеток и затем вызывают реанимацию ЖНК [17].

Таким образом, факт существования ЖНК патогенов и, в частности, их присутствие в клинических образцах, в пищевых продуктах, воде и т. д. и создают угрозу здоровью человека, имеет уже достаточно много подтверждений. Однако в настоящий период достоверный ответ о механизме формирования НС и выхода из него существует, в основном, в виде гипотез и предположений. Поэтому получение новых сведений о микроорганизмах в НС и разработка быстрых, точных и достоверных методик детекции ЖНК и их реверсии к нормальному состоянию являются необходимой задачей исследователей, прежде всего, для предотвращения инфекций, в том числе, пищевого происхождения. Изучение НС имеет и другую практическую значимость, например, для определения всего потенциала жизнеспособных клеток в биологических препаратах (вакцинах, пробиотиках, музейных культурах, в клинических образцах), т. е. это важно для определения активности и срока годности препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Блинкова Л.П., Пахомов Ю.Д., Дмитриева О.В. Обнаружение некультивируемых бактерий в лиофилизированных препаратах пробиотиков. Журн. микробиол., 2013, № 3, с. 83–88.

2. Бухарин О.В., Гинцбург Л.П., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М., Медицина, 2005

3. Ayrapetyan M., Williams T.C., Oliver J.D. Bridging the gap between viable but not culturable and antibiotic persistent bacteria // Trends in Microbiology, V.23, № 1, P. 7–13.

4. Ayrapetyan M., Oliver J.D. The viable but non-culturable state and its relevance in food safety // Curr. Opin. Food Sci. 2016, V. 8, P. 127–133.

5. Bhagwat A.A. Tan J., Sharma M. at al. Functional heterogeneity of RpoS in stress tolerance of enterohemorrhagic Escherichia coli strains. // Appl. Environ. Microbiol. 2006, V. 72, P. 4978–4986.

6. Blinkova L.P., Martirosyan D., Pakhomov Yu. et al. Nonculturable forms of bacteria in lyophilized probiotic preparation // Functional Foods in Health and Disease. 2014, V. 4, № 2, P. 66–76.

7. Braden C.R. Salmonella enterica serotype Enteritidis and eggs: a national epidemic in the United States // Clin. Infect. Dis. 2006, V. 43, P. 512–517.

8. Chaisowwong W. et al. Physiological characterization of Campylobacter jejuni under cold stresses conditions: its potential for public threat // J. Vet. Med. Sci. 2012, V. 74, P. 43–50.
9. Cunningham E., O'Byrne C., Oliver J.D. Effect of week acids on Listeria monocytogenes survival: evidence for viable but nonculturable state in response to low pH // Food Control, 2009, V. 20, P. 1141–1144.
10. Divol B., Lonvaud-Funel A. Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis – affected wine. J. Appl. Microbiol. 2004, V. 99, № 1, P. 85–93.
11. Li L., Mendis N., Trigui H. et al. The importance of viable but non-culturable state in human bacterial pathogens // Front. Microbiol. 2014, V. 5, № 258 https://doi.org / 10.3389/fmicb.2014.00258.
12. Liu J. et al. Discovery and control of culturable and viable but non-culturable cells of a distinctive Lactobacillus harbinensis strain from spoiled beer // Scientific Reports. 2018, V. 8, Article number: 11446.
13. Makino S-I., Kii T., Asakura H. et al. Does Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 Enter the viable but nonculturable state in salted salmon roe // Appl. Environ. Microbiol. 2000, V. 66, P. 5536–5539.
14. Mukamolova G.V. et al. Adoption of the transiently nonculturable state – a bacterial survival strategy? // Advances in Microbial Physiology. 2003, V. 47, P. 65–129.
15. Oliver J.D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria // FEMS Microbial Rev. 2010, V. 34, № 4, P. 415–425.
16. Pakhomov Yu. D. et al. Factors for conversion of nonculturable probiotic bacteria into active state // Journal of Nature Science and Sustainable Technology. 2016, V. 10, № 1, P. 147–153.
17. Pinto D., Santos M.A., Chambel L. Thirty years of viable but nonculturable state research: unsolved molecular mechanisms // Crit. Rev. Microbiol. 2015, V.41, P. 61–76.
18. Roszak D., Grimes D., Colwell R. Viable but nonrecoverable Salmonella enteritidis in aquatic systems // Can, J. Microbiol. 1984, V. 30, P. 334–338.
19. Zhang S., Ye C., Lin H. et al. UV disinfection induces a VBNC state in Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa // Environ. Sci. Technol. 2015, V. 49, P. 1721–1728.

УДК 616–004.6

ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЕ КАК НОВЫЙ СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

В.Б. Огай, А.Е. Секенова

Национальный центр биотехнологии МОН РК, Нур-Султан, Казахстан

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) представляют собой гетерогенную фибробластоподобную популяцию клеток, которые могут быть выделены практически из всех тканей и органов человека, такие как костный мозг, жировая ткань, синовиальная оболочка, скелетная мышца, пупочный канатик, и т. д. [1, 2]. МСК привлекли внимание ученых и клиницистов из-за их мультилинейного дифференцировочного потенциала, низкой иммуногенности и активного участия в восстановлении и регенерации тканей после миграции в участки повреждения [3]. При стимулировании соответствующими сигналами, МСК способны дифференцироваться в ряд специализированных типов клеток, такие как адипоциты, хондроциты, остеобласты и менее часто в эндотелиальные клетки и кардиомиоциты [4]. Более того, недавние исследования показали, что МСК обладают сильными иммуносупрессивными и иммуномодулирующими свойствами, которые опосредуются как клеточными контактами, так и продуцированием различных сигнальных факторов. На основании этих уникальных свойств МСК были разработаны ряд клеточно-терапевтических подходов для лечения сердечно-сосудистых и аутоиммунных заболеваний. Однако, несмотря на достигнутые результаты по терапевтическим эффектам МСК существует ряд вопросов, которые еще предстоит изучить. В частности это касается разработки новых стратегий повышения эффективности применения МСК в клеточной терапии различных заболеваний. Одним из таких подходов для улучшения способности МСК выживать в неблагоприятном воспалительном микроокружении и повышения их иммуномодулирующих и регенераторных свойств является прекондиционирование клеток в условиях ex vivo в специально разработанном окружении с различными физическими, биологическими или химическими факторами [5]. Для улучшения терапевтической эффективности МСК, были предложены различные стратегии прекондиционирования. Гипоксическая стимуляция и применение цитокинов – два основных подхода, используемых для оптимизации иммуномодулирующих свойств МСК. Например, в сравнении с интактными МСК, обработка МСК

в условиях гипоксии может значительно повысить их выживаемость и иммуносупрессирующую активность в отношении как клеток врожденного, так и приобретенного иммунитета [5]. В частности было показано, что гипоксия заметно повышала иммуносупрессивные эффекты МСК человека за счет повышения продукции IL-10 и экспрессии FasL и IDO в МСК, что приводило к супрессии пролиферации CD4 + и CD8 + Т-клеток, а также мононуклеарных клеток периферической крови. Прекондиционирование МСК с помощью воспалительных цитокинов таких как IFN-γ, TNF-α, IL-1β и IL-17A также существенно повышало иммуномодулирующие свойства МСК, как в условиях in vitro, так in vivo [5]. В наших исследованиях по поиску оптимальных условий прекондиционирования МСК было показано, что по сравнению с обработкой $H_2 O_2$, $CoCl_2$ и IFN-γ, 3D сфероиды МСК и TNF-α более существенно оказывали иммуномодулирующие эффекты на дендритные клетки и Т-лимфоциты. Более того, было обнаружено, что комбинированное применение 3D сфероидов МСК и TNF-α приводит синергетическому эффекту, значительно повышая иммуносупрессивные свойства МСК. Это объясняется тем, что 3D клеточная организация обеспечивает повышение клеточных взаимодействий и мимикрирует физиологическое естественное микроокружение ткани. Было доказано, что культивирование МСК в виде 3D сфероидов усиливает их противовоспалительные и ангиогенные свойства, повышает их мультипотентные свойства и выживаемость клеток после трансплантации. Кроме этого было обнаружено, что кондиционная среда от 3D сфероидной культуры МСК человека более эффективно ингибировала продукцию воспалительных цитокинов TNF-α, IL-6, IL-12p40, IL-23 и CXCL2 и повышала уровень противовоспалительных цитокинов IL-1ra и IL-10 в ЛПС стимулированных макрофагах, чем кондиционная среда, полученная от монослойной культуры МСК [6]. В другом исследовании было продемонстрировано, что иммуносупрессивные эффекты 3D сфероидов МСК человека могут быть значительно усилены за счет комбинированной обработки цитокинами IFN-γ и TNF-α. В частности было выявлено, что 3D сфероиды МСК человека прекондиционированные IFN-γ и TNF-α более сильнее подавляют продукцию TNF-α макрофагами, чем необработанные 3D сфероиды [7]. Эти перечисленные литературные данные, хорошо согласуются с нашими полученными результатами по обработке 3D сфероидов МСК компактной кости мышей рекомбинантным TNF-α, где был обнаружен наибольший иммуномодулирующий эффект, по сравнению с другими комбинациями прекондиционирования.

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод о том, что оптимальными условиями для эффективного повышения иммуномодулирующих свойств МСК является совместное применение 3D сфероидной культуры МСК и TNF-α. Считаем, что получение прекондиционированных 3D сфероидов представляет собой уникальные возможности в улучшении терапевтического потенциала МСК и их применения в клеточной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

Short B., Brouard N., Occhiodoro-Scott T., Ramakrishnan A., Simmons P.J. Mesenchymal stem cells // Arch Med Res. – 2003. – № 34 – P. 565–571.

Hass R. et al. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC // Cell Commun Signal. 2011. № 9. P. 12.

Wang Y., Chen X., Cao W., Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications // Nat Immunol. – 2014. – № 15 (11) – P. 1009–1016.

Kokabu S., Lowery J.W., Jimi E. Cell fate and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells // Stem Cells Int. – 2016. – № 2016 – P. 3753581.

Saparov A., Ogay V., Nurgozhin T., Jumabay M., Chen W.C. Preconditioning of human mesenchymal stem cells to enhance their regulation of the immune response // Stem Cells Int. – 2016. – № 2016 – P. 3924858.

Ylostalo J.H., Bartosh T.J., Coble K., Prockop D.J. Human mesenchymal stem/stromal cells cultured as spheroids are selfactivated to produce prostaglandin E2 that directs stimulated macrophages into an anti-inflammatory phenotype // Stem Cells. – 2012. – Vol. 30, № 10 – P. 2283–2296.

Zimmermann J.A., Mcdevitt T.C. Pre-conditioning mesenchymal stromal cell spheroids for immunomodulatory paracrine factor secretion // Cytotherapy. – 2014. – Vol. 16, № 3 – P. 331–345.

УДК 581.192:577.112.389.853:616–006

ЛЕКТИНЫ РАСТЕНИЙ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ РЕЦЕПТОРОВ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

О.Л. Канделинская[1], Е.Р. Грищенко[1], М.В. Шолух[2], Е.В. Бондарюк[2], Т.В. Шман[3], Е.П. Вашкевич[3], Т.И. Ермилова[3]

[1] Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. КупревичаНАН Беларуси, Минск, Беларусь
[2] Белорусский государственный университет, биологический факультет, Минск, Беларусь
[3] РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Беларусь

Одним из важнейших аспектов интегральной регуляции метаболизма, механизмов клеточной адгезии и агрегации, межклеточных взаимодействий, контроля иммунного ответа на уровне целого организма являются белок-углеводные взаимодействия, основанные на процессах узнавания углеводных структур гликолигандов определенными белками. К настоящему времени накоплен значительный экспериментальный материал, свидетельствующий о том, что в основе многих патологических состояний, в том числе, при онкотрансформации, имеют место нарушения процесса гликозилирования и изменение компонентного состава и структуры углеводной составляющей гликоконъюгатов. Так, связанный с некоторыми онкологическими заболеваниями Tn антиген (N-ацетилгалактозаминил-α-1-O-серин/треонин) обусловлен снижением уровня ацетилированиясиаловой кислоты. Среди ряда других нарушений, таких как укорочение олигосахаридных цепей, изменения процесса сульфатированиямуциновых олигосахаридов, стимуляция экспрессии антигена Le^x и др., отмечены также модификации ферментов гликозилтрансфераз. Так, понижение уровня экспрессии GlcNAc-трансферазы, которая участвует в создании олигосахаридной структуры кора, наблюдается в клеточных линиях аденокарциномы, обладающей высоким потенциалом малигнизации. Нарушения гликозилирования имеют место и при мета- и дисплазиях.

Углеводы в составе гликоконъюгатов характеризуются высоким уровнем разнообразия пространственной структуры, благодаря чемув них заложен неисчерпаемый потенциал кодирования биологической информации, в отличие от полипептидов и олигонуклеотидов, в которых информация кодируется последовательностью и количеством составляющих их аминокислот и нуклеотидов. Углеводам в составе гликоконъюгатов отводится значительная роль в процессах межклеточного взаимодействия, миграции, адгезии и агрегации клеток. Любые изменения, затрагивающие структуру углеводов в составе гликоконъюгатов, приводят к модификации взаимодействий клеток друг с другом, что, соответственно, сказывается на адгезивных свойствах клеток, их рецепторных характеристиках [1, 2].

Для своевременной диагностики злокачественных новообразований важно как можно более раннее выявление изменений характера гликозилирования в клетках, поскольку углеводные структуры, экспрессированные на поверхности клеток и являющиеся составной частью клеточных рецепторов, принимают участие в реализации молекулярного узнавания и сигналинга. В этой связи исследования по разработке диагностических систем, призванных выявлять структуру опухолевых антигенов, оказываются весьма перспективными. И здесь, в качестве эффективных молекулярных зондов для исследования экспрессии гликолигандов на поверхности клеток при онконтрансформации, возможно использовать гликопротеины семейства фитолектинов с известной углеводной специфичностью. Лектины – это гликопротеины неиммунного происхождения, способные избирательно и обратимо связываться с углеводами и участвовать в реализации многообразных белок-углеводных взаимодействий. Установлено, что с участием гликопротеинов семейства лектинов осуществляется адгезия, иммунный ответ, межклеточные контакты и взаимное межклеточное узнавание [2, 3].

В результате проведенного нами скрининга более 40 видов культурных и дикорастущих растений семейств Бобовые, Злаковые, Пасленовые, Крапивные и др. по активности лектинов было выявлено 20 перспективных представителей. Для данной работы с помощью методов аффинной хроматографиибыли получены высокоочищенные субстанции двухфитолектинов (PhytoLI и PhytoLII), специфичных к производным N-ацетил-D-глюкозамина. В тест-системаxinvitro, содержащих линии лейкозных клеток Nalm-6 и K-562, установлено, что LD_{50} для PhytoLIсоставляла, соответственно 19,7 мкг/мл и 27,1 мкг/мл. ФитолектинPhytoLIIизбирательно взаимодействовал с опухолевыми клетками рака легких линии A 549 (LD_{50} 0,28 мкг/мл).

Предположительно, состав рецепторных комплексов на поверхности различных опухолевых клеток значительно варьирует по уровню экспрессииантигенов, которые содержат в углеводы, связываемые соответствующим лектином, что в значительной мере определяетэффективность взаимодействия в системе «лектин-опухолевая клетка». Так, ранее нами было показано, что маннозоспецифичныйлектин из аира [4] избирательно связывался с клетками рака молочной железы человека различных молекулярных подтипов, что может быть обусловлено повышеннымуровнем экспрессии производных маннозы в составе рецепторов. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости дальнейших исследований прогностической и диагностической ценности выделенных фитолектинов и возможных перспективах их использования для идентификации опухолевых антигенов и дифференциальной диагностики некоторых видов опухолей.

ЛИТЕРАТУРА

Glycosylation and Cancer. Ed. by Richard R. Drake, Lauren E. Ball // Advances in Cancer Research. 2015. V.126. 393 p.

Кудряшова Е.В., Гладилин А.К., Левашов А.В. Белки в надмолекулярных ансамблях: исследование структуры методом разрешенно-временной флуоресцентнрой анизотропии // Успехи биологической химии. – 2002. Т.42. – С. 257–294.

Луцик М.Д., и др.. Львов: Вища школа: Изд-во при Львов. ун-те, 1981. 155 с.

Канделинская О.Л. и др. Этот необыкновенный аир обыкновенный // Наука и инновации. 2018. № 12. С. 81–84.

УДК 615.322

ВЛИЯНИЕ МОНО- И ОЛИГОСАХАРИДОВ VALERIANA OFFICINALIS L. НА МИКРОФЛОРУ КИШЕЧНИКА

А.И. Сидоров[1], Л.Е. Смирнова[2], Е.В. Ожимкова[1], В.М. Червинец[2], В.П. Молчанов[1]

[1] Тверской государственный технический университет, Тверь, Россия
[2] Тверской государственный медицинский университет, Тверь, Россия

Пищевые углеводы, в основном амилоза и амилопектин, составляют основу ежесуточного пищевого рациона (400–500 г./сут) человека, перевариваются в верхних отделах тонкого кишечника и служат главным источником глюкозы. Другая часть, более разнообразная по составу и структуре, представлена неперевариваемыми углеводами, которые ферментируются и усваиваются полезными анаэробными бактериями толстого кишечника и, таким образом, являются пребиотиками – физиологически функциональными пищевыми ингредиентами, обеспечивающими при систематическом употреблении в пищу человеком в составе пищевых продуктов благоприятное воздействие на организм человека в результате избирательной стимуляции роста и / или повышения биологической активности нормальной микрофлоры кишечника, т. е. оказывают регулирующее воздействие на кишечную микрофлору. Пребиотики функционально отличаются от пробиотиков – пищевых ингредиентов в виде полезных для человека живых микроорганизмов [1]. В рационе современного человека доля пребиотических углеводов существенно уменьшилась и это связано прежде всего с тем, что подобные соединения рассматриваются как балластные компоненты лекарственного и пищевого растительного сырья, наличие и содержание которых ненормируется, а их главный источник – отходы переработки зерновых культур и дикорастущих растений, практически полностью игнорируются, что приводит, как теперь установлено, к развитию микробиологического дисбаланса (дисбиоза) у большинства потребителей пищевой продукции развитых стран и, как следствие, широкому распространению иммунодефицитных состояний и других заболеваний [2–4].

Цель работы – изучение клинических особенностей пациентов старших возрастных групп при язвенной болезни (ЯБ) с артериальной гипертензией (АГ) и оцнка эффективности применения у них растительных гликанов – низкомолекулярных углеводов Valeriana officinalis L.

Обследовано 420 больных ЯБ в сочетании с АГ (мужчин – 217, женщин – 203; возраст – 56 ± 1,2 года). Клиническое обследование пациентов включало опрос и осмотр по традиционной схеме с детализацией жалоб гастроэнтерологического и кардиологического характера. Пациентам проводилось комплексное обследование (лабораторное, эндоскопическое, гистологическое, микробиологическое, и др.). Для оценки эффективности применения у больных углеводов корней Valeriana officinalis L. обследовано 58 больных ЯБ с АГ в динамике лечения.

Пациенты были разделены на 2 группы: 1-ю составляли 31 человек (мужчин – 18, женщин – 13; возраст – 53 ± 2,5), получавших базисную терапию (антихеликобактериную, антисекреторную, гипотензивную), 2-ю – 27 человек (мужчин – 16, женщин – 11; возраст – 56 ± 1,3), которым, помимо базисной терапии, назначался per os водный экстракт низкомолекулярных углеводов корней Valeriana officinalis L. в течение одного месяца (комбинированная терапия). Данные группы были сопоставимы по основным релевантным признакам.

Анализ низкомолекулярной углеводной водорастворимой фракции корней Valeriana officinalis L. проводился методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Была использована хроматографичекая система «Dionex, Ultimate 3000 USA», снабженная рефрактометром. В качестве неподвижной фазы был использован полимерный носитель Reprogel-H, являющийся слабым катионообменником. Колонка характеризовалась наличием 164000 теоретических тарелок, а коэффициенты асимметрии пиков не превышали 1,005. В качестве подвижной фазы использовался раствор серной кислоты (10^{-9} моль/л).

Распределение больных по полу и возрасту показало, что в подгруппе до 50 лет мужчин (108) было больше, чем женщин (63), что выразилось соотношением 1,7:1. После 50 лет наоборот увеличилось число женщин (140) по сравнению с мужчинами (109) и соотношение мужчин и женщин составило 1:1,3, а в возрастной категории 60 лет и старше – 1:1,5. По-видимому, такие соотношения с преобладанием женщин в более старших возрастных группах связаны с возрастным увеличением распространённости как ЯБ, так и АГ среди женщин.

Сравнительный анализ клинико-функциональных, эндоскопических и других исследований у пациентов двух возрастных групп (до 50 лет; 50 лет и старше) позволил выделить ряд отличий. Оказалось, что для больных ЯБ с АГ старшей возрастной группы характерны: локализация язв в желудке или в сочетании с двенадцатиперстной кишкой у большей части больных; преобладание крупных язв (средние и большие); среднетяжёлое и тяжёлое течение ЯБ; осложнения ЯБ (кровотечение, анемия); сопутствующие эрозивные поражения слизистой оболочки гастродуоденальной зоны; атипичные клинические проявления ЯБ в целом и атипичный болевой синдром; преобладание высокого уровня артериального давления (2-я и 3-я степень АГ); отягощённость факторами риска, поражения органов-мишений и ассоциированных заболеваний сердца и сосудов, формирующих 3-ю (высокую) и 4-ю (очень высокую) степень РРССО.

Эффективность применения у больных водорастворимой фракции корней Valerianna officinalis L. оценивалась по нескольким параметрам. Прежде всего исследовалась динамика болевого и диспепсического синдромов у больных в процессе лечения.

При базисной терапии положительная динамика болевого и диспепсического синдромов составила 78 %, а при комбинированной (базисная в сочетании с экстрактом олигосахаридной фракции валерианы) – 100 %. При этом, полное исчезновения болей и диспепсии в группе с базисной терапией отмечалось только в 6 (20 %) случаях, а в группе с комбинированной терапией этот результат был достигнут уже у 15 (56 %) обследованных.

Под влиянием базисного лечения у 52 % пациентов произошли отрицательные сдвиги в состоянии кишечного микробиоценоза (увеличение доли пациентов со 2 и 3 степенью дисбактериоза). Напротив, под влиянием комбинированного лечения достигнуто улучшение показателей микробиоценоза кишечника у 37 % пациентов (увеличение доли «0» и 1 степени дисбактериоза) при отсутствии ухудшения со стороны кишечной микрофлоры у других больных. Под влиянием комбинированного лечения больные чаще отмечали улучшение общего самочувствия, настроения и сна.

Современные интенсивные пищевые технологии не адаптированы к получению и сохранению в конечном продукте пребиотических углеводов, которые содержатся в достаточно высоком количестве в исходном пищевом сырье (до 27 %) и, образуют существенную часть отходов (жмых масличных культур и отруби до 40 %), и, соответственно, могут быть успешно изолированы как из исходного сырья, так и из отходов пищевых, фармацевтических и биотехнологических производств и использоваться для создания функциональных продуктов питания. Так, использование низкомолекулярных углеводов Valeriana officinalis L. повышает эффективность лечения больных ЯБ с АГ, хорошо переносится пациентами, что позволяет рекомендовать их для использования в лечебном процессе.

В связи с этим, актуальным является разработка эффективных методов и способов выделения подобных соединений из доступного и дешевого сырья и создания на их основе гликансодержащих составов и рецептур функциональных продуктов питания для регулирования пищеварительной системы человека.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18–08–00460).

ЛИТЕРАТУРА

1. ГОСТ Р 52349–2005. Продукты пищевые функциональные. Термины и определения.
2. J. Warrand. Healthy Polysaccharides. The Next Chapter in Food Products. Food Technol. Biotechnol., 44 (3), 355–370, (2006).
3. S. Sarkar. Potential of prebiotics as functional foods – a review. Nutrition & Food Science. Vol. 37, Is.3, 168 – 177 (2007).
4.A. Lovegrove, et al. (2017) Role of polysaccharides in food, digestion, and health, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57:2, 237–253.

УДК 577.125.8

ВЛИЯНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ НА ПРОЦЕССЫ ОБУЧЕНИЯ И ПАМЯТИ

Н.А. Ломтева, Е.И. Кондратенко, С.К. Касимова

Астраханский государственный университет, Астрахань, Россия

Профилактика нарушений высших интегративных функций мозга, процессов обучения и памяти представляет актуальную проблему медицинской науки и практического здравоохранения. С каждым годом происходит рост психических и неврологических расстройств, возникающих в результате постоянного роста влияния стрессовых факторов и социально-экономической напряженности [5].

В связи с этим одной из задач является разработка и внедрение новых профилактических и лечебно-восстановительных технологий при начальных формах нарушений высших функций мозга. В медикаментозном лечении нарушений когнитивных функций основное значение получили ноотропы. Однако, несмотря на разнообразие средств с ноотропным типом действия наблюдаются их недостаточная эффективность, токсическое воздействие и побочные реакции [2]. В этом плане интерес представляют растительные экстракты с ноотропной активностью, таких растений как шалфей лекарственный и гинкго двулопастной.

Изучение ноотропной активности проводили на 80 белых беспородных крысах самцах, которые были разделены на 4 группы: 1 группа – контрольные животные; 2 группа – животные получали водный экстракт шалфея лекарственного; 3 группа – животные получали экстракт гинкго двулопастного; 4 группа – животные получали препарат сравнения – раствор дивазы. Животные экспериментальных групп (2–4) в течение 21 дня получали ежедневно вместо воды, в качестве полноценного питья, препараты ноотропного действия в виде водных растворов.

Для оценки влияния ноотропных веществ на процессы обучения и памяти в норме и при патологии используется широкий набор моделей. Наиболее часто применяют метод условной реакции пассивного избегания. Основным преимуществом этого метода является быстрота выработки рефлекса (обучение с одной пробы) и возможность дифференцированно воздействовать на различные фазы памяти. Оценку проводили на стандартной установке условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) [4]. Установка состоит из темной камеры с электродным полом, соединенной закрывающимся отверстием с ярко освещенной платформой.

Крысу помещали на середину площадки светлого отсека, хвостом к темному отсеку и в течение 180 с регистрировали латентный период первого захода в темный отсек. В момент, когда животное входило в темную камеру, отверстие закрывали и наносили через пол электроболевое раздражение (50 Гц, 40 В), состоящее из пяти импульсов длительностью 1 сек, следующих с интервалом 0,5 сек. После этого крысу извлекали из камеры. Закрепление полученного рефлекса проверяли через 24 ч после его выработки, помещая животное на платформу установки таким же образом, как при обучении в первый день. В течение 180 с регистрировали время до первого захода в камеру (время латентного периода первого захода). Если крыса не заходила в нее, это время считали равным 180 с.

Все полученные данные в ходе эксперимента были подвергнуты статистической обработке с использованием критерия Стьюдента.

Протокол экспериментов в разделах выбора, содержания животных, моделирования патологических процессов и выведения их из опыта был составлен в соответствии с принципами биоэтики, правилами лабораторной практики (GLP); он соответствовал этическим нормам, изложенным в Женевской конвенции (1981), “Международных рекомендациях по проведению медикобиологических исследований с использованием животных” (1985) и в соответствии с приказом МЗ РФ № 267 от 19.06.2003.

При проверке выработки УРПИ установлено, что введение животным растворов Гинко-Билоба и дивазы значительно увеличивали латентный период захода крыс в темный отсек камеры через 2 часа после выработки рефлекса по сравнению с контрольными животными и крысами, получавшими водный экстракт шалфея (табл. 1).

Результаты проверки сохранности рефлекса показали, что введение белым крысам растворов Гинко-Билоба и дивазы вызывает более прочную тенденцию сохранности памятного следа, по сравнению с показателями у животных, получавших водный экстракт шалфея и у контрольных. Так, через 24 часа после обучения латентный период захода в темный отсек возрастал в 3,4 раза (табл. 1), у групп крыс, получавших водный экстракт шалфея в 2,9 раза, раствор Гинко-Билоба – в 11 раз, раствор дивазы – в 10,2 раза, что отражает степень закрепления условного рефлекса пассивного избегания. Установлено, что в контрольной группе крыс при воспроизведении УРПИ через 24 часа после обучения 55 % животных помнили об ударе током и не заходили в темный «опасный отсек», крысы, получавшие водный экстракт шалфея, 40 % животных, тогда как самцы крыс под действием растворов дивазы и Гинко-Билоба лучше хранили памятный след, 30 и 5 % животных соответственно не заходили в темный отсек (табл. 1).

Таблица 1 Влияние ноотропных веществ на формирование условного рефлекса пассивного избегания

Экспериментальные группы	Контроль	Шалфей	Гинко-Билоба	Дивaза
Латентный период 1-го захода в темный отсек, с				
До обучения	34,0 ± 6,94	38,0 ± 12,23	15,6 ± 4,45	13,0 ± 1,54
Через 2 часа после обучения	146,9 ± 13,38 #	141,0 ± 15,70 #	167,4 ± 9,47 #	165,0 ± 9,80 #
Через 24 часа после обучения	116,4 ± 14,82 #	111,2 ± 19,34 #	171,6 ± 8,45 #*	132,4 ± 15,77 #
Попытки зайти в темную камеру после выработки условного рефлекса, %				
Через два часа	25	30	10	10
Через 24 часа	55	40	5	30

Условные обозначения: # – статистически значимые отличия внутри группы до и после обучения, $p < 0.05$;
* – статистически значимые отличия от контрольного значения, $p < 0.05$ (по Стьюденту с поправкой Бонферрони)

Таким образом, при изучении влияния растительных экстрактов на процессы памяти по формированию УРПИ мы получили результаты, которые показывают наличие улучшающего данные процессы эффекта только у растворов Гинко-Билоба и дивазы, тогда как влияние водного экстракта шалфея практически не отличалось от значений у контрольных животных. То есть введение животным экстракта Гинко-Билоба стимулирует когнитивные функций у крыс, что выражается в улучшении выработки условного рефлекса и сохранности памятного следа после обучения в тесте УРПИ.

Данное влияние исследуемых веществ на функциональное состояние ЦНС обусловлено представленным в них комплексом биологически активных веществ. Так, в листьях шалфея содержатся эфирное масло, дубильные вещества, алкалоиды, флавоноиды, урсоловая и олеановая кислоты, витамин Р, никотиновая кислота. В плодах содержится 19–25 % жирного масла, в основном это глицериды линолевой кислоты [3]. Вегетативные части Гинкго Билоба содержат флавоновые гликозиды (кемпферол, кварцетин, гинголид), терпены (гинкголиды, билобалиды), органические и гинкголевые кислоты, аминокислоты, воска, стероиды, эфирные масла, алкалоиды, витамины, микро – и макроэлементы (селен, марганец, титан, медь, фосфор, кальций, калий, магний, железо) [1].

ЛИТЕРАТУРА

1. Арушанян Э.Б. Ноотропные свойства препаратов Гинго Билобо // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2008. – Т. 71, № 4. – С. 37–63.
2. Воронина Т.А. и др. Ноотропные и анксиолитические свойства разных доз пирацетама // Экспер. и клин. фармакол. –2000. Т. 63, № 2. С. 9–11.
3. Зилфикаров И.Н. Дитерпены и полифенолы шалфея лекарственного: перспективы медицинского применения (обзор литературы) // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 11. Медицина. 2007. – № 3. – С. 149–158.
4. Фирстова Ю.Ю. и др. Влияние скополамина и ноотропного препарата фенотропила на рецепторы нейромедиаторов мозга крыс в тесте условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) // Нейрохимия. 2011. Т. 28. № 2. – С. 130–141.
5. Santana L.A. Review of studies concerning treatment adherence of patients with anxiety disorders / L.A. Santana, L.F. Fontenelle // Patient Prefer Adherence. – 2011. – № 5. – P. 427–439.

УДК 328

БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ НЕРИБОСОМАЛЬНЫХ ПЕПТИДНЫХ АНТИБИОТИКОВ ГРИБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Е.А. Рогожин[1,2,3], В.С. Садыкова[4], И.А. Гаврюшина[4], Р.А. Габрия[4], А.Е. Куварина[4], А.С. Барашкова[1], М.Л. Георгиева[2,4]

[1] Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
[2] Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе
[3] Тюменский государственный университет, Тюмень, Россия
[4] Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Нерибосомальные пептиды являются вторичными метаболитами, образуются в стадии идиофазы, когда прекращается активный рост гриба, или при создании специфических условий культивирования – добавлении предшественников. Интерес к ним резко возрос в последнее время в связи с перспективами использования для разработки лекарственных препаратов нового поколения (Abid et al., 2014; Bills et al., 2008). Они рассматриваются в качестве молекул-кандидатов, с помощью которых можно преодолеть устойчивость к антибиотикам у патогенных микроорганизмов. Антимикробные пептиды грибов имеют небольшой молекулярный вес, что удобно для модификации или последующего синтеза антибиотика, большую специфичность и активность, в сравнении с выделенными из других организмов. По данным различных баз биологически активных соединений ежегодно регистрируется не менее 500 соединений нерибосомальных пептидов, выделенных из грибных продуцентов. При этом поиск продуцентов целесообразно проводить среди недавно описанных видов, а также представителей уже известных таксонов, выделенных из ранее неисследованных природных экониш (Newman et al., 2016; Zang et al, 2018).

Цель исследования – отбор экстремофильных микроскопических грибов – продуцентов нерибосомальных пептидов и разработка условий управляемого биосинтеза по признаку антибиотикообразования, включая способ культивирования и оптимизацию состава питательной среды, для наиболее перспективного штамма.

В период 2011–2018 гг. был проведен масштабный скрининг 918 штаммов микромицетов из разных экстремальных экотопов и систематических групп. В результате комплексных химико-биологических исследований выделено 30 штаммов – продуцентов нерибосомальных пептидов, 15 из которых относятся к роду Trichoderma, 4 к роду Sodiomyces, 5 к роду Emericellopsis, 3 – к роду Acremonium, 3 – Tolypocladium.

В результате комплексных химико-биологических исследований выделено 30 штаммов – продуцентов нерибосомальных пептидов, 15 из которых относятся к роду Trichoderma, 4 к роду Sodiomyces, 5 к роду Emericellopsis, 3 – к роду Acremonium, 3 – Tolypocladium. Из психрофильного штамма T. citrinoviride ВКПМ F-1228 выделен и охарактеризован комплекс пептаиболов, обладающий фунгицидной активностью. Из 5 пептаиболов, один – описанный ранее трихорзин, остальные не определяются по базам природных соединений (Садыкова и др., 2016). Из психрофильного галотолерантного штамма Tolypocladium inflatum выделены антибиотики циклоспорины A, B, C.

Согласно нашим исследованиям, поиск продуцентов новых антимикробных пептидов целесообразно проводить среди представителей новых или недавно описанных видов грибов, метаболизм которых мало изучен, таких как Emericellopsis alkalina, Sodiomyces alkalinus. Среди представителей этих видов отобраны штаммы с высокой антибиотической активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также дрожжевых и мицелиальных грибов, в том числе возбудителей инвазивных микозов. Отобраны штаммы E. alkalina, сочетающие выраженное противогрибковое действие и высокий выход пептаиболов, из числа которых штамм ВКПМ F-1428 оказался одним из наиболее перспективных (Баранова и др., 2017). В качестве основного метаболита, отвечающего за антибиотические свойства, был выделен и охарактеризован ранее не описанный липопептаибол – эмерициллипсин А с выраженными противогрибковыми свойствами. (Rogozhin et al, 2018). Показана способность эмерициллипсина А подавлять рост патогенных грибов – возбудителей тяжелых и хронических микозов (Баранова и др., 2019).

В дальнейшем проводили разработку способов культивирования штамма, подбор условий роста и оптимизацию состава ферментационных сред для выхода эмерициллипсина А. Разработана композиция состава жидкой питательной щелочной среды для стационарного культивирования, обеспечивающая выход пептида до 20 м г/л на 10-е сутки процесса. Для установления оптимальных условий роста штамма была изучена зависимость его развития от ряда факторов, влияющих на рост грибов. Было исследовано влияние температуры, аэрации, состав питательных сред и количественного соотношения ингредиентов (хлорида натрия и редуцирующих сахаров) на накопление антибиотика в культуральной жидкости. Изучение уровня pH среды при культивировании штамма показало, что искусственное увеличение до 11–11,5 от исходного уровня pH 10 в щелочной среде не приводит к увеличению количества антибиотика. Сравнение влияния температур 25 и 28 °C на накопление антибиотика в стационарной культуре показало, что изменение температуры в указанных пределах не приводит к существенным различиям в выходе вещества. Показано, что в условиях анаэробного культивирования стационарно биосинтез антибиотика значительно снижается.

С целью подбора оптимальных условий для синтеза эмерициллипсина А культивирование штамма проводили в колбах на жидкой щелочной среде тремя различными способами: глубинным (при перемешивании на шейкере), поверхностным (стационарно, с образованием пленки мицелия на поверхности питательной среды) и комбинированным. Длительность культивирования составляла 14 суток, при 25°C. При комбинированном способе культивирования антибиотики синтезировались в следовых количествах. Оптимальным способом культивирования, обеспечивающим стабильный антибиотика в среде, был поверхностный.

Таким образом, подобраны условия управляемого биосинтеза и состав питательной среды по признаку антибиотикообразования эмерициллипсина А, позволяющие обеспечить максимум накопления пептида в среде.

Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 18–74–10073).

ЛИТЕРАТУРА

Abid A., Bacha N., Ahmad B., Lutfullah G., Farooq U., Cox R. (2014) Fungi as chemical industries and genetic engineering for the production of biologically active secondary metabolites / Asian Pac J Trop Biomed; 4(11): 859–870

Bills GF, Platas G, Fillola A, Jiménez MR, Collado J, Vicente F, et al. (2008) Enhancement of antibiotic and secondary metabolite detection from filamentous fungi by growth on nutritional arrays. J Appl Microbiol; 104(6): 1644–1658.

Садыкова В.С., Кураков А.В., Куварина А.Е. Рогожин Е.А. (2015а) Антимикробная активность штаммов грибов рода Trichoderma из Средней Сибири / Прикладная биохимия и микробиология, Т. 51 № 3. – С. 1–9.

Newman, D.J.; Cragg, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. (2016) J. Nat. Prod., 79 (3), 629–661.

Zhang, X.; Li, S. – J.; Li, J. – J.; Liang, Z. – Z.; Zhao, C. – Q. (2018) Novel Natural Products from Extremophilic Fungi. Mar. Drugs, 16 (6), 194.

Rogozhin, E. et al. (2018) Novel Lipopeptaibol Emericellipsin A with Antimicrobial and Antitumor Activity Produced by the Extremophilic Fungus Emericellopsis Alkalina. Molecules, 23 (11), 2785.

А.А. Баранова и др. Антимикробный потенциал алкалофильных микромицетов Emericellopsis alkalina. Прикладная биохимия и микробиология, 2017, Т. 53, № 6, с. 616–624.

А.А. Баранова и др. Антимикробные пептиды алкалофильных грибов Emericellopsis alkalina: биосинтез и биологическая активность в отношении патогенных грибов с множественной резистентностью. Прикладная биохимия и микробиология, **2019**, Т. 55, № 2, с. 151–157.

УДК 328

ЭКДИСТЕРОН: ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ЭФФЕКТ

О.Ю. Шувалов, А.В. Петухов, О.А. Федорова, А.А. Дакс, Н.А. Барлев

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Экдистероны (зооэкдистероиды) являются стероидными гормонами членистоногих, контролирующими процессы их линьки и метаморфоза. Эти вещества, а также различные их модификации (фитоэкдистероиды) так же продуцируется примерно 6-ю процентами видов всех высших растений в качестве защиты от поедания их насекомыми (Lafont et al. 2002).

Самым распространённым зооэкдистероидом является 20-гидроксиэкдизон. Интересно, что хотя экдистероиды не обладают какой-либо гормональной активностью у млекопитающих и, в частности, у человека, тем не менее, они обладают ярко выраженными фармакологическими свойствами (Baiguz et al. 2015).

Для ряда экдистероидов, включая 20-гидроксиэкдизон, неоднократно показана анаболическая активность при отсутствии андрогенной (Stopka et al., 1999, Todorov et al., 2000, Lafont et al. 2003). Экдистероиды интенсифицируют процессы биосинтеза белка и рост мышечной массы у животных и человека (Gorelick-Feldman et al. 2008, Wilborn et al. 2006, Parr et al. 2014).

При этом они обладают гипогликемическими (Syrov et al., 1997, Takahashi and Nishimoto, 1992, Yang et al., 2001), иммунномодуляторными (Gizatullina et al., 1994) и нейропротекторными (Aikake et al., 1996, Xu et al., 1999) свойствами, снижают синтез холестерина (Lupien et al., 1969) и перекисное окисление липидов (Osynskaya et al., 1992; Kuzmenko et al., 2001), способствуют увеличению работоспособности (Dinan et al. 2006, Lafont et al. 2009) и репродуктивной функции.

Интересно отметить, что, несмотря на ярко выраженные анаболические свойства, в литературе имеется немногочисленные данные о негативном влиянии экдистероидов на рост и развитие опухолевых клеток и показана их сенсибилизирующая активность по отношению к цитостатикам (Konovalova et al. 2002, Martins et al. 2015).

В данной работе мы использовали клеточные модели аденокарциномы легкого (H1299, H522) и карциномы молочной железы человека (BT474, MDA-MB-231) для оценки потенциальной противоопухолевой активности экдистерона. С использованием мтт-теста мы показали, что экдистерон повышал восприимчивость изучаемых опухолевых моделей к генотоксическим химиотерапевтическим препаратам – доксорубицину и цисплатину. При этом тест на Аннексин V показал, что при сочетанной обработке экдистероном и генотоксическими препаратами значительно повышалась доля апоптотических клеток. Мы так же показали, что экдистерон индуцирует аутофагию в изучаемых моделях.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о потенциальной противоопухолевой активности экдистерона. Необходимы дополнительные исследования по выяснению молекулярных механизмов воздействия экдистерона на неопластические клетки различного генезиса, а так же исследования с привлечением животных моделей.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ # 18–315–20013

УДК 544.72

КАПСУЛЫ НА ОСНОВЕ ЭМУЛЬСИЙ ПИКЕРИНГА И ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ СЛОЕВ

Т.В. Букреева, К.В. Паламарчук

НИЦ «Курчатовский институт, Москва, Россия

Преимуществом капсул перед другими носителями активных веществ является их высокая функциональная емкость. Инкапсулирование позволяет стабилизировать разделение компонентов системы и защитить вещества от негативного воздействия внешних факторов.

Перспективным объектом для целого ряда применений, включая биомедицину, пищевые технологии, сельское хозяйство, являются эмульсии, стабилизированные коллоидными частицами (эмульсии Пикеринга) и капсулы на их основе – коллоидосомы. Самоорганизация наночастиц на границе масляной и водной фаз происходит при промежуточной смачиваемости их поверхности обеими фазами. Для достижения этого условия поверхность частиц модифицируют либо за счет физической адсорбции поверхностно-активных веществ, либо химически.

Дополнительные возможности дает покрытие капель эмульсии Пикеринга полиэлектролитными слоями посредством электростатической адсорбции из водных растворов – возможна регулировка механических свойств оболочки и процесса высвобождения инкапсулированных соединений.

В настоящей работе проведено формирование и исследование микрокапсул на основе наночастиц диоксида кремния. Устойчивые эмульсии получены путем стабилизации капель додекана смесью наночастиц природного кремнезема и катионного ПАВ цетилтриметиламмония бромида (CTAB), после чего на поверхность капель дисперсной фазы эмульсии наносили полиэлектролитные слои хитозана и альгината натрия [1]. Размер капсул уменьшается при увеличении концентрации CTAB в диапазоне 10^{-4}-10^{-3} М. Механическую устойчивость капсул оценивали по изменениям в результате центрифугирования коллоидной системы при 27000 g или высушивания при 60 °C. Наблюдалось повышение механической устойчивости капсул при увеличении числа нанесенных полиэлектролитных слоев и при желировании слоя альгината с помощью раствора хлорида кальция. В качестве оптимальных условий создания капсул рекомендовано использовать 10^{-3} М раствор CTAB для стабилизации эмульсии Пикеринга на основе наночастиц природного кремнезема и последующее нанесение оболочки состава хитозан / альгинат кальция / хитозан. При этом получаются механически устойчивые капсулы со средним диаметром 6 мкм.

Разработанный подход был успешно применен для инкапсулирования витамина Е [2]. Получены капсулы со средним размером 4 мкм, содержащие 30 %-ный масляный раствор ацетата альфа-токоферола. Также были созданы оболочки на термочувствительных ядрах из масла ши (температура плавления ≈ 37 °C) [3]. Стабильность полученных капсул делает их перспективными носителями для хранения и доставки жирорастворимых биологически активных веществ в составе медицинских и косметических препаратов.

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18–53–34007.

ЛИТЕРАТУРА

1. К.В. Паламарчук, В.В. Артемов, Т.В. Букреева. Российские нанотехнологии. 2018. Т. 13. № 3–4. С. 92–97.

2. К.В. Паламарчук, Т.Н. Бородина, Т.В. Букреева. Известия УНЦ РАН. 2018. Т. 3 № 3. С. 85–89.

3. К.В. Паламарчук, Т.В. Букреева, Т.Е. Григорьев. Актуальные вопросы биомедицинской инженерии: сб. материалов VIII Всерос. молодеж. науч. конф. Саратов, 26–28 ноября 2018 г. Саратов: Сарат. гос. техн. ун-т, 2018. С. 228–232.

Актуальная биотехнология
№3 (30), 2019
УДК 328

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СОКА ЛИМОНА НА ВЫДЕЛЕНИЕ АКТИНОМИЦЕТОВ РЕДКИХ РОДОВ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ АНТИБИОТИКОВ

О.Н. Синёва, Л.П. Терехова

НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва, Россия

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в связи с возрастающей устойчивостью патогенных микроорганизмов к существующим антимикробным препаратам актуальной проблемой остается поиск и разработка новых антибиотиков. Большинство известных антимикробных препаратов разработано на основе природных метаболитов, синтезируемых микроорганизмами: бактериями и грибами. Актиномицеты являются продуцентами разнообразных по химическому строению биологически активных соединений, обладающих антибактериальным, противогрибковым и противоопухолевым действием. Большинство антибиотиков выделено из актиномицетов широко распространенного рода Streptomyces. Методом метагеномного анализа показано, что в почве находится огромное количество актиномицетов редких родов (Micromonospora, Actinoplanes, Saccharopolyspora, Streptoverticillium, Nocardia, Streptosporangium, Actinomadura и др.), которые могут быть потенциальными продуцентами новых антибактериальных, противоопухолевых или противогрибковых препаратов.

Цель работы – выделить актиномицеты редких родов из почвенного образца при добавлении сока лимона и установить антибиотическую активность выделенных актиномицетов в отношении тест-микроорганизмов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение актиномицетов проводили из образца дерново-подзолистой почвы Московской области. Аликвоты почвенной суспензии помещали в пробирки со свежеотжатым соком лимона (Citrus limon) в концентрациях 30 и 50 %, настаивали в течение 30 минут и высевали на органический агар 2 Гаузе.

Антибиотические свойства выделенных культур актиномицетов определяли методом перпендикулярных штрихов на агаровой среде 2 Гаузе в отношении тест-организмов: Staphylococcus aureus ИНА 00985 (FDA 209P), S.aureus ИНА 00761 (MRSA), S.aureus ИНА 00762, Micrococcus luteus ATCC 9341, Bacillus subtilis ATCC 6633, Escherichia coli ATCC 25922, Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, Saccharomyces cerevisiae ИНА 01042.

Изучение выживаемости актиномицетов рода Micromonospora проводили в условиях глубинного культивирования в жидкой среде 2 Гаузе с добавлением сока лимона в концентрациях 30 % и 50 %, в контрольные образцы сок лимона не добавлялся. Время культивирования составляло 7 дней, пробы отбирались через следующие промежутки времени: 1 час, 24 часа, 3 суток, 5 суток, 7 суток. Оценку выживаемости культур осуществляли путем подсчета выросших колоний на агаровой среде 2 Гаузе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что добавление сока лимона в концентрации 30 % приводит к увеличению количества выросших колоний актиномицетов на 5 %, в концентрации 50 % – к снижению количества колоний актиномицетов на 25 % по сравнению с контролем. Нами было отмечено, что добавление сока лимона приводит к уменьшению количества быстрорастущих грибных колоний и колоний немицелиальных бактерий на чашках, что позволяет выделить большее количество медленнорастущих колоний актиномицетов редких родов.

Оценка биоразнообразия выделенных культур показала, что при добавлении 30 % сока лимона наблюдается небольшое снижение количества быстрорастущих актиномицетов рода Streptomyces, при этом количество культур актиномицетов редких родов возрастает на 8 %. При добавлении 50 % сока лимона в суспензию, количество культур редких родов увеличивается на 15 % по сравнению с контролем.

Увеличение концентрации сока лимона в суспензии позволило существенно увеличить количество выросших культур актиномицетов рода Micromonospora: в контроле была выделена одна культура, отнесенная к роду Micromonospora, в варианте с добавлением 30 % сока лимона – 3 культуры, при добавлении 50 % сока лимона – 8 культур рода Micromonospora. Полученные результаты дали основание полагать, что выделенные актиномицеты рода Micromonospora устойчивы к действию лимонной кислоты (pH = 2–2,5).

Дальнейшие исследования показали, что культуры рода Micromonospora способны сохранять высокую жизнеспособность и антибиотическую активность при длительном воздействии (в течение 7) дней сока лимона. По устойчивости к низким pH культуры актиномицетов рода Micromonospora были разделены на 4 группы: 8 штаммов обладали высокой жизнеспособностью при культивировании в жидкой среде, содержащей 30 % и 50 % сока лимона, у 2-х штаммов жизнеспособность была снижена по сравнению с контролем на 2 порядка и 2 штамма полностью утратили жизнеспособность к 7-му дню культивирования с соком лимона.

Всего было выделено в чистую культуру 82 штамма актиномицетов. Показано, что 23 штамма актиномицетов активны в отношении Гр + тест – организмов, 1 штамм в отношении Гр – тест-организмов, 2 штамма в отношении Saccharomyces cerevisiae. У остальных культур актиномицетов антибиотической активности, проверенной методом перпендикулярных штрихов, обнаружено не было.

При культивирование выделенных актиномицетов рода Micromonospora в жидких средах была определена антибиотическая активность в отношении тест-микроорганизмов (табл. 1).

Таблиа 1. Активность актиномицетов рода Micromonospora при глубинном культивировании.

№ штамма	Тест-организмы					
	E.coli	S.cerevisiae	St.aureus	B.subtilis	M.luteus	P.aeruginosa
11-л	+	+	+	-	+	+
57-л	-	-	-	-	-	-
58-л	+	-	+	-	-	-
60-л	-	-	-	-	-	-
65-л	-	-	-	-	-	-
71-л	-	-	+	-	-	-
77-л	+	+	+	+	+	+
81-л	-	+	+	+	+	+
84-л	+	+	+	+	-	+
93-л	+	+	+	+	+	+
94-л	+	+	+	+	+	+
99-л	+	+	+	+	+	+

ВЫВОДЫ

В нашей работе было показано, что добавление сока лимона приводит к увеличению доли выросших культур актиномицетов редких родов. Для выделения культур редких родов актиномицетов – потенциальных продуцентов новых биологически активных соединений, целесообразно применять более высокую концентрацию сока лимона.

Выделенные культуры актиномицетов обладали антибиотической активностью в отношении тест-организмов, как в отношении Гр + микроорганизмов, так и в отношении Гр – микроорганизмов и дрожжей. Таким образом, выделенные актиномицеты можно рассматривать в качестве потенциальных продуцентов антибиотиков.

УДК 66.047

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭНДОЛИЗОСОМАЛЬНОЙ ДЕГРАДАЦИИ РЕКОМБИНАНТНОГО АЛЛЕРГЕНА ЧЕЧЕВИЦЫ LEN C3

Е.И. Финкина[1], И.В. Богданов[1], Н.Н. Строкач[2], Т.В. Овчинникова[1,2]

[1] Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

[2] Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Аллергия является заболеванием, которым по разным оценкам подвержено 25–30 % населения в развитых странах. Эффективным способом лечения аллергии, направленным на блокирование развития реакции гиперчувствительности, является аллерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ), которая приобретает все большую популярность и значение в последнее время. Для создания современных аллерговакцин на основе рекомбинантных аллергенов и их гипоаллергенных аналогов важным является понимание механизмов развития В- и Т-клеточного иммунного ответа.

Процессинг аллергенной молекулы в лизосомах антиген-презентирующих клеткок (АПК), последующее взаимодействие образовавшихся антигенных пептидов с белками главного комплекса гистосовместимости и их презентация В- и Т-клеткам играют фундаментальное значение в развитии иммунного ответа. К АПК относятся моноциты, дендритные клетки, В-лимфоциты, макрофаги и др., и протеолитическая деградация аллергенов идет в них с разной скоростью. В данной работе мы исследовали эндолизосомальную деградацию аллергена чечевицы Len c 3, используя макрофаги человека. Данный аллерген относится к классу липид-транспортирующих белков (LTP), представители которого являются одними из самых распространенных и клинически значимых растительных пищевых и пыльцевых аллергенов.

Макрофаги человека получали культивированием в CO2-инкубаторе линии моноцитов человека THP-1 во флаконах в полной среде RPMI 1640 (среда RPMI 1640, 10 % FCS, 0,05 мМ BME, 2 мМ HEPES, 100 МЕ/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 25 мкг/мл амфотерицина В), с последующей индукцией дифференцировки моноцитов в макрофаги 100 нг/мл форбол-12-миристат-13-ацетата (PMA) в течение 3 дней. Макрофаги собирали, разрушали в буфере, содержащем 250 мМ сахарозу, используя стеклянный гомогенизатор Поттера. Микросомальную фракцию получали, центрифугируя постъядерный супернатант 60 мин при 100000g. Для высвобождения лизосомальных ферментов проводили несколько циклов замораживания / оттаивания полученной фракции. Суммарную концентрацию белков в лизосомальной фракции определяли по методу Бредфорд.

Известно, что в лизосомах макрофагов содержится набор протеолитических ферментов, основную массу которых составляют цистеиновые протеазы катепсины; многие из них расщепляют пептидные связи после остатка аргинина. Поэтому ферментативную активность полученной лизосомальной фракции макрофагов человека проверяли, используя хромогенные субстраты Z-AFR-pNA, Z-ALLR-pNa или L-BAPNA в соотношениях смесь ферментов: субстрат 1:20 и 1:100 (w/w). Было показано, что субстрат z-ALLR-pNA обладает большей чувствительностью к смеси лизосомальных ферментов, чем субстрат z-AFR-pNa. Полученная смесь лизосомальных ферментов была практически не активна в отношении субстрата L-BAPNA.

Рекомбинантный аллерген чечевицы Len c 3 получали путем гетерологичной экспрессии в клетках Escherichia coli. Эндолизосомальную деградацию аллергена проводили в 50 мМ буфере Tris/HCl, pH 4,8, содержащем 1 мМ DTT. Содержимое лизосом макрофагов человека брали в соотношении аллерген: смесь ферментов 3:1 (w/w). Реакционную смесь инкубировали длительно, отбирая аликвоты каждые 24 часа. Отсутствие контаминации проверяли по отрицательному контролю, который не содержал лизосомальную фракцию. Для сравнения проводили реакцию в тех же условиях с аллергеном персика Pru p 3, который является мажорным сенсибилизатором класса LTP. Результаты реакции оценивали с помощью SDS-электрофореза. Было показано, что Len c 3 очень устойчив к действию лизосомальных ферментов, даже через 96 часов расщепление белка не происходило. Наоборот, расщепление Pru p 3 персика происходило с большой скоростью, и уже через 48 часов аллерген был полностью деградирован. Возможно, это связано с тем, что в структуре Pru p 3 персика присутствует большее количество аргининов. Такая значительная разница в скорости деградации может свидетельствовать о разной иммуногенности и аллергенности двух этих аллергенов.

УДК 579.61

ПОЛУЧЕНИЕ ПРОТИВОГРИБКОВОГО ПОЛИЕНОВОГО АНТИБИОТИКА РОЗЕОФУНГИНА В ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ

А.К. Саданов, А.С. Балгимбаева, Л.Н. Ибрагимова, Л.П. Треножникова, Г.Е. Тугелбай, З.Ж. Турлыбаева, А.Ж. Султанова, Р.Ш. Галимбаева, М. Есиркепулы, В.Э. Березин, И.Р. Кулмагамбетов

ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

Грибковые инфекции эпидермиса широко распространены в мире и, по оценкам экспертов, поражают от 10 % до 20 % населения [1].

Лечение дерматомикозов проводится пероральными или местными противогрибковыми лекарственными средствами, в зависимости от степени и тяжести, места заражения и возбудителя [2]. Противогрибковые препараты на основе полиенов, азолов и аллиламинов считаются терапией первой линии для поверхностных дерматомикозов вследствие их высокой эффективности и низкой частоты системных побочных эффектов.

За последние десятилетия резко возросла не только заболеваемость поверхностными грибковыми инфекциями, но и резистентность грибов к противогрибковым средствам, применяемым в медицине [2]. Распространение дерматомикозов, появление необычных возбудителей и рост устойчивости грибов привели к необходимости создания новых противогрибковых средств.

Сотрудниками Научно-производственного центра микробиологии и вирусологии (г. Алматы, Казахстан) разработан и зарегистрирован новый оригинальный противогрибковый лекарственный препарат «Розеофунгин-АС», мазь 2 % для местного применения с широким спектром действия [3]. Лекарственной субстанцией препарата является новый представитель класса полиенов – карбонил-коньюгированный пентаеновый антибиотик розеофунгин, в концентрация 0,5–12,5 мкг/мл подавляющий рост возбудителей поверхностных и глубоких микозов – трихофитии, микроспории, фавуса, кандидозов, криптококкоза, споротрихоза, хромомикоза, аспергиллеза и других возбудителей микозов человека [4].

Нами разработан метод получения противогрибкового полиенового антибиотика розеофунгина в производственных условиях. Синтез антибиотика розеофунгина происходит в биомассе продуцента. Выращенную биомассу отделяли от культуральной питательной среды с помощью центрифугирования, после чего производили извлечение активного вещества из биомассы. Для извлечения антибиотика из биомассы продуцента применяли метод экстракции органическим растворителем. Биомассу экстрагировали дважды, первый раз в соотношении 1:3, далее в соотношении 1:2. Экстракцию проводили при температуре 2–8^{o} С в течение 3 часов, и полученные экстракты упаривали на ротационном испарителе при температуре 35–40° С. Получали густую массу от желтого до темно-желтого цвета. Активное вещество очищали из препарата-сырца путем переосаждения в растворителе. Полученный осадок высушивали под вакуумом и измельчали до аморфного порошка.

ЛИТЕРАТУРА

1 Havlickova B., Czaika V.A., Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide // Mycoses. 2008; 51 (Suppl. 4) : 2–15.

2 Kaufman G. Antibiotics, mode of action and mechanisms of resistance // Nurs Stand 2011; 25:49–55.

3 Пат. РК № 31491. Лекарственное средство с противогрибковой и антивирусной активностью в виде мази и способ его получения / А.К. Саданов, В.Э. Березин, А.С. Балгимбаева, Л.П. Треножникова.; опубл. 15.09.2016, Бюл. № 11.

4 Sadanov A.K., Trenozhnikova L.P., Balgimbayeva A.S., Baimakhanova B.B. Physicochemical and biological properties of the antifungal polyene antibiotic roseofungin // Abstracts of the 6-th Congress of European Microbiologists. – Maastricht (The Netherlands), 2015. – P.2172.

УДК 577.112.083

ПОЛУЧЕНИЕ АНАЛОГОВ КОСТНОГО МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОГО БЕЛКА-2 ЧЕЛОВЕКА С КОЛЛАГЕН-СВЯЗЫВАЮЩИМИ ДОМЕНАМИ

Д.Д. Лыкошин, М.Н. Терешин, Р.С. Есипов

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия.

Одним из ключевых компонентов современных костнопластических материалов, обеспечивающих высокую регенеративность, являются костные морфогенетические белки (КМБ), обладающие выраженными остеоиндуктивными свойствами. Среди всего многообразия КМБ ведущую роль в остеогенезе играют несколько факторов, в том числе костный морфогенетический белок – 2 (BMP-2). Показано, что он способствует росту и регенерации костной и хрящевой ткани, а также дифференцированию мезенхимальных клеток в остеобласты и миобласты. Именно поэтому активно предпринимаются попытки создать на основе BMP-2 остеоиндуктивные материалы нового поколения. Одним из таких перспективных подходов по созданию новых материалов является создание костных трансплантантов на основе остеоиндуктивных материалов, несущих на поверхности иммобилизованные специфические факторы роста и обеспечивающих более длительный эффект. В лаборатории биотехнологии ИБХ РАН ранее был получен штамм-продуцент рекомбинантного костного морфогенетического белка – 2 и разработан протокол его выделения и очистки. На культуре мезенхимальных стволовых клеток было подтверждено, что полученный rhBMP-2 полностью идентичен по своим свойствам фармакопейным стандартам. Для получения ростового фактора, иммобилизованного на деминерализованном костном матриксе (ДКМ), была разработана генно-инженерная конструкция и получен штамм-продуцент гибридного белка, в котором молекула BMP-2 на N-конце соединена с фрагментом CollBD адгезина из Staphylococcus aureus (SAu), ответственным за связывание с коллагеном. Созданный штамм-продуцент, обеспечивал высокий уровень продукции гибридного белка CollBD-BMP-2. Для данного штамм-продуцента была разработана эффективная схема выделения и очистки рекомбинантного белка, в результате которой получался биологически активный димер CollBD-BMP-2. На данном этапе проводятся эксперименты по биологической активности гибридного белка другими молекулами на культуре клеток, и на животных для сравнительной оценки восстановления костной ткани.

УДК 328

LATE MORBIDITIES OF ANTI-CANCER THERAPY: DOES DNA MATTER?

Alexander Maslov

Albert Einstein College of Medicine, New York, USA

Compared to age-matched controls, cancer survivors exhibit reduced physiological reserve and higher rate of frailty, a phenotype predictive of chronic disease and disability. They are also affected with conditions associated with aging such as heart disease and pulmonary dysfunction, as well as secondary malignancies. These effects are generally attributed to the highly intensive and toxic therapy provided. It is conceivable that these devastating late sequelae of anti-cancer therapy are mediated through its genotoxic potential and ability to induce mutagenic response in normal, non-tumorous, cells and tissues. As virtually all conventional anti-cancer drugs are clastogens capable of inducing genome structural variants (GSVs) in affected cells, we hypothesize that the main molecular mechanism of chemotherapy-associated late effects is accumulation of sub-clonal GSVs in normal non-tumor cells, arguably comprising the main damaging burden of chemotherapy-induced mutational load. Using our new, NGS-based method for direct GSV detection in normal tissues we demonstrated that conventional anti-neoplastic drugs are capable of inducing somatic GSVs in both actively proliferating and quiescent cells. We also demonstrated that chemotherapeutic agents applied in doses with similar cytotoxicity have different mutagenic capacity and, hence, can be ranked based on their potential abilities to cause long term complications. Our results clearly indicate that non-cycling differentiated cells can serve as a reservoir of iatrogenically induced somatic mutations. These findings provide an immediate approach for studying the molecular mechanisms of late morbidities in cancer survivors exposed to chemotherapy.

УДК 615.281.9

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ПРОТИВОМИКРОБНЫХ АГЕНТОВ МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКИ HIRUDO MEDICINALIS

Е.Н. Графская, К.Д. Надеждин, Е.Р. Павлова, П.В. Башкиров, В.Н. Лазарев

ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Москва, Россия
МФТИ (ГУ), Долгопрудный, Россия

Широкое распространение антибиотикорезистентных патогенов привело к потребности в разработке новых эффективных терапевтических агентов, механизм действия которых принципиально отличается от используемых на практике противоинфекционных соединений. Среди всего множества молекулярных факторов, используемых для борьбы с резистентными микроорганизмами, можно выделить универсальные и эволюционно древние компоненты системы врожденного иммунитета организмов – антимикробные пептиды (АМП). АМП способны ингибировать рост различных патогенов и по сравнению с традиционными антибиотиками обладают рядом преимуществ.

В качестве обьекта исследования нами была выбрана медицинская пиявка H. medicinalis. Известно, что кровососущие пиявки хранят проглатываемую кровь в течение длительного периода времени практически интактной. Иммунная система пиявок развивалась для защиты крови, попадающей во время кормления внутрь пиявки, от экзогенных патогенных микроорганизмов и для контроля микрофлоры желудочно-кишечного тракта. Ранее, нами были идентифицированы антимикробные пептиды медицинской пиявки H. medicinalis с помощью биоинформатического анализа черновой сборки генома и протеомных данных секрета слюнных желез медицинской пиявки H. medicinalis [1]. Были охарактеризованы антибактериальная активность в отношении грамположительных Bacillus subtilis (168HT), грамотрицательных Escherichia coli (K12 substr MG1655) и Chlamydia trachomatis D/UW3/Cx бактерий, гемолитическая, цитотоксическая активности обнаруженных антимикробных пептидов [2].

Цель данного исследования заключалась в анализе механизма действия активных АМП медицинской пиявки. Методом ЯМР-спектроскопии высокого разрешения было показано, что пептиды 3967, 536_2 и 12530 проявляют α-спиральную структуру, что характерно длля большинства известных АМП, прояляющих литический механизм действия. С использованием сканирующей электронной микроскопии было исследовано воздействие пептидов 536_1 и 3967 на целостность клеточных мембран бактерий и было продемонстрировано, что пептиды вызывают дезинтеграцию бактериальных клеточных стенок. Эксперименты по измерению интенсивности флуоресценции метки, высвобождаемой из везикул разного липидного состава, показали, что пептиды проявляют большую активность в отношении везикул, мимикрирующих бактериальные клеточные стенки (POPS), чем мембраны эукариот (POPC).

Полученные данные позволяют предложить, что активные АМП медицинской пиявки обладают литическим механизмом действия. Поиск и изучение АМП, выполняющих функции защитных факторов животных, позволяет лучше понять закономерности функционирования системы врожденного иммунитета и открывает путь к разработке новых лекарственных агентов.

ЛИТЕРАТУРА

Babenko V. V et al. Far beyond common leeching: insights into an ancient medical device through integrated omics data // bioRxiv. 2018. P. 357681

Grafskaia E.N. et al. Medicinal leech antimicrobial peptides lacking toxicity represent a promising alternative strategy to combat antibiotic-resistant pathogens // Eur. J. Med. Chem. Elsevier Masson SAS, 2019. Vol. 180. P. 143–153.

Секция 3. Экология, биоэнергетика и биогеотехнология

УДК 579.695; 546.85; 502.55; 661.63

ФАКТОРЫ БИОДЕГРАДАЦИИ БЕЛОГО ФОСФОРА

А.З. Миндубаев[1], Э.В. Бабынин[2], А.Д. Волошина[1], С.Т. Минзанова[1], Л.Г. Миронова[1], Е.К. Бадеева[1]

[1] Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия
[2] Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Основанная на поразительных совершенстве и гибкости метаболических путей [1] микробов, биодеградация является одним из наиболее значимых и часто применяемых на практике методов обезвреживания промышленных стоков [2]. На рисунке 1, продемонстрирована показательная схема усвоения сразу нескольких токсичных веществ в едином метаболическом пути, демонстрирующий совершенство биохимии микроорганизмов, изображенная на основе литературных источников [3–7]. Включение сразу двух токсичных ксенобиотиков (формальдегид и синильная кислота) в состав сахаров и аминокислот, является, пожалуй, наиболее показательным примером биодеградации. Это является весомым фундаментальным аргументом в пользу возможности биодеградации даже такого опасного ксенобиотика, как белый фосфор.

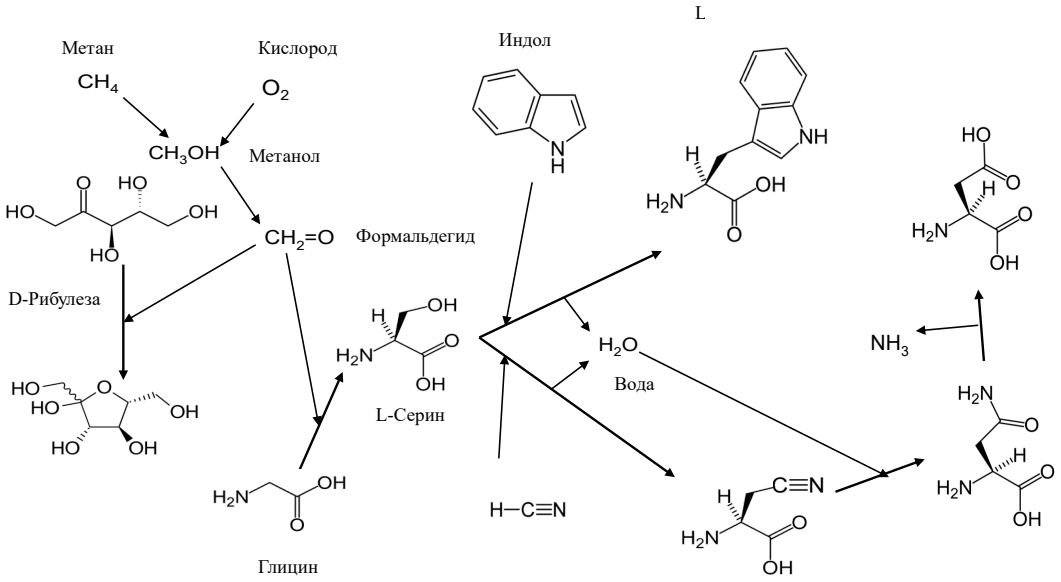


Рис. 1. Включение формальдегида, цианида и индола в состав сахаров и аминокислот – убедительный пример биодеградации. Синтез метанола из метана (который сам является продуктом микробного метаболиизма [8]) осуществляется метанотрофными бактериями, серина и фруктозы из метанола – некоторыми метилотрофными бактериями и дрожжами, триптофана из индола – бактериями, растениями и грибами, β-циано-L-аланина из синильной кислоты и серина – бактериями Chromobacterium violaceum, аспарагина из цианоаланина – рядом растений. Рисунок А.З. Миндубаева.

Наши более ранние работы [9, 10] посвящены микробиологическому превращению токсичнейшего элементного (белого) фосфора в биогенный фосфат. Фактически, выполненная нашим коллективом работа является первым задокументированным примером усвоения искусственного ксенобиотика белого фосфора биосферой, то есть возможности применения метода еще далеко не исчерпаны. В данной работе представлено дальнейшее развитие исследований биодеградации белого фосфора.

Пересев культуры A. niger AM1 произведен по стандартной схеме, в трех повторах. Через 49 суток во всех повторах колонии были покрыты черной россыпью спор. Это доказывает, что и в среде с белым фосфором аспергилл может сохранять нормальную фертильность. Обращает на себя внимание тот факт, что в одном повторе колония стала развиваться быстрее, чем в других, хотя условия были совершенно идентичны. Возможно, это следствие мутации, обеспечившей лучшую приспособленность к необычным (и экстремальным) условиям существования.

Для сравнения устойчивости к белому фосфору нескольких культур черного аспергилла, применялся наш штамм Aspergillus niger AM1, а также три штамма из Всероссийской коллекции микроорганизмов при ИБФМ им. Г.К. Скрябина: FW-650, FW-2664 и FW-2731, выделенные из арктических вечномерзлых грунтов. Культуры высевались в планшеты Corning, скорость роста оценивалась микропланшетным ридером Infinite F200 Pro, Tecan (Австрия) по интенсивности поглощения света λ 550 нм. Максимальная концентрация белого фосфора достигала 1 %. Для сравнения высевались культуры бактерий *Achromobacter xylosoxidans, Pseudomonas aeruginosa*, Bacillus firmus и Salmonella typhimurium. Целью данных исследований являлось обнаружение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) белого фосфора для перечисленных микроорганизмов.

SOS-тест на генотоксичность был выполнен, как описано в работе [11]. Делали серию разведений среды, содержащей вначале 0.2 % белого фосфора (2000 мкг/мл). Сначала смешивали пополам с культурой сальмонелл, при этом концентрация падала до 1000 мкг/мл. С этой концентрации начинали измерение общей токсичности и генотоксичности. В конце серии разведений доводили концентрацию P_4 до 1 мкг/мл (0.0001 %). Ночную культуру штамма, выращенную в питательном бульоне с ампициллином (100,0 мкг/мл), вносили в планшеты по 0,1 мл в лунку и добавляли в каждую раствор среды с P_4 в различных концентрациях. В качестве позитивного контроля использовали митомицин С. Определяли интенсивность биолюминесценции с помощью микропланшетного ридера Infinite F200 Pro, Tecan (Австрия). Для каждой концентрации в каждой точке времени брали три пробы. Интенсивность биолюминесценции измеряли в относительных световых единицах (ОСЕ) рассчитанных как число световых единиц в секунду, деленное на оптическую плотность клеточной культуры (OD) при 550 нм.

Для установления природы устойчивости аспергилла к P_4 произведен посев в среду с фосфатом в качестве источника фосфора. Подросшую культуру снова пересеяли в среду с 0.2 % белого фосфора. В качестве контроля посеяли также A. niger AM1, до этого росший в среде с белым фосфором.

Мы впервые применили стерилизацию белого фосфора ацетоном. В шленк с навеской белого фосфора (0.95 г.) влили 20 мл ацетона и выдержали 15 мин при перемешивании (ручное взбалтывание) без нагрева. Слив ацетон, влили в шленк 50 мл дистиллированной воды, стерилизованной автоклавированием. Затем приготовили 2 % эмульсию белого фосфора в этой воде.

С целью оценки цитогенетического действия фосфора использовали тест-систему Allium сера. На каждом препарате учитывали общее количество клеток, количество делящихся клеток, находящихся в той или иной стадии митоза. На основании полученных данных определили митотический индекс (MI), распределение клеток по стадиям митоза. Митотический индекс показывает отношение числа клеток, находящихся в митозе, к общему числу проанализированных клеток, исследованных на препарате изучаемой ткани [12].

Очень интересно спонтанное появление в среде с белым фосфором культуры A. niger AM1 с измененной морфологией и окраской, быстрее растущей в среде с исследуемым ксенобиотиком. Возможно, это результат мутации и дальнейший этап адаптации микроорганизма к среде, содержащей белый фосфор.

На 53 день между лидирующей в росте культурой и остальными накопилось еще больше различий. Через 55 суток после посева лидирующая культура стала вырабатывать пигмент и приобретать более насыщенную желтую окраску [13]. Колонии в остальных двух повторах растут медленнее и имеют гораздо более светлую окраску (рис. 2). Окрасилась не только колония, но и культуральная среда, т. е. пигмент хорошо растворим в воде. Примерно в это время мы дали этому аспергиллу неофициальное название «рыжий гриб».

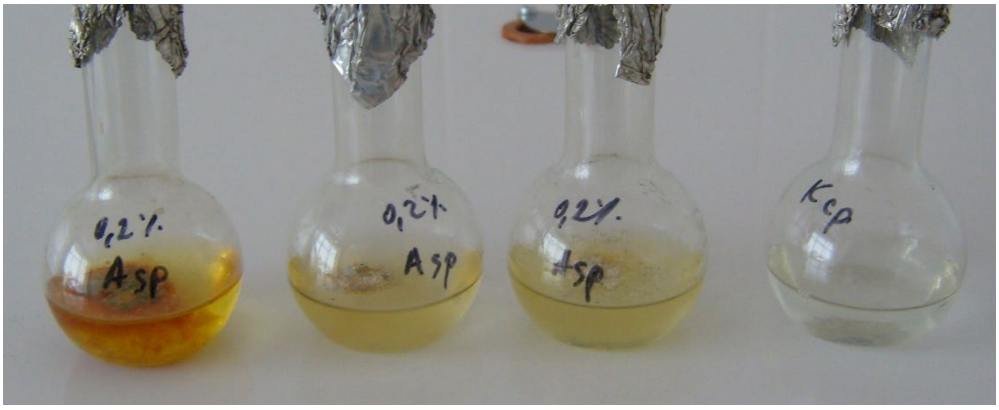


Рис. 2. Второй посев A. niger AM1. Крайняя справа колба – стерильная среда. Крайняя слева – культура аспергилла, отличающаяся от прочих усиленным ростом («рыжий гриб»). Обращает на себя внимание необычно яркая окраска этой культуры. Две колбы в центре – остальные повторы посева, растущие медленнее. Снимок сделан через 73 суток после посева.

Культура, судя по виду и окраске спор, безусловно, является черным аспергиллом, но морфология колонии необычная. Воздушный мицелий низкий, споры формируются почти на поверхности среды. В первые двое суток культура отличалась от предковой выделением в среду желтого пигмента, но после созревания спор становилась такой же черной и неотличимой. Это является еще одним свидетельством того, что в культуре произошла мутация. Детальное изучение морфологии этого аспергилла продемонстрировало его сходство с предковым AM1. А судя по тому, что «рыжий» гриб эффективнее набирал биомассу в среде с белым фосфором, эта мутация повышает его приспособленность к существованию в данной среде. Мы назвали этот штамм AM2.

Оказалось, что все четыре штамма A. niger выдерживают концентрацию белого фосфора 1 %. МИК для них так и не была найдена. По-видимому, высокая устойчивость к белому фосфору – признак, характеризующий все или многие черные аспергиллы. Тем не менее, при концентрациях 0.5 и 0.25 % штамм AM1 рос быстрее, т. е. оказался более устойчивым (рис. 3). Для бактерий МИК была найдена и составила для *A. xylosoxidans* 0.125 %, B. firmus 0.25 %, *Pseudomonas aeruginosa* и S. typhimurium 0.5 %. Из этого следует вывод, что черные аспергиллы более устойчивы к белому фосфору по сравнению с бактериями.

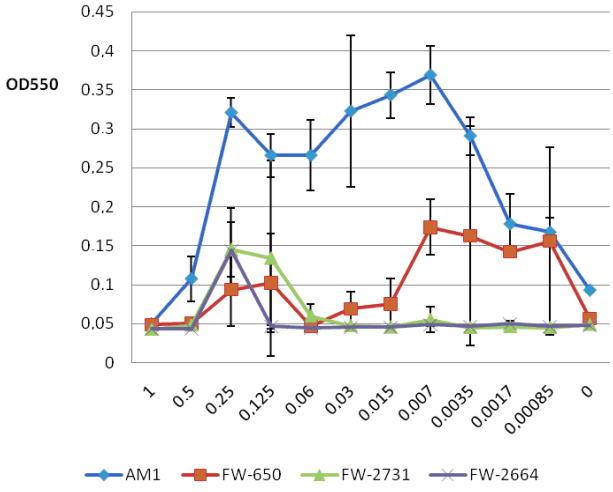


Рис. 3. Сравнение роста четырех штаммов A. niger в присутствии белого фосфора. На оси абсцисс указаны концентрации P4 в %, на оси ординат оптическое поглощение при λ 550 нм. Заметно, что штамм AM1 намного более устойчив к белому фосфору по сравнению со штаммами из ВКМ

Ожидалось, что после роста в благоприятных условиях – в среде с фосфатом – A. niger AM1 мог утратить устойчивость к белому фосфору. В действительности, гриб, росший до пересева на фосфате, продолжал расти. Из этой картины можно сделать вывод, что резистентность к белому фосфору у исследуемого нами штамма черного аспергилла закреплена в геноме, и является наследуемым признаком, передающимся в ряду поколений даже в отсутствие P_4.

Одной из серьезнейших проблем, с которой мы до сих пор сталкивались, производя посевы микроорганизмов в среды с белым фосфором, было отсутствие эффективного метода стерилизации последнего от присутствующих в нем спор A. niger. Был предложен метод стерилизации P_4 в мягких условиях, без применения высоких температур. Для этого навеска ксенобиотика должна погружаться на 15 минут в липофильный органический растворитель, который легко проникает через гидрофобные оболочки микробных спор и умерщвляет их. Мы предпочли пользоваться ацетоном [14] по причине сравнительно низкой растворимости в нем белого фосфора. В стерильльных средах рост отсутствовал даже спустя 117 дней, они остались прозрачными без опалесценции и взвесей. Это указывает на то, что стерилизация навесок P_4 ацетоном эффективна.

В представленной работе SOS-lux тест продемонстрировал генотоксичность белого фосфора [15]. Несмотря на то, что величина ДНК повреждающей активности оказалась низкой (рис. 4), этот результат получен впервые – во всех найденных нами источниках сообщается об отсутствии генотоксических свойств у белого фосфора. Показано, что у смеси белого фосфора и перекиси водорода генотоксичность резко возрастает по сравнению с одним белым фосфором, т. е. продукты окисления P_4 пероксидом, по-видимому, обладают большей генотоксичностью по сравнению с исходным веществом. Наибольшую ДНК повреждающую активность белый фосфор проявляет в диапазоне концентраций 25–250 мкг/мл.

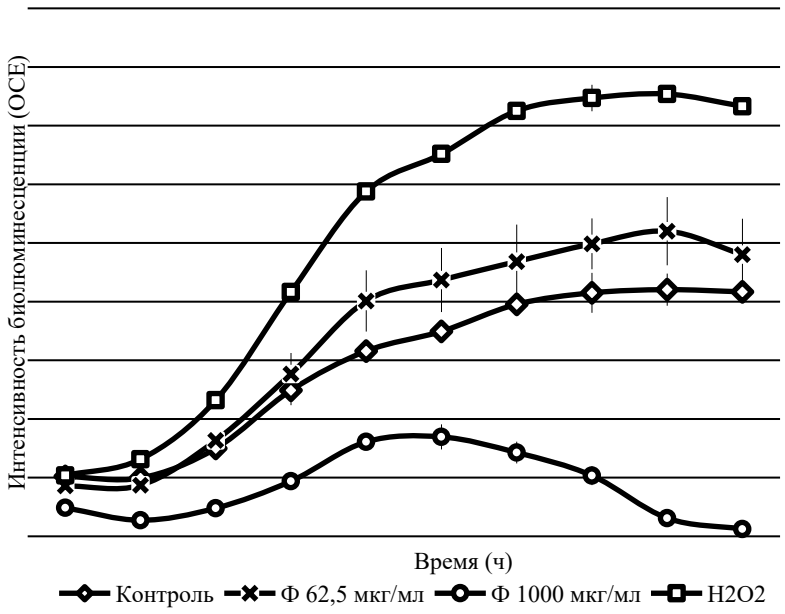


Рис. 4. Влияние белого фосфора на SOS-индукцию с перекисью водорода и негативным контролем (среда без мутагена)

Показано, что корешки лука в присутствии белого фосфора отставали в росте. Установлено также, что присутствие P_4 существенно снижает митотическую активность тканей по сравнению с контролем и, следовательно, обладает митотоксической активностью. Анализ соотношений фаз митоза показал увеличение доли клеток на стадии профазы с соответствующим уменьшением процентного отношения других стадий (табл. 1). Это может быть связано с блокировкой деления клеток в конце стадии профазы.

Таблица. 1. Митотический индекс при различных концентрациях белого фосфора.

Характер митозов в клетках корешка лука	Контроль	Белый фосфор в концентрации, %		
		0.008	0.012	0.016
Число проанализированных клеток	6181	3378	4483	5426
Митотический индекс (MI)	7.25 ± 1.15	3.31 ± 0.88	2.35 ± 0.65	1.35 ± 0.25
M/P (соотношение метафаза / профаза)	0.77	0.72	0.64	0.42
Процент аберрантных клеток (тип аберраций)	0.78 (мост)	1.79 (отставание)	5 (отставание, фрагмент)	7.69 (мост)

Обнаружение у белого фосфора генотоксических свойств не является неожиданностью. Тем не менее, в более ранних работах генотоксичность у P_4 обнаружена не была. Возможно, это результат недостаточной глубины исследования. Судя по всему, мы первые применили для этой цели Allium тест, и этим методом генотоксичность белого фосфора впервые была продемонстрирована.

ЛИТЕРАТУРА

1. Walsh C. Enabling the chemistry of life // Nature. 2001. Vol.409. No.6817. P.226–231.

2. Wackett L.P. The Metabolic Pathways of Biodegradation // The Prokaryotes. 2013. Vol.2. P.383-393.

3. Kalyuzhnaya M.G., Puri A.W., Lidstrom M.E. Metabolic engineering in methanotrophic bacteria // Metabolic Engineering. 2015. Vol.29. P.142–152.

4. Yurimoto H., Kato N., Sakai Y. Assimilation, Dissimilation, and Detoxification of Formaldehyde, a Central Metabolic Intermediate of Methylotrophic Metabolism // The Chemical Record. 2005. Vol. 5. No.6. P. 367–375.

5. Brysk M.M., Corpe W.A., Hankes L.V. β-Cyanoalanine Formation by Chromobacterium violaceum // J Bacteriol. 1969. Vol. 97. No. 1. P. 322–327.

6. Machingura M., Salomon E., Jez J.M., Ebbs S.D. The β-cyanoalanine synthase pathway: beyond cyanide detoxification // Plant, Cell and Environment. 2016. Vol. 39. No.10. P. 2329–2341.

7. Dunn M.F., Niks D., Ngo H., Barends T.R.M., Schlichting I. Tryptophan synthase: the workings of a channeling nanomachine // Trends in Biochemical Sciences. 2008. Vol.33. No.6. P. 254–264.

8. Миндубаев А.З., Белостоцкий Д.Е., Минзанова С.Т., Миронов В.Ф., Алимова Ф.К., Миронова Л.Г., Коновалов А.И. Метаногенез: Биохимия, Технология, Применение // Ученые записки КГУ, Серия естественные науки. 2010. Т.152. Кн.2. С. 178–191.

9. Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Кулик Н.В., Сапармырадов К.А., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Хаяров Х.Р., Бадеева Е.К. Селекция на рост устойчивости микроорганизмов к белому фосфору // Актуальная биотехнология. 2018. № 3 (26). С. 201–205.

10. Миндубаев А.З. От яда к удобрению // Наука и жизнь. 2019. № 3. С. 46–47.

11. Cooper D.L., Lovett S.T. Toxicity and tolerance mechanisms for azidothymidine, a replication gap-promoting agent, in Escherichia coli. // DNA Repair (Amst). 2011. Vol. 10. No. 3. P. 260–270.

12. Прохорова И.М., Ковалева М.И., Фомичева А.Н. Генетическая токсикология: лабораторный практикум. Ярослав. гос. ун-т им. П.Г. Демидова. Ярославль. 2005. 132 с.

13. Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Хаяров Х.Р., Сахапов И.Ф., Бадеева Е.К., Стробыкина А.С., Валидов Ш.З., Бабаев В.М., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Акосах Й.А., Яхваров Д.Г. Динамика превращений белого фосфора культурой черного аспергилла // Бутлеровские сообщения. 2017. Т. 51. № 8. С. 1–26.

14. Drews R.C. Acetone sterilization in ophthalmic surgery // Ann. Ophthalmol. 1977. V. 9(6). P. 781.

15. Миндубаев А.З., Бабынин Э.В., Бадеева Е.К., Пискунов Д.Б., Махиянов А.Н., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Волошина А.Д. Генотоксичность и цитогенетическое действие белого фосфора // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2019. Т.9. № 1. С. 81–94.

Актуальная биотехнология

№3 (30), 2019

УДК 579.669.213

БИОГЕОТЕХНОЛОГИЯ ПЕРЕРАБОТКИ ТЕХНОГЕННЫХ ОТХОДОВ АО «АЛМАЛЫКСКИЙ ГОРНО-МЕТАЛЛУРГИЧЕСКИЙ КОМБИНАТ» РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН

[1] М.Г. Сагдиева, [2] Д.Я. Мирталипов, [2] З.Г. Сагдиева, [2] З.В. Калиниченко

[1] ГП «Институт минеральных ресурсов» Госкомгеологии и минеральных ресурсов, Ташкент, Республика Узбекистан

[2] Институт микробиологии Академии наук, Ташкент, Республика Узбекистан

Одним из перспективных направлений является биогеотехнология – использование микроорганизмов для извлечения благородных и цветных металлов из различных видов нетрадиционного рудного сырья, переработка которых нерентабельна классическими металлургическими технологиями.

Научно-теоретические основы процесса взаимодействия микроорганизмов с минералами, а также имеющийся промышленный опыт применения биотехнологических методов позволили определить основные направления использования технологии бактериального выщелачивания. Это прежде всего бактериальное выщелачивание забалансовых медьсодержащих руд, вскрытие золота, тонковкрапленного в сульфидные минералы, особенно в арсенопирит, пирит и халькопирит, удаление мышьяка как вредной примеси из золотомышьяковых концентратов и продуктов, получаемых при обогащении руд цветных и редких металлов. Этим методом можно эффективно разделять такие коллективные концентраты цветных металлов, как медно-цинковые, медно-никелевые и т. п. Предварительная бактериальная обработка минеральных продуктов и концентратов перед обогатительными, металлургическими процессами значительно интенсифицирует их и увеличивает полноту извлечения металлов. В настоящее время исследованиями процесса бактериального окисления и выщелачивания занимается около 100 научных организаций и фирм в более чем 25 странах. Построены и действуют 20 промышленных установок кучного биовыщелачивания забалансовых руд в следующих странах: Чили, Китай, Австралия, США, Кипр, Мьянма и др., зарегистрировано большое количество действующих опытно-промышленных установок в целом ряде стран (1–4).

Проблема переработки техногенных медьсодержащих отходов, актуальна и для Республики Узбекистан. С 1948 года функционирует АО «Алмалыкский горно-металлургический комбинат» (АГМК, в результате чего на территории Алмалыкского региона на сегодняшний день накопилось 155 млн. тонн отвальных забалансовых и 1,350 млн. хвостов флотации, которые занимают огромную площадь и оказывают негативное действие на окружающую среду.

В настоящее время в Институте микробиологии АН РУз и ГП «Институт минеральных ресурсов» разработаны биогеотехнологии переработки техногенных отходов АГМК.

Биогеотехнологии переработки забалансовых руд АГМК

Объектом исследования явились следующие отвалы: отвал А-4 (окисленная руда), отвал А-7 (сульфидная руда) и отвал 9а (окисленная руда). Микробиологическое обследование объектов показало широкое распространение различных физиологических групп рудных микроорганизмов в различные времена года. Как свидетельствует из полученных нами данных, микрофлора обследованных объектов зависит от различных факторов, таких как влажность, температура, величина pH среды и минералогический состав руд. В рудах с кислой и слабокислой средой наблюдается развитие железо и серуокисляющих бактерий, что свидетельствует об активном окислении сульфидных минералов, в то время как в рудах с высоким значением pH обнаруживаются тионовые бактерии, окисляющие серу и различные восстановленные соединения серы. На основании проведенного скрининга выделенных геохимически активных микроорганизмов из различных руд Алмалыкского рудного поля были отобраны наиболее активные ацидофильные ассоциации (А-7–6, А-7–8, А-7–10, ОКМК-17, ОКМК-18, ОКМК-20) и T.f. – 4, которые были использованы для бактериального выщелачивания меди. Проведены лабораторные испытания кучного биовыщелачивания на массе руды 2 кг в перколяторах. Для окисленных руд влагоемкость составляет 0,17–0,2 л/кг, проницаемость – 9,8–11,2 мл/час/см^2, расход серной кислоты для закисления – 5,5–6,4 г/кг; для сульфидных руд – 0,19–0,22 л/кг, 9,6–11,7 мл/час/см^2 и 12,8–15,1 г/кг соответственно.

Определены оптимальные параметры технологии бактериального выщелачивания меди в перколяторах: использование руды с удалением мелкой фракции, добавление солей аммония (1,0 г/л) и фосфора (0,25 г./л), величина pH орошаемых растворов 2,2–2,0, скорость орошения 30 мл/час, проведение орошения 2 раза в неделю, пауза – 72 часа, посев культурой, выращенной на модифицированной среде 9К. Результаты проведенных лабораторных и укрупненно-лабораторных испытаний по выщелачиванию меди из окисленных руд отвала А-4 показывают, что в процессе закисления материала численность аборигенной микрофлоры достигает 10^{4-5}кл/г для железоокисляющих микроорганизмов, а извлечение меди при этом составляет около 50 %. Общее сквозное выщелачивание меди за 100 дней достигает 84,1 %. Краткая характеристика отвальных руд АГМК и извлечение меди при бактериальном выщелачивании представлены в таблице 1.

Таблица 1 Краткая характеристика отвалов по основным металлам и процент извлечения меди

Наименование отвала	Единица измерения	Количество	Содержание компонентов	Извлечение меди, %
Отвал № 4а (окисленная руда): медь золото серебро	 т. т. т.т. кг т.	 5898,1 20,7 2830,0 9,18	 0,35 % 0,48 г./т 1,5 г/т	84,1 За 100 дней
Отвал № 7а (сульфидная руда): медь золото серебро	 т. $т^3$ т.т. кг т.	 45141,9 103,24 20150,2 81,933	 0,23 % 0,44 г./т 1,8 г/т	79,1 За 100 дней
Отвал 9а (окисленная руда): медь золото серебро	 т.т. т.т. кг т.	 2742,6 23,89 3682,5 12,1	 0,87 % 1,34 г./т 4,4 г/т	89,6 За 100 дней

Для выщелачивания меди из окисленных руд рекомендуется проведение сернокислотного выщелачивания с интенсификацией аборигенной микрофлоры, которое достигается при постепенном закислении руды. Бактериальное выщелачивание меди из сульфидных руд в лабораторных и укрупненно-лабораторных экспериментах показывает, что в процессе закисления материала в продуктивные растворы выщелачивается только 33,5 % меди, а численность аборигенной микрофлоры достигает 10^{5-6}кл/г. При интродукции материала руды железоокисляющими микроорганизмами количество бактерий увеличивается до 10^{7-8}кл/г, а выщелачивание меди активизируется и достигает 79,6 % за 100 дней. В результате выполненных научно-исследовательских работ определена пригодность отвальных руд различного типа к переработке методом биовыщелачивания. На основе проведенных лабораторных и укрупненно-лабораторных испытаний разработан технологический регламент на проведение полупромышленных испытаний на массе руды 5000 тонн. Научно-исследовательские работы в этом направлении продолжаются.

Биогеотехнологии переработки хвостов флотации меднообогатительной фабрики АГМК

В двух хвостохранилищах АГМК находятся значительные запасы меди, цинка, молибдена, свинца, золота, серебра, кобальта кадмия, висмута, а также редких металлов и редкоземельных элементов. Ориентировочное количество цветных, благородных и редких металлов в хвостах флотации медно-обогатительной фабрики (МОФ) АГМК представлено в таблице 2.

Проведены лабораторные, укрупненно-лабораторные, полупромышленные и опытно-промышленные испытания биотехнологии кучного выщелачивания хвостов флотации МОФ. Данные по извлечению меди и золота проведенных исследований представлены в таблице 3.

Таблица 2 Содержание некоторых элементов в отвальных хвостах флотации МОФ и их количество в двух хвостохранилищах

Элементы	Содержание, %	Количество, тонна
Медь	0, 122	1 220 000
Молибден	0,0021	21 000
Цинк	0,011	110 000
Свинец	0,08	800 000
Мышьяк	0,03	300 000
Сера	2,18	21 800 000
Фосфор	0,051	510 000
Кобальт	0,0007	7 000
Кадмий	0,008	80 000
Золото, г/т	0,312	312,0
Серебро, г/т	1,21	1 210,0
Висмут, г/т	3,2	1 020,0
Селен, г/т	1,4	1 400,0
Теллур, г/т	1,2	1 020,0
Рений, г/т	0,25	250,0

Таблица 3 Результаты проведенных испытаний биотехнологии кучного выщелачивания хвостов флотации МОФ АГМК

Тип испытаний	Масса материала	Сроки выщелачивания	Извлечение меди, %	Извлечение золота, %
Лабораторные	1–3 кг	30 дней	67,7–75,8	81,2–92,6
Укрупненно-лабораторные	10–100 кг	120 дней	53,5–88,0	84,6–91,1
Полупромышленные	50 тонн	12 месяцев	53,4–58,2	84,9–90,1
Опытно-промышленные	5441 тонна	28 месяцев	52,7–56,9	88,3–90,5

Проведены опытно-промышленные испытания по биотехнологии переработки хвостов флотации МОФ АГМК на опытном участке кучного бактериально-химического выщелачивания (5411 т.), построенного силами АГМК на основе технологического регламента, разработанного нами (5–7). На фото 1–4 представлены общий вид опытно-промышленного штабеля биовыщелачивания техногенных отходов, культиватор для выращивания микроорганизмов, поверхность опытно-промышленного штабеля и емкость для приема продуктивных растворов.



Фото 1. Опытно-промышленный штабель биовыщелачивания техногенных отходов



Фото 3. Поверхность опытно-промышленного штабеля техногенных отходов



Фото 2. Культиватор для выращивания микроорганизмов



Фото 4. Емкость для приема продуктивных растворов

В процессе биовыщелачивания хвостов флотации были отобраны продуктивные растворы и проведен ICP MS анализ в аналитической лаборатории Государственной пробирной палаты Республики Узбекистан (ГПП РУз). Концентрации меди и сопутствующих цветных и редких металлов, а также редкоземельных элементов представлены в таблице 4.

Таблица 4 Концентрация сопутствующих меди цветных и редких металлов в продуктивных растворах бактериального выщелачивания хвостов флотации МОФ АГМК

Наименование элементов	Концентрация, мкг/л	Наименование элементов	Концентрация, мкг/л
Цветные металлы			
Cu (медь)	355 000.0–837 000.0	Ni (никель)	12 337.1–15 375.9
Zn (цинк)	161 474.2–191 599.1	Mg (магний)	3 379 059–3 811 573
Al (алюминий)	2 017200–2 486304	Co (кобальт)	6 941.6–8 188.6
Sr (стронций)	24.8–158.8	Bi (висмут)	0,0–2,2
Ti (титан)	117.0–561.1	Mo (молибден)	15.0–151.4
Cd (кадмий)	439.1–575.1	W (вольфрам)	1,2–7,1
V (ванадий)	3 951.4–5 027.1		
Редкие металлы и редкоземельные элементы			
Li (литий)	4 507.0–5 578.0	Be (бериллий)	292.7–432.1
Rb (рубидий)	37.3–288.4	Cs (цезий)	1,1–7,3
Eu (европий)	187,8–227,8	Ta (тантал)	1,6–3,1
Tb (тербий)	145,1–174,7	Yb (иттербий)	348,5–431,6
Dy (диспрозий)	807,4–949,4	Zr (цирконий)	19.7–45.8
Hf (гафний)	5,7–10,4	Te (теллур)	0,0–128.8
Re (рений)	18,9–26,7	In (индий)	8.6–18.6
Sc (сканд ий)	818.1–1 152.7	La (лантан)	1 097,9–1 413,9
Ce (церий)	4 969,2 – 5 909,7	Pr (празеодим)	760,3–863,9
Nd (неодим)	3 505,4–4 138,3	Sm (самарий)	907,6–1, 099, 9
Ho (гольмий)	153,9–179.2	Er (эрбий)	400,0–438,5
Tm (тулий)	54,6–68,3	Lu (лютеций)	55,8–65,3
U (уран)	932,9–1 138,7	Y (иттрий)	3 760.1–4 480.9
Th (торий)	828,2–1 560,5	Gd (гадолиний)	1 001,8–1 259,1
∑ REE	25 627,2 – 28 193,1		
Другие элементы			
Ag (серебро)	1.0–9.3	Sb (сурьма)	20.6–86.3
B (бор)	0.0–353.4	Si (кремний)	129 055.3–169 455.9
Na (натрий)	2 719.2–15 122.6	Ca (кальций)	531 108.4–571 155.0
Ba (барий)	14,3–208,7	Cr (хром)	1 927.5–6 245.4
Mn (марганец)	599 085.5–711 023.9		

Так, по данным аналитической лаборатории ГПП РУз концентрация Al в растворе составляет более 2 г/л, Mg ≈ 3,5 г/л, Ca ≈ 0,5 г/л, Si ≈ 0,2 г/л, Mn ≈ 0,7 г/л, Zn ≈ 0,17 г./л. Обнаруживается: порядка 5 мг/л Li, 8 мг/л Na, 1,0 мг/л Sc, 0,4 мг/л Ti, 4,5 мг/л V, и 3,0 мг Cr, 7 мг/л Co, 12 мг/л Ni, 4 мг/л Y, 0,5 мг/л Cd, 0,02 мг/л In, 0, 0,1 мг/л Te, 1,2 мг/л La, 5,5 мг/л Ce, 0,8 мг/л Pr, 3,8 мг/л Nd, 1,1 мг/л Sm, 0,2 мг/л Eu, 1,1 мг/л Gd, 0,16 мг/л Tb, 0,95 мг/л Dy, 0,16 мг/л Ho, 0,4 мг/л Er, 0,4 мг/л Yb, 0,06 мг/л Lu, 0,008 мг/л Hf, 1,2 мг Th, 1,0 мг/л U.

Предлагаемая биотехнология комплексной переработки хвостов флотации является экономически выгодной, она не требует дорогостоящего оборудования, все необходимые реагенты производятся в республике, по предварительным данным при получении 1 тонны меди методом кучного биовыщелачивания хвостов флотации МОФ АГМК чистая прибыль составляет 4392 доллара из расчета стоимости меди 6450 долларов США (данные на июль 2017 года).

ЛИТЕРАТУРА

1. M.E. Clark, J. Batty, C. van Buuren, D. Dew and M. Eamon Biotechnology In Minerals Processing: Technological Breakthroughs Creating Value // Proceedings of 16th International Biohydrometallurgy Symposium, Cape Town, South Africa, 25–29 September 2005, p. XVII-XXIVI.

2. Rawlings D.E., Dew D., Plessis C. Biomineralization of metal-containing ores and concentrates // TRENDS in Biotechnology. – 2003. – Vol. 21, № 1. – P. 38–44.

3. Brierley J.A. Present and future commercial applications of biohydrometallurgy // Hydrometallurgy. 2001. V. 59. P. 233–239.

4. Brierley J.A. Biohydrometallurgy – This Microbiologist's Perspective / Adv. Mat. Res. 2007. Vols. 20-21. P. 3-10.

5. Сагдиева М.Г. Биогидрометаллургические методы извлечения цветных, благородных и редких металлов из различных видов нетрадиционного рудного сырья Республики Узбекистан. // Узбекский биологический журнал, № 1–2, 2006, с. 11–18.

6. Сагдиева М.Г. Микроорганизмы золоторудных месторождений Узбекистана и их использование в извлечении благородных металлов // Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук, Ташкент, 1997, 38 с.

7. Sagdiyeva M.G., Borminskiy S.I., Rakhmatullaeva Z.E., Tonkikh A.K., Sanakulov K.S., B. Scott. Biohydrometallurgical Processing of Flotation Tailings from Different Copper Mills // Proceedings of 17th International Biohydrometallurgical Symposium, 2007, Frankfurt on Maine, p. 299–303.

УДК 575.174.015: 579.851: 579.26: 57.08: 579.6: 582.1: 628.3: 628.4

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА ПЕРЕРАБОТКИ КОММУНАЛЬНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ В АНАЭРОБНОМ БИОРЕАКТОРЕ С ЭЛЕКТРОФИЗИЧЕСКИМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ НА МЕТАНОГЕННОЕ МИКРОБНОЕ СООБЩЕСТВО

Ю.В. Литти*, Д.А. Ковалев**, А.А. Ковалев**, Ю.И. Русскова *, А.Н. Ножевникова*

**ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия*
***ФНАЦ ВИМ, Москва, Россия*

ВВЕДЕНИЕ

Анаэробное метаногенное сбраживание коммунальных органических отходов, к которым относятся органическая фракция твердых коммунальных отходов (ТКО) и обезвоженные осадки сточных вод (ОСВ), является перспективной заменой их безальтернативному захоронению на полигонах ТКО, т. к. позволяет, помимо стабилизации органического вещества отходов, получить ценный энергоноситель в виде метана. Распространение этой технологии в нашей стране стало по настоящему актуальным после принятия 6 февраля 2019 г. в первом чтении Государственной Думой РФ проекта Федерального закона "О внесении изменений в Федеральный закон "Об электроэнергетике" в части развития микрогенерации. Согласно закону, вырабатываемую биогазовыми установками электроэнергию можно будет продавать в сеть. Вполне очевидно, что коммерческие структуры, разрабатывающие и эксплуатирующие биогазовые установки, для снижения затрат будут отдавать предпочтение наиболее эффективным и скоростным технологиям. Надо отметить, что технология анаэробной переработки органических отходов существует уже более 60 лет, но ее широкое распространение сдерживается, в частности, из-за распространенного убеждения, что анаэробное разложение органического вещества (ОВ) является медленным процессом (Chen et al., 2008).

Исследования последних лет показывают, что в микробных электролизных элементах (МЭЭ, от англ. MEC – Microbial Electrolysis Cells) экзоэлектрогенные, то есть способные выделять и передавать электроны, бактерии (например, представители р. Geobacter) под воздействием электрического тока невысокого напряжения могут превращать органические отходы в разные продукты, такие как водород и метан (Cheng et al., 2009; Logan et al., 2008). Показано, что в однокамерном МЭЭ, например в анаэробном реакторе с помещенной в него парой электродов, ускоряются процессы гидролиза и метаногенеза. Увеличение производства метана в МЭЭ в основном объясняется катодным восстановлением диоксида углерода до метана с помощью наросшей на катоде биопленки, содержащей гидрогенотрофных метаногенов; при этом биопленка является своего рода биокатодом и предположительно осуществляет реакцию $CO_2 + 8H+ + 8e – = CH_4 + 2H_2O$ ($E^0 \approx$ -0,44 В против стандартного водородного электрода) (Cheng et al., 2009). Электроны, используемые для катодного восстановления CO_2, образуются в результате анодного окисления субстратов за счет переноса электронов из органических веществ на электрод с экзоэлектрогенами.

В то же время увеличение скорости метаногенеза может происходить за счет недавно открытого процесса прямого переноса электронов (от англ. DIET – Direct Interspecies Electron Transfer) между синтрофными (способными окислять летучие жирные кислоты и некоторые другие простые соединения в присутствии партнера-метаногена) бактериями и метаногенными археями, например, через небиологические электропроводящие (кондуктивные) материалы (Lovley, 2017). Так как электроды в МЭЭ выполняются из электропроводящего материала, наблюдаемое ускорение метаногенеза, помимо влияния электрического тока низкого напряжения, может быть отнесено также к физическому присутствию в этой системе электропроводящего материала.

Целью настоящей работы было исследовать процесс переработки смеси ОСВ и органической фракции ТКО в анаэробном биореакторе с парой электродов (катодом и анодом), между которыми протекал постоянный электрический ток с автоматической подстройкой напряжения. Для сравнения, эксперименты проводились при отсутствии электрического тока и кондуктивного материала, а также в присутствии материала-диэлектрика (не проводящего электричества).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные исследования проводили на испытательном стенде, включающем в себя 3 одинаковых биореактора объемом 100 л каждый (Р1, Р2, Р3). На рисунке 1 представлен общий вид стенда и технологическая схема одного из биореакторов. В центральной части биореактора смонтировано устройство для электрофизического воздействия на микробное сообщество, представляющее собой два цилиндрических электрода, расположенных один в другом соосно. Внутренний электрод является анодом (7), внешний – катодом (4). Катод (4) и анод (7) изготовлены из углеродной ткани, покрывающей трубу из диэлектрического материала (полипропилен) и соединены, соответственно, с крышкой (2) и днищем биореактора через диэлектрическую вставку. Расстояние между анодом и катодом составляет 45 мм. Движение сбраживаемой массы в реакторе отмечено стрелками на рисунке 1; перемешивание осуществляется насосом (6) в непрерывно-циклическом режиме (10 минут работа, 20 минут пауза), с кратностью циркуляции 1.5 объема биореактора в час. Трехходовой клапан (5) попеременно направляет поток сбраживаемой массы в верхнюю часть биореактора (1) для разрушения плавающей корки и в нижнюю часть биореактора (1) для размывания образующегося осадка. Биогаз из электродного отсека и реакторного пространства собирается раздельно через патрубок 14 и 15, соответственно. Процесс вели в термофильном режиме (52–56^0 С).

В качестве субстратов для метаногенного сбраживания использовали ОСВ (смесь первичного и вторичного осадка) Люберецких очистных сооружений и органическую фракцию ТКО (ОФ-ТКО). В качестве модели ОФ-ТКО для обеспечения его постоянного состава использовался комбикорм для крупного рогатого скота К-65. Влажность ОФ-ТКО составляла 10.5 %, а содержание органического вещества (ОВ) в сухом остатке – 90 %. Влажность ОСВ составляла около 97.7 %, концентрация ОВ – около 14.6 г./л. В каждый из 3-х биореакторов подавали одинаковую субстратную смесь (ОСВ с ОФ-ТКО). Для получения необходимой концентрации ОВ и влажности, субстратную смесь разбавляли требуемым количеством воды.

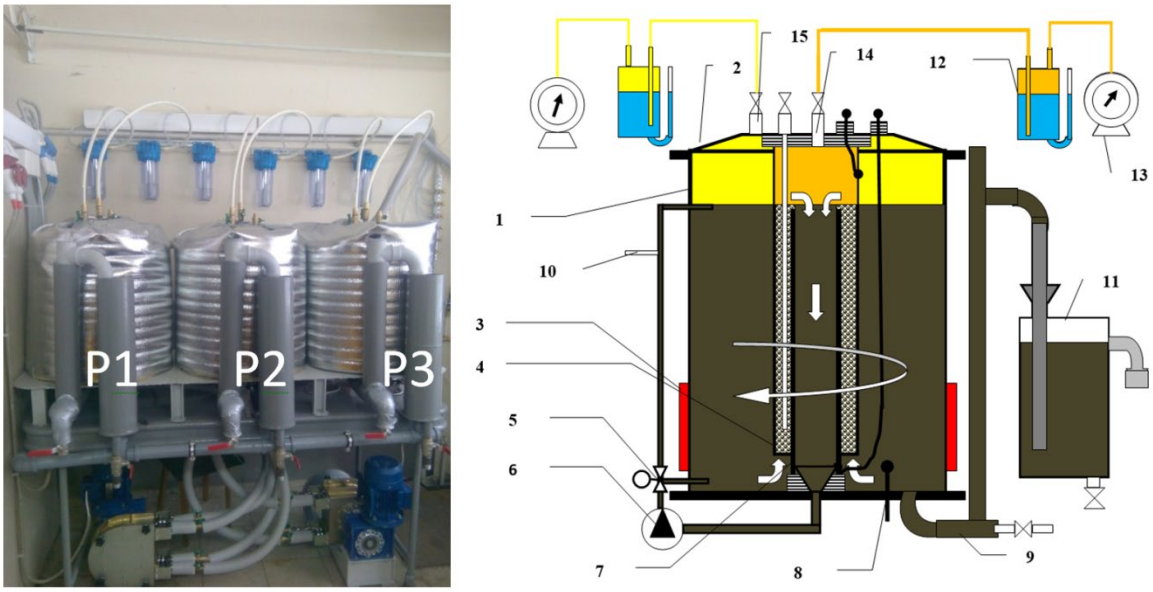


Рисунок 1 – Общий вид стенда (слева) и схема одного из 3-х анаэробных биореакторов объемом 100 л (справа) с электрофизическим воздействием на метаногенное микробное сообщество: Р1-Р3 – анаэробные биореакторы, 1 – корпус биореактора; 2 – крышка биореактора; 3 – электронагреватель; 4 – катод; 5 – трехходовой клапан перемешивания; 6 – насос перемешивания; 7 – анод; 8 – датчик температуры; 9 – трубопровод выгрузки; 10 – патрубок загрузки; 11 – отстойник; 12 – гидрозатвор; 13 – счетчик газа; 14 – патрубок отвода биогаза из электродного отсека; 15 – патрубок отвода биогаза из реакторного пространства. Стрелками указано движение сбраживаемой массы

В первой серии экспериментов исследовали влияние физического присутствия электропроводящей углеродной ткани в биореакторе (Р1) на характеристики метаногенного сбраживания. Во втором биореакторе (Р2) процесс проводили с использованием стеклоткани, обладающей диэлектрическими свойствами. Для оценки вклада в процесс анаэробного сбраживания биопленки, нарастающей на электропроводящей углеродной ткани и на диэлектрической стеклоткани, в третьем биореакторе (Р3) на трубы из полипропилена (основа электродов) не устанавливали никакой ткани.

Анаэробные биореакторы выводили на рабочий режим, используя в качестве субстрата только ОСВ. После выхода на рабочий режим, что оценивалось стабильностью выхода биогаза, содержания метана в биогазе и характеристик эффлюента, в биореакторах постепенно повышали нагрузку по органическому веществу путем увеличения содержания ОФ-ТКО в смеси с ОСВ и снижения гидравлического времени удержания в биореакторах с 7 до 5 суток. Повышение нагрузки производили в 4 этапа со средней для подобных биореакторов нагрузки 2.4 кг ОВ/($м^3$ сутки) до сверхвысокой нагрузки 12.12 кг ОВ/($м^3$ сутки). Целью столь значительного повышения нагрузки было добиться дестабилизации процесса и закисления сбраживаемой массы, для того, чтобы оценить возможное влияние электропроводящей ткани и нарастающей на ней биопленки на повышение устойчивости к закислению, которое является наиболее распространенной причиной выхода анаэробных реакторов из строя (Chen et al., 2008; Ножевникова и др., 2016).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 2 представлена динамика образования метана в первой серии экспериментов. В начале эксперимента при изменении субстрата с ОСВ на смесь ОСВ и ОФ-ТКО происходила адаптация микробного сообщества реакторов, что характеризовалось нестабильным выходом метана. Однако после полной смены объема реактора (7 суток) скорость образования метана и другие характеристики процесса стабилизировались. Из графика видно, что увеличение нагрузки по органическому веществу сопровождалось пропорциональным увеличением скорости выхода метана.

При сравнении выхода метана в биореакторах Р1 и Р2 можно отметить, что в интервале нагрузки от 2.4 до 8.66 кг ОВ/(м^3 сутки) скорость выхода метана была немного выше (на 0.5–2.4 % в зависимости от нагрузки) в реакторе Р2, где была установлена стеклоткань. Это возможно объясняется тем, что при вскрытии биореакторов в конце первой серии экспериментов для отбора образцов биопленки, наросшая на стеклоткани биопленка визуально была чуть толще, чем на углеродной ткани. Также необходимо отметить, что стеклоткань имеет более развитую поверхность (более шершавая), чем углеродная ткань, что вероятно было более благоприятным для нарастания и удерживания на ней биопленки.

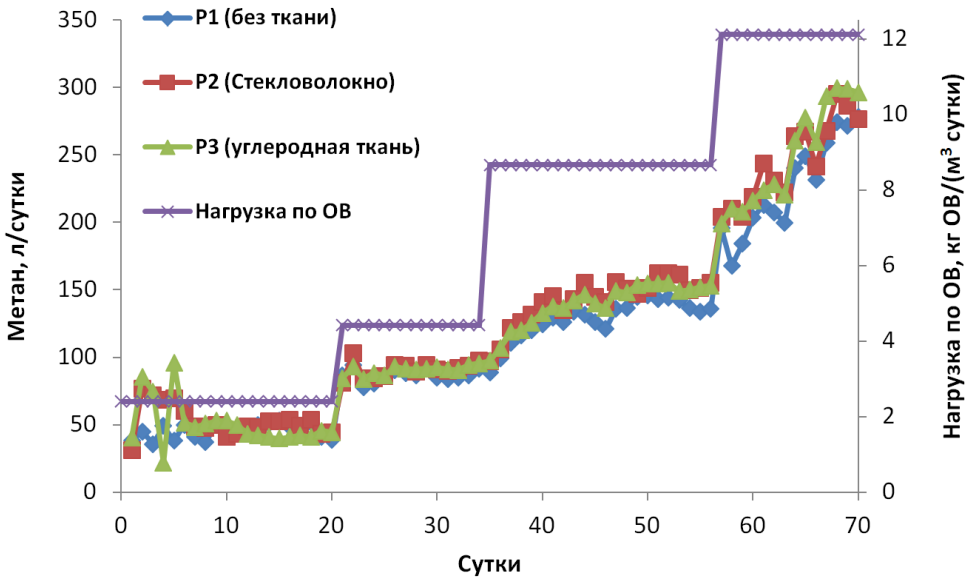


Рисунок 2 – Динамика образования метана при постепенном повышении нагрузки по субстрату (ОВ) с 2.4 до 12.1 кг ОВ/(м3 сутки) в анаэробных биореакторах без ткани, с диэлектрической стеклотканью и электропроводящей углеродной тканью.

При переходе биореакторов на максимальную нагрузку 12.12 кг ОВ/(м^3 сутки) степень удаления органического вещества в эффлюенте падала с 65–71 до 53–59 % (табл. 1), однако ожидаемого закисления сбраживаемой массы не наблюдалось. Добиться еще большего повышения нагрузки с помощью увеличения содержания ОФ-ТКО в субстратной смеси не представлялось возможным, т. к. влажность субстратной смеси снижалась до 93 % и менее, что делало невозможным поддержание требуемого гидравлического режима в биореакторе (происходила закупорка трубопроводов). Тем не менее, при максимальной нагрузке начало проявляться положительное влияние присутствия электропроводящего материала на характеристики процесса анаэробного сбраживания. Так, по сравнению с биореактором Р2, содержащем диэлектрическую стеклоткань, в биореакторе Р1 (с углеродной тканью) наблюдалось увеличение выхода биогаза на 1.5 % и метана на 3.2 %, содержание метана в биогазе на 1.3 %, степени удаления ОВ на 9.9 %, а также снижения концентрации ЛЖК на 11.0 %.

Суммарное влияние электропроводящей ткани и наросшей на ней биопленки на характеристики процесса при максимальной нагрузке можно оценить при сравнении данных, полученных в биореакторах Р1 (углеродная ткань) и Р3 (без ткани) (табл. 1). По сравнению с Р3, в биореакторе Р1 наблюдалось увеличение выхода биогаза на 3.7 % и метана на 9.5 %, содержание метана в биогазе на 15.1 %, степени удаления ОВ на 11.5 %, а также снижения концентрации ЛЖК на 33.7 %.

Во второй серии экспериментов в биореакторах в качестве анода и катода была установлена новая (без биопленки) углеродная ткань. К катоду и аноду подключался источник постоянного электрического тока с автоматической подстройкой напряжения. Силу тока варьировали от 100 мА до 500 мА. В данной работе представлены характеристики процесса анаэробного сбраживания при установленных силах тока 100 (Р1*), 200 (Р2*) и 500 (Р3*) мА, при этом напряжение между электродами составляло 2.5, 3.2 и 6.3–7.2 В, соответственно.

Подача электричества на электроды была периодической и осуществлялась в соответствии с режимом работы насоса перемешивания – 10 минут работа, 20 минут пауза. Для оценки влияния электрического тока на процесс анаэробного сбраживания и возможности использования рассматриваемого метода воздействия для повышения устойчивости метаногенного микробного сообщества к закислению сбраживаемой массы, процесс вели при той же максимальной нагрузке 12.12 кг ОВ/(м^3 сутки), как и в конце первой серии экспериментов.

В таблице 1 представлены основные характеристики процесса при воздействии электричества на метаногенное микробное сообщество. Видно, что в биореакторах Р1-Р3* с подключенным к катоду и аноду напряжением от внешнего источника тока, по сравнению с биореактором, в котором присутствовала электропроводящая ткань, но не было подключенного электрического тока (Р1 из первой серии экспериментов), показатели процесса анаэробного сбраживания смеси ОСВ и ОФ-ТКО, в целом, улучшались. Так, при силе тока 100, 200 и 500 мА, выход биогаза увеличивался, соответственно, на 14.3 %, 22.4 % и 31.4 %. Увеличение выхода метана наблюдалось при силах тока 200 и 500 мА, соответственно, на 4.2 и 7.5 %. При силе тока 100 мА происходило небольшое снижение (на 2.0 %) выхода метана.

Интересно, что достаточно большое увеличение выхода биогаза сопровождалось снижением содержания в нем метана. Так, по сравнению с реактором Р1 (углеродная ткань, первая серия экспериментов при максимальной нагрузке), в реакторах Р1* (100 мА), Р2* (200 мА) и Р3* (500 мА), снижение содержания метана в биогазе составило 15.3, 15.6 и 18.4 %, соответственно. Вполне вероятно, что при подключении электрического тока в сбраживаемой массе начинались процессы электролиза воды, которые могли ингибировать метаногенов, являющихся строгими анаэробами (Chen et al., 2008; Ножевникова и др., 2016). Это предположение подтверждается тем, что в биогазе из биореактора Р3*, в котором был максимальный установленный ток (500 мА), обнаруживалось довольно высокое содержание кислорода, достигавшее в некоторые моменты 0.44–0.59 %. Аналогично снижению содержания метана в биогазе, происходило снижение степени разложения органического вещества, на 5.6, 4.9 и 17.5 %, соответственно, при силе тока 100, 200 и 500 мА. В то же время, ингибирования синтрофных бактерий, видимо не происходило, т. к. в сбраживаемой массе не наблюдалось накопления летучих жирных кислот. Также на всём протяжении первой и второй серии экспериментов в биореакторах не наблюдалось накопления молекулярного водорода, содержание которого в биогазе не превышало 0.01–0.03 %. Это свидетельствовало о том, что использование диэлектрических и электропроводящих материалов, а также электрического тока не влияло на стабильность метаногенного сбраживания смеси коммунальных органических отходов.

Таблица 1 – Характеристики процесса метаногенного сбраживания в анаэробных биореакторах при максимальной нагрузке 12,12 кг ОВ/(м^3 сутки) в первой и второй серии экспериментов

Показатель	Размерность	Без ткани (Р3)	Стеклоткань (диэлектрическая) (Р2)	Углеродная (электропроводящая) ткань			
				0 мА (Р1)	100 мА (Р1*)	200 мА (Р2*)	500 мА (Р3*)
Выход газа реакторный	л/сутки	–	–	–	410.1±51.6	416.5±23.9	439.2±20.1
Выход газа анодный	л/сутки	–	–	–	46.9±25.2	72.8±5.9	83.3±7.4
Выход газа общий	л/сутки	384.64±48.3	393.3±38.3	399.8±48.5	457.0±65.0	489.2±26.9	525.2±24.6
СН4 в реакторном биогазе	%	65.3±1.3	67.7±1.7	68.6±0.9	58.1±6.5	57.9±1.6	56.0±1.9
СН4 в биогазе из электродного отсека	%	–	–	–	58.9±3.1	58.8±0.8	56.3±3.1
Выход СН4 реакторный	л/сутки	–	–	–	244.5±32.4	244.1±16.8	248.8±14.1
Выход СН4 анодный	л/сутки	–	–	–	27.1±16.6	44.7±2.2	49.2±4.6
Выход СН4 общий	л/сутки	253.1±31.0	268.4±24.1	277.1±32.4	271.6±38.4	288.8±18.7	297.9±18.3
Удаление ОВ	%	52.9±16.4	53.7±10.9	59.0±19.0	55.7±5.6	56.1±4.1	48.7±6.4
pH	–	6.62±0.11	6.86±0.18	6.87±0.19	6.80±0.15	6.97±0.12	6.96±0.12
Электропроводность	мСм/см	10.2±0.4	10.1±0.4	10.3±0.5	11.1±0.3	10.8±0.4	10.0±0.7
N–NH4	мг/л	820±40	824±23	793±20	839±54	725±58	698±44
Этанол	ммоль/л	7.02±5.13	1.37±1.96	2.63±2.22	2.10±2.85	1.89±0.49	1.23±0.74
Ацетат	ммоль/л	13.58±7.67	8.47±4.64	8.93±3.09	5.07±4.66	8.42±0.84	6.72±0.68
Пропионат	ммоль/л	2.35±2.04	3.50±2.78	1.87±1.24	2.01±1.51	1.06±0.04	0.89±0.11
н– и изо–Бутират	ммоль/л	0.50±0.65	0.19±0.43	0.19±0.43	0.20±0.18	0.97±0.42	0.62±0.31
н– и изо–Валерат	ммоль/л	0.09±0.19	0.16±0.36	0.00±0.00	0.03±0.10	0.00±0.00	0.00±0.00
ЛЖКобщ (экв. ацетата)	г/л	0.98±0.44	0.73±0.28	0.65±0.15	0.43±0.26	0.62±0.03	0.49±0.03

Примечание: * – вторая серия экспериментов (с подключением электрического тока к катоду и аноду)

Количество электричества, подаваемое ежесуточно на электроды в биореакторах Р1* – Р3×можно определить по формуле P = U×I×t, где P – количество потребленной электроэнергии (Вт×час), U – напряжение (В), I – сила тока (А), t – время подачи электричества на электроды (час).

Исходя из того, что 1 кВт электроэнергии эквивалентен энергии, содержащейся в 0.108 м^3 CH_4 (https://a-invest.com.ua/aktualno/tablitsa-teplotvornosti), а время подачи электричества в биореакторы составляло 8 часов сутки, количество CH_4, которое соответствует израсходованной электроэнергии в биореакторах с силой тока 100, 200 и 500 мА, составило, соответственно, 0.216, 0.553 и 3.11 л в сутки. При этом, по сравнению с биореактором Р1 (из первой серии экспериментов), в котором были установлены катод и анод из углеродной ткани, но без подачи на них напряжения из внешнего источника электроэнергии, прирост выхода метана в биореакторах с силой тока 200 и 500 мА, составил 11.7 и 20.8 л, соответственно. После вычета количества метана, эквивалентного затраченной электроэнергии, чистый суточный прирост выхода метана составил 11.1 и 17.7 л или 4.0 и 6.4 %, соответственно, при силе тока 200 и 500 мА.

Таким образом, в выполненной нами работе показано значительное, но не до конца понятное, положительное влияние прикрепленных микроорганизмов (биопленки), электропроводящего материала и электрического тока на характеристики процесса метаногенного сбраживания коммунальных органических отходов. Полученные результаты представляют практический интерес, т. к. использованные в работе подходы имеют несложное конструктивное исполнение и довольно просты в эксплуатации. Ввиду большой перспективности исследуемого метода, целесообразно продолжение экспериментальных исследований по изучению микробного сообщества в биореакторах с электрофизическим воздействием, подбору оптимального режима подачи электричества на электроды, перемешивания сбраживаемой массы, гидравлического времени удержания и нагрузки по органическому веществу.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Минобрнауки России, уникальный идентификатор RFMEFI60417 x 0190.

ЛИТЕРАТУРА

Chen Y., Cheng J.J., Creamer K.S. Inhibition of anaerobic digestion process: A review // Bioresource Technol. 2008. V. 99. P. 4044

Cheng S., Xing D., Call D.F., Logan B.E. Direct biological conversion of electrical current into methane by electromethanogenesis // Environ. Sci. Technol. 2009. V. 43. P. 3953–3958.

Logan B.E., Call D., Cheng S., Hamelers H.V.M., Sleutels T.H.J.A., Jeremiasse A.W., Rozendal R.A. Microbial electrolysis cells for high yield hydrogen gas production from organic matter. Environ. Sci. Technol. 2008. V. 42. P. 8630–8640.

Lovley D.R. Syntrophy Goes Electric: Direct Interspecies Electron Transfer // Annu. Rev. Microbiol. 2017. V. 71. P. 643–664

Биотехнология и микробиология анаэробной переработки органических коммунальных отходов: коллективная монография / общая ред. и составл. А.Н. Ножевниковой, А.Ю. Каллистова, Ю.В. Литти, М.В. Кевбрина; – М.: Университетская книга, 2016. – 320 с., ISBN 978–5–98699–166–5

https://a-invest.com.ua/aktualno/tablitsa-teplotvornosti

УДК 544.01 : 57.013 : 57.014 : 57.017 : 579.222

БИОАККУМУЛЯЦИЯ ХИМИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ ЦИАНОБАКТЕРИЯМИ В ГИДРОТЕРМАЛЬНЫХ ИСТОЧНИКАХ КАМЧАТКИ И СОЗДАНИЕ ПРИРОДОПОДОБНОЙ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ НАНОРАЗМЕРНОГО КРЕМНЕЗЕМА ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ

В.Н. Зеленков[1,2], В.В. Потапов[3]

[1] Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, Москва, Россия

[2] Всероссийский научно-исследовательский институт овощеводства – филиал Федеральный научный центр овощеводства, Московская область, Россия

[3] Научно-исследовательский геотехнологический центр ДВО РАН Петропавловск-Камчатский, Россия

Проблема сохранения биологического разнообразия на Земле в настоящее время включает в себя сохранение генофонда не только людей, животных и растений, но также и микроорганизмов – важнейшего фактора биологической жизни планеты. Принято считать, что экологические условия гидротерм вулканических областей являются наиболее древними и принципиально малоизменяемыми, что представляет не только теоретический, но и практический интерес. Цианобактерии являются одними из самых древних фотосинтезирующих организмов нашей планеты. Они имеют прекрасно документированную палеонтологическую историю и обнаружены в осадочных породах с возрастом 3,2 миллиарда лет [1–3].

Изучение химического элементного состава растительных образцов как лекарственных, так и растений сельскохозяйственного назначения имеет важное значение для познания закономерностей накопления макро- и микроэлементов растениями, произрастающими на гидротермальных участках Камчатки, а в более широком аспекте – для познания организации жизненных процессов у растений в экстремальных условиях. Актуальность разработки данной проблемы хорошо понятна с учетом перспективы использования растений, модифицированных особыми условиями произрастания, для создания новых видов продукции лечебно-профилактической направленности.

Термофильные водоросли (цианобактерии) Камчатки издавна привлекали внимание альгологов-флористов, химиков и биохимиков. Одной из научных задач в решении вопросов познания физиологических аспектов существования фотосинтезирующих бактерий в условиях высоких температур термальных вод с высокой минерализацией является решение вопросов по выявлению закономерностей концентрирования химических элементов относительно их содержания в водной среде.

Наши исследования и исследования наших коллег [1–11] показали, что в матах доминируют фототрофные бактерии, среди которых цианобактерии являются основными продуцентами органического вещества и отвечают за структуру мата. Жизнедеятельность микрофлоры сообщества, ведёт к образованию вертикальной зональности мата. Ясно различаются три зоны: верхняя – зелёная, аэробная, с развитием цианобактерий, нижняя – чёрная, строго анаэробная, где идёт распад органического материала с образованием метана и сероводорода и, соответственно, промежуточная – между этими двумя зонами (желтая), зона деструкции цианобактерий. Маты, встреченные нами на Камчатке, это маты, растущие по течению гидротермального потока. Однако, в виде слоистых плавающих пленок, они наблюдались и на поверхности тёплых водоёмов, с подпиткой горячих источников. Площадь таких матов может достигать десятков квадратных метров, толщина их 10–15 мм. и более.

В работе [12] приведены данные по гидрохимическим характеристикам воды Карымшинского термального источника и образцов цианобактерий полученные в ноябре 2016 г. Сравнивая эти показатели с определенными нами показателями термальной воды Карымшинского источника 2004 г. мы получили совпадающие значения по химическому составу как воды, так и образцов цианобактерий. Показатели содержания кремнезема характеризуют Карымшинский источник как гидрохимически стабильный по этим параметрам.

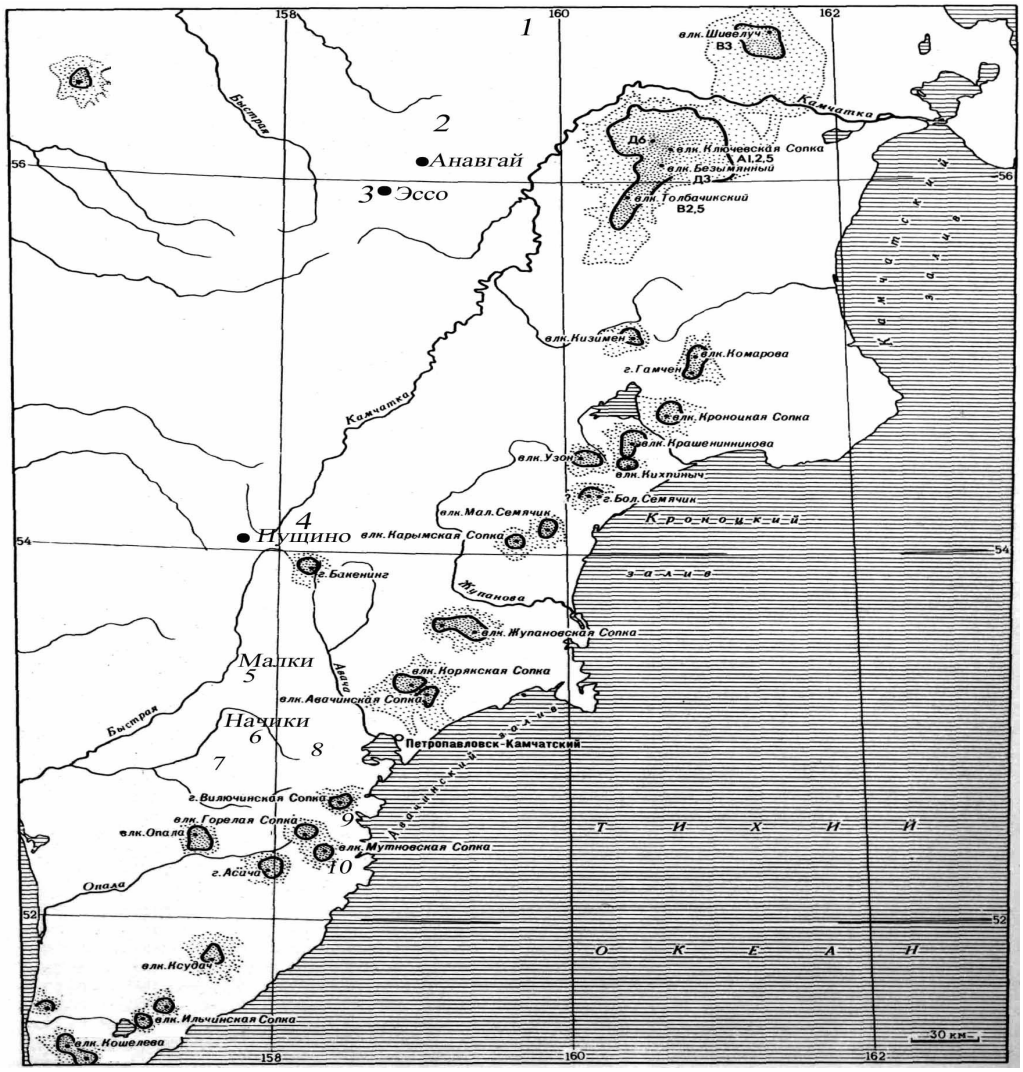


Рисунок. Исследованные авторами участки активных гидротерм от вулкана Мутновский до вулкана Шивелуч (4 экспедиции 2001–2005 гг. и локальные экспедиции 2016–2017 гг.). Участки исследований на карте №№ 1–10, с юга на север Камчатки более 500 км)

В результате проведенных исследований 2003–2018 гг. мы получили данные по концентрациям более 20 химическим элементам, как в термальной воде более десятка различных гидротерм Камчатки на протяжении более 500 км с юга на север так и по образцам цианобактерий, обитающих в этих гидротермах.

По соотношению концентрации химических элементов в высушенной биомассе (мг/кг) к концентрации элементов в среде обитания – термальной воде (мг/дм^3), мы определили коэффициент биоаккумуляции химических элементов клетками цианобактерий. Учитывая, что 1 дм^3 для термальной воды имеет массу равную практически 1 кг мы, в качестве коэффициента биоаккумуляции, имеем безразмерную количественную величину, характеризующую свойство живой материи – сообщества фотосинтезирующих бактерий включать в свой метаболизм химические элементы.

Ранее, нами для цианобактерий было выявлено присущее цианобактериям свойство – гиперконцентрирования химических элементов в гидротермальных средах [4, 5, 7].

В микробном сообществе фотосинтезирующих цианобактерий одновременно протекают два процесса, характеризующих жизнь – размножение, связанное с делением клеток и смертью, связанной с их необратимым разрушением. В целом, мы имеем дело с условно равновесной системой только в определенный момент времени, когда количественный прирост биомассы по клеткам равен количеству отмерших и разрушающихся клеток.

Поскольку, в реальных условиях при омывании термальной водой биомассы сообщества микроорганизмов содержимое разрушающихся клеток вымывается, мы можем говорить о свойстве биоаккумуляции химических элементов именно живой материей и коэффициент биоаккумуляции будет характеризовать специфику конкретного сообщества микроорганизмов в данных условиях гидротермальной среды обитания (кислотность, температура, минерализация).

Авторами экспериментально установлен новый научный факт, что для клеток фотосинтезирующих бактерий характерно концентрирование многих химических элементов до уровня превышающего их содержание в водной среде обитания (гидротермы) в 10 и более раз.

Выявлено, что для кобальта, хрома и бора степень превышения концентрации составляет более 100 раз, для Mo, Ni, Pb – более 1000 раз, для P, Mg, V, Cu, Si, Ca, Ba – более 10 000 раз, для Mn – более 30 000 раз и для Ti, Fe, Al – более 100 000 раз. Таким образом, можно говорить о явлении гиперконцентрирования химических элементов клетками цианобактерий в гидротермальных средах их обитания. Данное явление установлено нами для сообществ цианобактерий различных гидротерм и достоверно показано в экспериментах по определению химических элементов в образцах, собранных участниками четырех экспедиций в различных районах Камчатки в 2002–2005 гг.

С точки зрения физико-химических процессов, основой реализации концентрирования живыми клетками кремнезема является свойство наноразмерных форм кремнезема проникать через мембрану клетки при наличии их во внешней среде или образовываться внутри клетки при концентрировании ортокремниевой кислоты во внутриклеточной среде с последующей естественной поликонденсацией молекул с образованием твердой фазы наноразмерных форм кремнезема после превышения его (кремнезема) растворимости во внутриклеточной жидкости с образованием высокодисперсного наноразмерного золя кремнезема без перехода в гелеобразное состояние.

Факты по сохранению жизнеспособности клеток фотосинтезирующих бактерий при гиперконцентрировании ими кремния в природных гидротермах Камчатки, позволяет нам утверждать, что полученные искусственным способом нанодисперсные золи из гидротермальной среды могут быть сырьевой основой (субстанцией) для создания новых биологически активных материалов для сельского хозяйства, ветеринарии и медицины.

Единство физико-химического механизма гиперконцентрирования кремния живой материей фотосинтезирующих клеток цианобактерий посредством образования и накопления наноразмерного кремнезема до концентраций более 10 % на сухой вес образцов, на наш взгляд, открывает перспективы новых направлений в бионанотехнологии – создание биогенных кремнийсодержащих наноструктурных материалов с использованием технических средств ультрафильтрации.

В России последние 15 лет нами активно развивается это направление по получению и использованию нанодисперсного кремнезема гидротермального происхождения [13–19]. В качестве сырья для получения нанодисперсного кремнезема используются жидкая фаза теплоносителя продуктивных скважин действующих гидротермальных электростанций южной Камчатки (Мутновская ГеоЭС, Верхне-Мутновская ГеоЭС). Применение современных методов мембранной ультрафильтрации позволило создать современную технологию производства стабильных водных золей нанокремнезема с низкой концентрацией примесей [13–17]. Эта технология практически идентична «технологии» существующей в природе в гидротермальных водах планеты и реализуемой клетками цианобактерий в процессе своей жизнедеятельности. Можно говорить о создании природоподобной технологии получения наноразмерного кремнезема высокой степени очистки где в качестве исходного сырья используются гидротермальные воды а в качестве основной технологии – мембранные технологии очистки и концентрирования высокодисперсных наносистем систем в водной среде.

Актуальной проблемой в лекарственном растениеводстве является научный поиск путей повышения урожайности растений. В этом направлении несомненный интерес представляют вопросы по выявлению новых регуляторов роста растений для некорневой обработки растений, позволяющих получать экологически чистое и биологически ценное растительное лекарственное и сельскохозяйственное сырье и продукцию.

Авторы надеются, что гидротермальный нанокремнезем в ближайшем будущем найдет более широкое применение в биотехнологии применительно к решению проблем медицины, сельского хозяйства и других производственных областях человеческой деятельности [18, 19].

ЛИТЕРАТУРА

1. Заварзин Г.А. Заповедники для микробов // Природа, 1990 № 2, С. 39–45
2. Кальдерные микроорганизмы. Ред. Заварзин Г.А., М., Наука, 1989, 121 с.
3. Герасименко Л.М., Заварзин Г.А. Реликтовые цианобактериальные сообщества // Сб. Проблемы эволюции ведущих компонентов биосферы. М., Наука, 1993, С. 221–252
4. Зеленков В.Н. Потапов В.В. Химический и элементный состав воды Дачных гидротермальных источников Мутновского вулкана. Первичная оценка химического элементного состава биологической составляющей гидротермальной среды. // Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты: Сборник научных трудов. Вып.11.ч. 2 – М: РАЕН, 2004. – с. 65–69.
5. Зеленков В.Н., Потапов В.В. Химическая характеристика воды участка «Медвежий» Дачных источников Мутновского вулкана и первичная оценка лиофильности химических элементов по их степени концентрирования цианобактериями в экстремальной среде обитания. Кварц. Кремнезем: Материалы Международного семинара. Сыктывкар: Гелпринт, 2004, С. 287–288.
6. Зеленков В.Н., Орлеанский В.К., Герасименко Л.М. Микроэлементный состав бактериальных матов цианобактерий Вилючинских гидротерм Камчатки. // Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты: Сборник научных трудов. Вып.12 – М: РАЕН, 2005. – с. 37–51.
7. Зеленков В.Н., Потапов В.В., Марков М.В. Гиперконцентрирование химических элементов растениями и цианобактериями на гидротермальных площадках Камчатки. Вестник РАЕН. Том 6 – 2014. – с. 67–75.
8. Зеленков В.Н. Устойчивость биосистем к стресс-факторам – проявление свойств наноразмерных форм кремнезема. // Наночастицы в природе. Нанотехнологии в приложении к биологическим системам: Материалы 2-го Российского научно-методического семинара. – М: РАЕН, 2004 – с. 84–85.
9. Герасименко Л.М., Миходюк О.С., Зеленков В.Н. Видовое разнообразие цианобактерий в гидротермах Камчатки. // Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты: Сборник научных трудов. Вып.12 – М: РАЕН, 2005. – с. 20–28.
10. Зеленков В.Н., Потапов В.В. Гиперконцентрирование кремния клетками цианобактерий как закономерность существования золей нанодисперсного кремнезема в высоких концентрациях. «Актуальные проблемы нанобиотехнологии и инноваций с нетрадиционными природными ресурсами и создания функциональных продуктов». Материалы V Российской научно-практической конференции. – М. – РАЕН, 2009 – С. 33–36.
11. Лапин А.А., Потапов В.В., Зеленков В.Н. Суммарная антиоксидантная и биологическая активность нанодисперсного кремнезема из термальных вод Камчатки. Бутлеровские сообщения. 2010. Т.20. № 4. С. 71–78.
12. Зеленков В.Н., Потапов В.В., Чернягина О.А. Концентрирование химических элементов цианобактериями Карымшинских гидротерм Камичатки / Актуальные проблемы биологии и экологии: Материалы международной заочной научно-практияеской конференции (г. Грозный 4 мая 2017 гю) – Махачкала АЛЕФ (ИП Овчинников М.А.), 2017 – ISBN 978–5–4242–0557–6 426с – С. 212–315
13. Потапов В.В. Коллоидный кремнезем в высокотепературном гидротермальном растворе. Владивосток: Дальнаука, 2003, С. 8–14, 27–33.
14. Потапов В.В., Зеленков В.Н. Распределение по размерам коллоидных частиц кремнезема в гидротермальном растворе. // Наночастицы в природе. нанотехнологии в приложении к биологическим системам: Материалы I Российского научно-методического семинара. М.: РАЕН, 2003. С. 38–52.
15. Потапов В.В., Аллахвердов Г.Р., Сердан А.А. (мл.), Мин Г.М., Кашутина И.А. Получение водных золей кремнезема мембранным концентрированием гидротермальных растворов. // Химическая технология. 2008. № 6. С. 14–22.
16. Потапов В.В., Зеленков В.Н., Горбач В.А., Кашпура В.Н., Мин Г.М. Извлечение коллоидного кремнезема из гидротермальных растворов мембранными методами – М.: РАЕН, 2006 – 228 с.
17. Потапов В.В., Зеленков В.Н., Кашпура В.Н., Горбач В.А., Мурадов С.Н. Получение материалов на основе нанодисперсного кремнезема гидротермальных растворов. – М.: РАЕН, 2010. – 296 с.
18. Зеленков В.Н., Потапов В.В. Биологическая активность соединений кремния. Часть 1. Природные и синтетические кремнийсодержащие соединения. Медико-биологические аспекты (обзор литературы). Вестник РАЕН, 2016, № 5, С. 9–15.
19. Зеленков В.Н., Потапов В.В. Биологическая активность соединений кремния. Часть 2. Аморфные наноразмерные кремнеземы: химико-технологические аспекты получения, применения и перспективы использования гидротермальных источников (обзор литературы)., Вестник РАЕН, № 1, 2018., с. 41–50.

УДК 504.05

ОЦЕНКА УРОВНЯ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВ ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИМИ АРОМАТИЧЕСКИМИ УГЛЕВОДОРОДАМИ В РАЙОНЕ БЫВШЕГО ШЛАМОНАКОПИТЕЛЯ ВБЛИЗИ РЕКИ СЕВЕРСКИЙ ДОНЕЦ

Т.С. Дудникова, С.Н. Сушкова, Т.М. Минкина, Е.М. Антоненко, Д.Г. Невидомская, А.И. Барбашев, И.П. Лобзенко, И.Г. Шпортун, Н.А. Дорохова

Южный федеральный университет, академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского, г. Ростов-на-Дону, Россия

Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) – класс высокомолекулярных соединений, характеризующийся наличием в своей структуре двух и более сконденсированных бензольных колец, практически нерастворимы в воде, имеют высокую температуру плавления. ПАУ образуются в результате пиролиза углеводородного материала в условиях недостатка кислорода. Техногенные ПАУ в окружающую среду попадают в результате несовершенства технологий химической, коксохимической, нефтедобывающей, угледобывающей промышленности, а также энергогенерирующих предприятий, работающих на угле и автотранспорта (Цибарт А.С., Геннадиев, 2013).

Во второй половине IX в. с предложенной выдающимся химиком своего времени А. Кекуле структурной формулой бензола (1865 г.), как простейшего звена ПАУ, справедливо будет начать историю изучения данных веществ. В последствии, в ближайшее десятилетие были открыты структурные формулы ряда ПАУ: нафталин (1866 г., Э. Эрленмейер), аценафтен (1866 г., М. Бертло), антрацен (1869 г. К. Греббе и К. Либерман), фенантрен (1872 г. К. Греббе и Г. Клейзер) и в целом теория о циклической структуре данных соединений была подтверждена к концу IX в (Хронология событий и открытий в химии…). Следующим «переломным» моментом в изучении ПАУ стали исследования болезни «рака трубочиста». Эксперимент на мышах 1922 г. (под руководством Э. Кенневея) показал, что каменноугольная смола тем более канцерогенна, чем больше в ней ПАУ и чем меньше в ней парофинов. В результате работы по выявлению конкретного канцерогенного вещества из каменноугольной смеси ПАУ стало достоверно известно о канцерогенной активности бенз(а)пирена (БаП) (исследования 1933 г.) и дибенз(а)антрацена (исследования 1929 г.) (История развития методов…). Однако, только в 1976 г. в работу был принят список приоритетных поллютантов США в который вошли 16 представителей группы ПАУ (OFR). В России на сегодняшний день принято нормировать 4 представителя ПАУ: аценофтен, пирен, фенантрен, БаП, для воздуха рабочей зоны и населенных мест (ГН 2.1.6.2309–07, ГН 2.2.5.686–98), а также БаП для водных объектов питьевого назначения и почвы (предельно допустимые концентрации (ПДК) БаП для почвы составляют 20 нг/г) (ГН 2.1.5.689–98, ГН 2.1.7.2041–06).

Научно-техническая революция середины XX в. и рост производительных мощностей предприятий стали возможны при освоении внешних, природных сил. Это привело не только к социально-экономическим и социально-культурным изменениям в жизни человека, но и к изменениям окружающей среды, которые, как правило, напрямую или косвенно оказывают негативное воздействие на живые организмы, в том числе человека. Одной из проблем современной экологии является образование геохимических аномалий. Следствием таких аномалий может стать миграция загрязняющих – вредных веществ в ткани живых организмов. Исключением не стали геохимические аномалии, содержащие опасные канцерогены из группы ПАУ.

Целью данного исследования являлась оценка уровня загрязнения почв ПАУ бывшего шламонакопителя, расположенного вблизи населенных пунктов и реки Северский Донец.

Объектом исследования выступили техногенно-нарушенные почвы, расположенные на территории бывшего озера Атаманское в пойме реки Северский Донец Каменск-Шахтинского района Ростовской области. С начала 60-х и до середины 90-х гг. XX в. годов озеро Атаманское использовалось в качестве резервуара для сброса промышленных стоков химических заводов. На данный момент озеро осушено и как накопитель шламов не используется и уже на протяжении более 30 лет является вторичным источником загрязнения (Рисунок 1) (Чаплыгин и др., 2018).

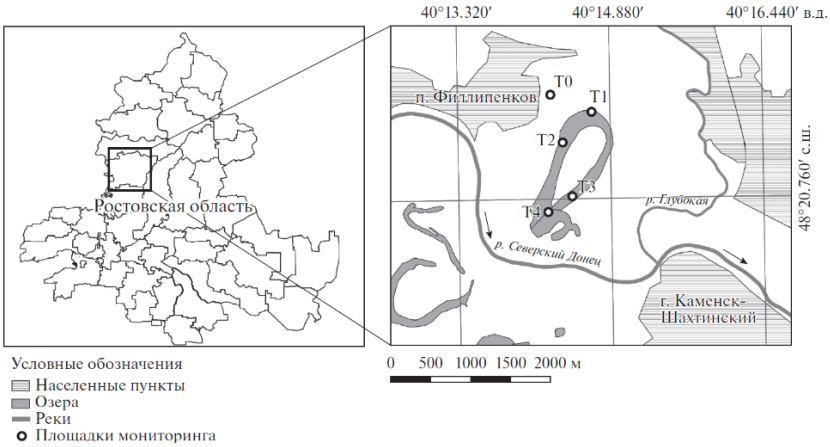


Рисунок 1 – Схема расположения мониторинговых площадок озера Атаманское

После осушения озера начали активно протекать процессы почвообразования вследствие чего можно классифицировать поверхность бывшего озера, как техногенно-нарушенные почвы. Неподалеку от бывшего шламонакопителя расположены: п. Филенков (1,9 км), Старая Станица (3,8 км), х. Красновка (3,2 км), г. Каменск-Шахтинский (4 км) с населенностью в белее чем 90 тыс. жителей по состоянию на 2017 г. (Каменск-Шахтинский…). Близкое расстояние до р. Северский Донец составляет (1,2 км), а также близкое залегание грунтовых вод к поверхности бывшего шламонакопителя вносит опасность миграции поллютантов. Ранее нашими коллегами были проведены исследования содержания ряда тяжелых металов: Zn (II), Cu (II), Pb (II), где общее их содержание в техногенно-трансформированных почвах бывшего озера превышает кларки в десятки раз (Minkina et al., 2018). К тому же, существуют исследования, свидетельствующие об увеличении на 50 % вероятности канцерогенеза при совместном воздействии тяжелых металлов и ПАУ (Gauthier et al., 2014), что вносит еще большую опасность для людей, проживающих в ближайших населенных пунктах.

Для проведения исследования были заложены 5 мониторинговых площадок: D1, D2, D3, D4, D0, где D0 (лугово-черноземная почва) являлась фоновой и находилась на расстояние 2 км от озера.

Отбор проб почвы был произведен методом конверта с каждой мониторинговой площадки в июле месяце 2018 г. на глубину 0–20 см (ГОСТ 17.4.4.02–84.). Транспортировка и хранение образцов происходило в портативном и далее в стационарном холодильном устройстве соответственно. Содержание ПАУ в почвах определяли во влажных образцах с учетом гигроскопической влаги. Извлечение ПАУ из почвенных образцов проходило в соответствии со стандартной методикой (РД 52.10. 556–95) в модификации, где мешающая липидная фракция удаляется посредству кипячения 1 г образца в 2-х % р-ре щелочи (КОН) с последующей трехкратной экстракцией ПАУ гексаном. Количественно определяли ПАУ в экстракте методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе Agilent 1260 с флуориметрическим детектированием.

В данном исследовании были количественно определены такие ПАУ как: нафталин, бифенил, аценофтен, аценофтилен, антрацен, фенантрен, флуорен, являющиеся низкомолекулярными и бенз(а)антрацен, флуорантен, хризен, пирен, БаП, бенз(k)флуорантен, бенз(b)флуорантен, дибенз(а)антрацен, бенз (g, h, i) перилен, являющиеся высокомолекулярными ПАУ. Все вышеперечисленные ПАУ за исключением бифенила входят в список приоритетных загрязнителей США.

В результате исследования было установлено высокое содержание ПАУ в почвах территории бывшего шламонакопителя (рис. 2) по сравнению с содержанием ПАУ в почве фоновой площадки (рис. 3).

Максимальное суммарное содержание ПАУ было зафиксировано в почве площадки D3 и составило 4229,4 ± 205,5 нг/г, что в 30 раз больше по сравнению с содержанием ПАУ в почве фоновой площадки T0 (140,4 ± 6,9 нг/г). Фоновое суммарное содержание ПАУ в почвах ООПТ «Персиановская заповедная степь», расположенная в Ростовской области не превышает 200 нг/г (Sushkova et al., 2018), что в сравнении с почвами мониторинговой площадки D0 входит в норму. В пользу этого утверждения можно предоставить исследования содержания ПАУ в почвах фоновых районов, где для черноземной зоны суммарное содержание ПАУ составляло около 100 нг/г (Геннадиев А.Н., Цибарт А.С., 2013).

Однако, преобладающий высокомолекулярный состав ПАУ в почве мониторинговой площадки D0 указывает на антропогенные происхождение исследуемой группы веществ (Abdel-Shafy et al., 2016).

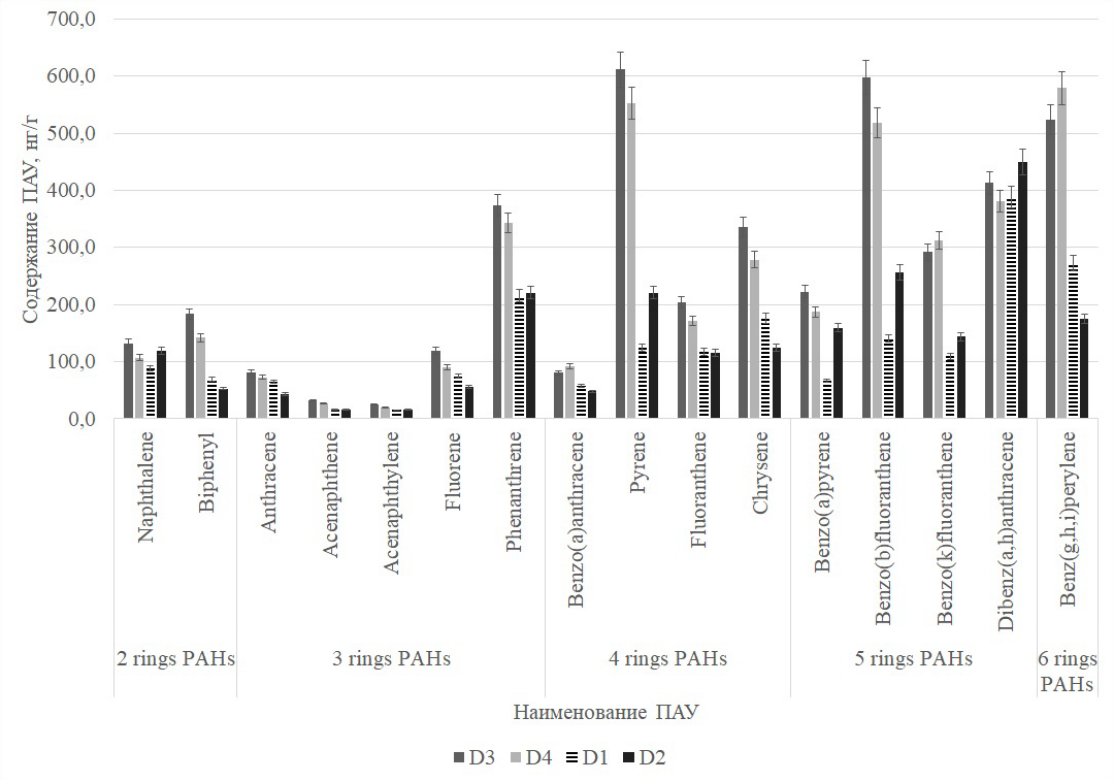


Рисунок 2. Содержание ПАУ в почвах озера Атаманского

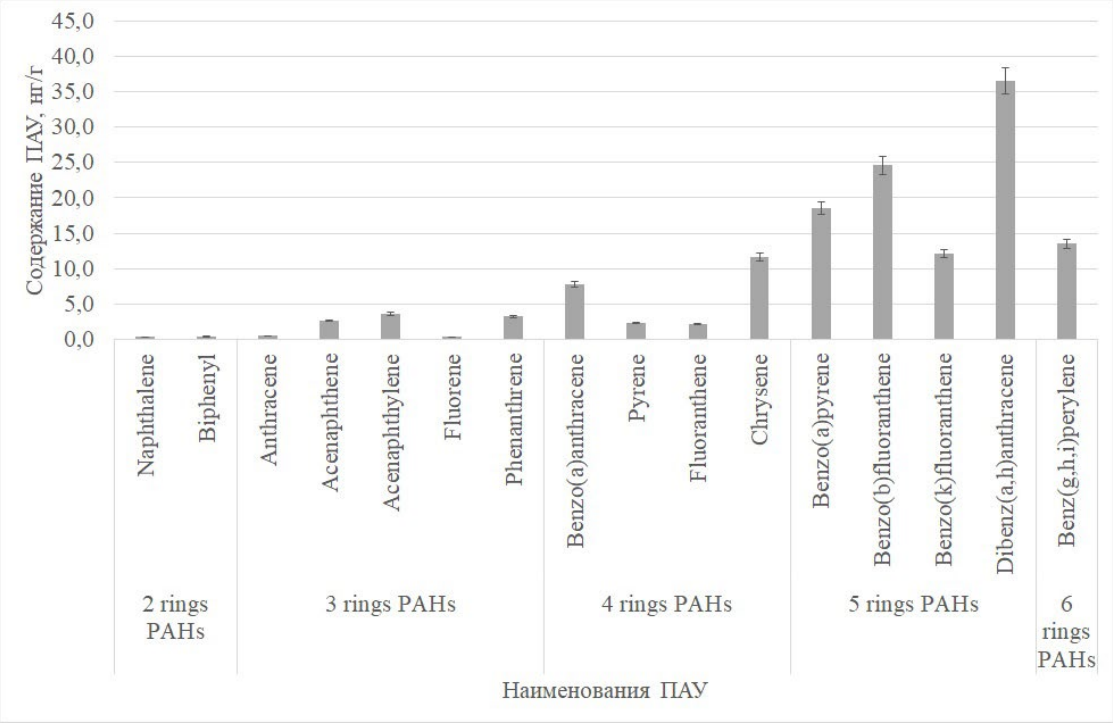


Рисунок 3. Содержание ПАУ в фоновой почве

ПДК БаП превышены в почвах всех мониторинговых площадок, расположенных в пределах бывшего озера и варьирует от 3,3 (D1) до 11,1 в почвах площадки D3. В почве фоновой мониторинговой площадки значение ПДК БаП находится в пределах нормы.

Определена разница в процентном содержании отдельных ПАУ почв озера Атаманского и фоновой почвой (таблица 1).

Таблица 1 – Процентное содержание ПАУ от суммарного содержания в почвах исследуемой территории

№	2-х кольчатые		3-х кольчатые					4-х кольчатые				5-ти кольчатые				6-ти кольчатые
	Нафталин	Бифенил	Антрацен	Аценофтен	Аценофтилен	Флуорен	Фенантрен	Бенз(а)антрацен	Пирен	Флуорантен	Хризен	Бенз(а)пирен	Бенз(b)флуорантен	Бенз(k)флуорантен	Дибенз (a, h) антрацен	Бенз (g, h, i) перилен
D1	4,5	3,5	3,2	0,8	0,8	3,7	10,7	2,9	6,3	5,9	8,8	3,3	7,0	5,5	19,4	13,7
D2	5,4	2,4	2,0	0,7	0,7	2,5	10,0	2,2	10,0	5,2	5,6	7,2	11,6	6,5	20,3	7,9
D3	3,1	4,3	1,9	0,8	0,6	2,8	8,8	1,9	14,5	4,8	7,9	5,3	14,1	6,9	9,8	12,4
D4	2,8	3,7	1,9	0,7	0,5	2,3	8,8	2,4	14,3	4,4	7,2	4,8	13,4	8,1	9,8	15,0
D0	0,3	0,3	0,4	1,9	2,6	0,3	2,3	5,5	1,7	1,6	8,3	13,2	17,5	8,6	26,0	9,6

Процентное содержание 2-х кольчатых ПАУ почвы фоновой площадки D0 значительно ниже, чем содержание их в почвах мониторинговых площадок, расположенных по площади озера. Количество фенантрена (в процентном содержании) в почвах площадок, принадлежащих озеру резко выше нежели его количество в фоновой почве. Процентное содержание аценофтена и аценофтилена в почвах фоновой площадки в 2–3 раза выше по сравнению с почвами мониторинговых площадок, расположенных по площади озера. Из низкомолекулярных ПАУ только флуорена в фоновой почве содержится процентно ниже в сравнении с остальным исследуемым почвенным ареалом. БаП в процентах от суммы выше в фоновой почве в 1,5–2,5 раза, содержание хризена варьирует примерно на одном уровне 5,6–8,3 %. Содержание бенз(а)антрацена и пирена процентно больше в почвах мониторинговых площадок, принадлежащих озеру. Содержание бенз(b)флуорантена и бенз(k)флуорантена процентно находится на одном уровне, однако процентное содержание их в почвах площадки D1 в 1,5–2 раза ниже. Выявлено увеличение процентного содержания дибенз (a, h) антрацена с уменьшением суммарного содержания ПАУ в почвах и снижение Бенз (g, h, i) перилена с снижением суммарного содержания ПАУ в исследуемых почвах. Установлены отличия в количественном составе отдельных ПАУ содержащихся в почве фоновой площадки D0 и средними количественными значениями процентного содержания отдельных ПАУ в почвах мониторинговых площадок, расположенных на территории бывшего шламосборника. Для почвы, отобранной с мониторинговых площадок, находящихся в пределах озера процентно от суммарного содержания в почве преобладают пирен, бенз(b)флуорантен, дибенз (a, h) антрацен и бенз (g, h, i) перилен (≈ 11–12 % от суммарного содержания ПАУ в почве). Исследуемые почвенные образцы с фоновой мониторинговой площадки малоразличимы по содержанию бенз (g, h, i) перилена (9,6 % от суммарного содержания ПАУ в почве), но имеют резкое отличие по пирену (1,7 % от суммы ПАУ) со средними значениями почвенных образцов отобранных с мониторинговых площадок принадлежащих бывшему озеру. Также, почвам фоновой площадки характерны большее по сравнению с почвами мониторинговых площадок территории озера процентное от суммарного содержания в почвебенз(b)флуорантена (17,5 %) и дибенз (a, h) антрацена (26,0 %).

Таким образом, проведенное исследование показало высокий уровень суммарного содержания ПАУ в почвах мониторинговых площадок, принадлежащих бывшему шламохранилищу. Наиболее загрязненной оказалась почва мониторинговой площадки Т3, где суммарное содержание ПАУ в почве в 30 раз выше, чем в почвах фоновой мониторинговой площадки. ПДК БаП превышено в 3,3 (D1) – 11,1 (D3) раз.

Содержание БаП в почвах фоновой площадки находится в пределах допустимых норм. Выявлены количественные отличия содержания отдельных ПАУ в почвах фоновой мониторинговой площадки в сравнении с почвой площадок, расположенных на территории бывшего шламонакопителя. Почвам фоновой мониторинговой площадки характерно большее процентное содержание ПАУ (от суммарного содержания ПАУ) дибенз (a, h) антрацена (26,0 %) и почвебенз(b)флуорантена (17,5 %) (средние значения их содержания в почвах озера варьирует от 12 до 13 %). Преобладание высокомолекулярных ПАУ в почвах всех мониторинговых площадках свидетельствует об антропогенном происхождении ПАУ.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РНФ № МК-2973.2019.4, РФФИ № 19–29–05265 мк.

ЛИТЕРАТУРА

Геннадиев А.Н., Цибарт А.С. Факторы и особенности накопления пирогенных полициклических ароматических углеводородов в почвах заповедных и антропогенно-измененных территорий // Почвоведение. – 2013. – №. 1. – С. 32.

ГН 2.1.5.689–98 Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования

ГН 2.1.6.2309–07 Ориентировочные безопасные уровни воздействия (ОБУВ) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест Гигиенические нормативы Москва – 2008

ГН 2.1.7.2041–06. Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в почве

ГН 2.2.5.686–98 Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны. Гигиенические нормативы

ГОСТ 17.4.4.02–84. Охрана природы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа (2008). М.: Стандартинформ, 8 с.

РД 52.10. 556–95 Методические указания. Определение загрязняющих веществ в пробах морских донных отложений и взвеси. Росгидромет, Государственный океанографический институт. – 11.10.2002.

Цибарт А.С., Геннадиев, А.Н. Полициклические ароматические углеводороды в почвах: источники, поведение, индикационное значение (обзор) // Почвоведение. – 2013. № 7. С. 788

Чаплыгин В.А., Манджиева С.С., Невидомская Д.Г., Литвинов, Ю.А., Минкина, Т.М., Черникова Н.П. Содержание тяжелых металлов в тростнике обыкновенном (Phragmites australis) техногенно загрязненного района поймы Северского Донца // Биогеохимия химических элементов и соединений в природных средах: материалы III Международной школы-семинара молодых исследователей. – 2018. С. 307–311.

Abdel-Shafy H.I., Mansour M.S. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation //Egyptian Journal of Petroleum. – 2016. № 25. С. 107–123. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011

Gauthier P.T., Norwood W.P., Prepas E.E., Pyle G.G. Metal–PAH mixtures in the aquatic environment: a review of co-toxic mechanisms leading to more-than-additive outcomes. //Aquatic toxicology. – 2014. № 154. С. 253–269. DOI: https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.05.026.

Minkina T.M., Linnik V.G., Nevidomskaya D.G., Bauer T.V., Mandzhieva S.S., Khoroshavin V.Y. Forms of Cu (II), Zn (II), and Pb (II) compounds in technogenically transformed soils adjacent to the Karabashmed copper smelter //Journal of soils and sediments. – 2018. № 18(6). С. 2217–2228. DOI: https://doi.org/10.1007/s11368–017–1708–2

Office of the Federal Registration (OFR) Appendix A: priority pollutants. Fed Reg. 1982; 47:52309.

Sushkova S., Minkina T., Deryabkina I., Mandzhieva S., Zamulina I., Bauer T., Kızılkaya, R. Features of accumulation, migration, and transformation of benzo [a] pyrene in soil-plant system in a model condition of soil contamination. //Journal of soils and sediments. – 2018. № 18(6). С. 2361–2367. ISSN: 1439–0108

http://docplayer.ru/73496479–1-spektrofluorescentnyy-metody-analiza.html История развития методов и приборов контроля смолистых веществ и полициклических ароматических углеводородов. 28.07.2019

http://www.physchem.chimfak.rsu.ru/Source/History/timeline3.html Хронология событий и открытий в химии. 28.07.2019

https://www.ipa-don.ru/municipalitys/1046 Каменсх-Шахтинский. 29.07.2019

УДК 575.174.015: 579.851: 579.26: 57.08: 579.6: 582.1: 628.3: 628.4

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АППАРАТА ВИХРЕВОГО СЛОЯ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТАНОВОГО СБРАЖИВАНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ

Ю.В. Литти*, Д.А. Ковалев**, А.А. Ковалев**, И.В. Катраева, А.Н. Ножевникова****

**ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия*
***ФНАЦ ВИМ, Москва, Россия*
****ННГАСУ, Нижний Новгород, Россия*

В настоящее время в России ежегодно образуется около 30 млн. т твердых коммунальных отходов (ТКО) и 20 млн. т осадков сточных вод (ОСВ), которые практически полностью (на 97 %) захораниваются на полигонах ТКО. Площадь, занимаемая полигонами ТКО в России, превышает 40 000 га и ежегодно увеличивается на 2.5–4 % (Харитонова и Корнилаев, 2005). Несмотря на наличие ряда программ по развитию и реконструкции полигонов, большинство из них не соответствуют современным стандартам и являются экологически опасными объектами.

Анаэробное метановое сбраживание является наиболее перспективным способом переработки органических отходов, т. к. позволяет стабилизировать органическое вещество отходов, а также получить полезные продукты в виде биогаза и биоудобрения. Деградация органического вещества в анаэробных условиях – это микробиологический процесс, который включает в себя четыре основные стадии: гидролиз, брожение (кислотогенез), ацетогенез и метаногенез. Многие исследователи сходятся во мнении, что гидролиз является основной лимитирующей стадией всего процесса. Скорость гидролиза полимеров с образованием мономеров существенно зависит от соотношения площади к объему частиц субстрата, что обуславливает их доступность для гидролитических микроорганизмов, которым необходим непосредственный контакт с поверхностью гидролизуемых веществ.

ТКО на 50–60 % состоит из органической фракции (ОФ-ТКО) – из которой около половины представлено биоразлагаемыми компонентами (Ножевникова с соавт., 2016). ОФ-ТКО – гетерогенная масса с неравномерным, трудно контролируемым составом с преобладанием крупных фракций. ОСВ состоят из первичного осадка и избыточного активного ила. Активный ил – сложный комплекс, состоящий из клеток микроорганизмов с плотной клеточной стенкой, неорганических включений и внеклеточных полимерных веществ, объединенных во флокулы (Козлов с соавт., 2012). Наличие крупных частиц ОФ-ТКО и высокая устойчивость флокул активного ила к биодеградации негативно влияет на характеристики анаэробного сбраживания и часто приводит к необходимости увеличения времени удержания в анаэробных реакторах, низкой степени разложения органического вещества и невысокому выходу метана.

Для увеличения биодоступности и эффективности массообмена между частицами органического отхода и гидролитическими микроорганизмами целесообразно проводить его предварительное измельчение. В работе был использован новый, перспективный способ предобработки в аппарате вихревого слоя (АВС). АВС представляет собой трубу, помещенную вместо ротора в статор асинхронного электродвигателя. В трубе на обрабатываемую смесь воздействуют электромагнитное поле, создаваемое обмотками статора, и интенсивно и хаотично двигающиеся ферромагнитные тела, создающие вихревой слой. В этом слое реализуются все возможные механические виды воздействия на измельчаемый материал: удар, истирание, кавитация, даже происходит электролиз, если в системе есть вода. АВС в настоящее время считается одним из наиболее эффективных оборудований для измельчения. По сравнению с вибро- и шаровыми мельницами, удельная мощность АВС выше на несколько порядков, а энергоэффективность, за счет отсутствия узлов трения – в 3–5 раз (http://apparat-nn.ru/). Хотя АВС известны в промышленности достаточно давно, возможность их применения для предобработки органических отходов и повышения эффективности метанового сбраживания ранее практически не изучалось.

Целью работы было исследовать влияние предобработки осадков сточных вод и органической фракции ТКО на эффективность последующего метанового сбраживания. Эффективность предобработки в АВС и метанового сбраживания оценивали, соответственно, по изменению гранулометрического состава отхода и кинетических параметров процесса.

Исследования проводили на экспериментальной установке – АВС (Рис. 1), которая работала следующим образом: в емкость исходного субстрата (8) загружался органический отход, с помощью насоса (7) смесь с расходом 2 л/мин прокачивалась через рабочую камеру (2). Под действием вращающегося магнитного поля, создаваемого индуктором (1), ферромагнитные частицы (истираемый рабочий орган), расположенные в камере, совершали интенсивные колебательные и вращательные движения. Частота вращения магнитного поля составляла 80 Гц. Обработанный органический отход через патрубок выгрузки 4 сливался в емкость 9.

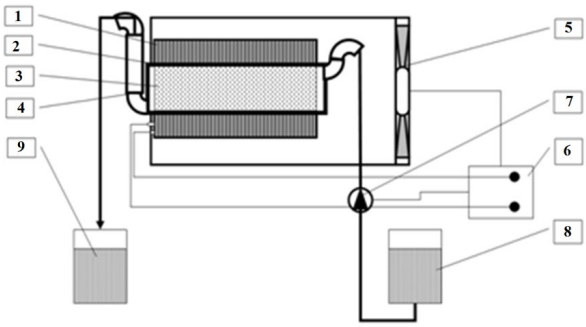


Рисунок 1 – Технологическая схема экспериментальной установки – аппарат вихревого слоя (АВС): 1 – индуктор; 2 – рабочая камера; 3 – стальные иглы; 4 – патрубок выгрузки; 5 – вентилятор воздушного охлаждения; 6 – шкаф управления с частотным преобразователем; 7 – перистальтический насос; 8 – емкость исходного субстрата; 9 – емкость обработанного продукта

В качестве объектов исследования использовали ОСВ Люберецких очистных сооружений (г. Москва) и модель ОФ-ТКО. Для обеспечения постоянства состава, в качестве ОФ-ТКО использовали комбикорм К-65. Продолжительность обработки ОСВ и ОФ-ТКО в АВС составляла 0, 37.5, 75, 150 и 300 секунд (сек). Анаэробное сбраживание проводили при постоянном перемешивании в термостатируемом шейкере в термофильных условиях (55 °С), во флаконах объёмом 120 и 250 мл, в которых около половины объема занимала сбраживаемая масса, а вторая половина приходилась на газовую фазу. Все эксперименты ставили в 2-х повторностях, в том числе и контроль (инокулят с добавлением воды вместо субстрата).

Гранулометрический состав ОСВ и ОФ-ТКО до и после обработки определяли с помощью лазерного дифракционного анализатора размеров частиц «Shimadzu SALD-2300» (Япония). На рисунке 2 показаны дифференциальные функции распределения (F, %) частиц по размерам для образцов с разной продолжительностью обработки.

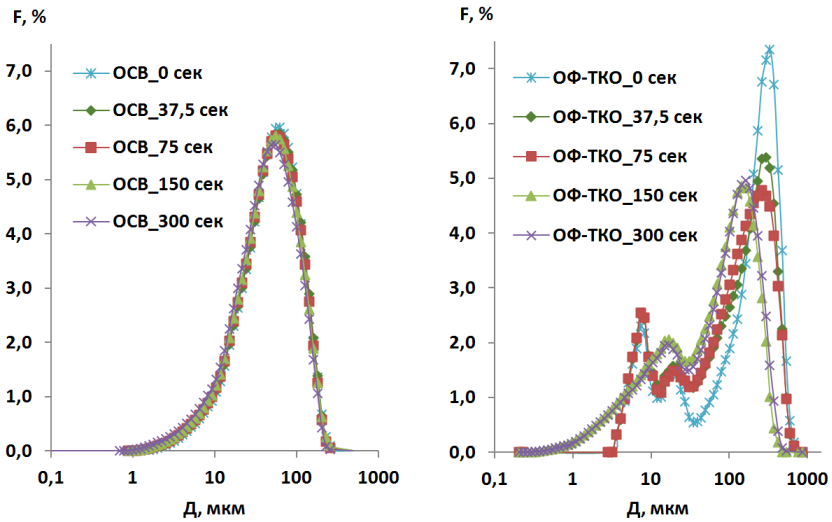


Рисунок 2 – Зависимость гранулометрического состава ОСВ (слева) и ОФ-ТКО (справа) от продолжительности обработки в аппарате вихревого слоя

Размер частиц, содержащихся в необработанной ОФ-ТКО, составлял от 3.6 мкм до 675 мкм, наибольшее количество частиц имели диаметр 293–330 мкм. В результате обработки в АВС происходило значительное измельчение, в частности после обработки в течение более 150 сек минимальный и максимальный размеры частиц ОФ-ТКО снижались до 0.3 и 532 мкм, соответственно. Также снижался диаметр, который имели наибольшее количество частиц ОФ-ТКО, до 260–330 мкм, 231–293 мкм, 143–182 мкм и 127–182 мкм, соответственно, при продолжительности обработки 37.5, 75, 150 и 300 сек.

Размер частиц, содержащихся в необработанном ОСВ, составлял от 1 мкм до 260 мкм, наибольшее количество частиц имели диаметр 55–70 мкм. После обработки в АВС происходило ожидаемое, но не столь значительное измельчение флокул ОСВ, как при обработке ОФ-ТКО. Наибольшее снижение размера частиц наблюдали после обработки в течение 300 сек, при этом минимальный и максимальный размеры ОСВ снижались до 0.68 и 230 мкм, соответственно. Также снижался диаметр, который имели наибольшее количество частиц ОСВ, до 50–70 мкм, 49–65 мкм, 49–62 мкм и 43–62 мкм, соответственно, при продолжительности обработки 37.5, 75, 150 и 300 сек.

В качестве основных показателей гранулометрического состава использовали медианный диаметр Д50 (средний диаметр, по отношению к которому одна половина всех частиц ОСВ по массе будет крупнее, а другая – мельче) и диаметр Д90 (диаметр, по отношению к которому 90 % всех частиц пробы по массе будут мельче). При обработке ОФ-ТКО в АВС происходило значительное снижение параметров Д50 и Д90, однако снижение происходило неравномерно (табл. 1). Так, в расчете на продолжительность обработки, снижение Д50 и Д90 было максимальным при обработке ОФ-ТКО в АВС в течение 37.5 и 150 сек.

В ходе обработки ОСВ в АВС происходило уменьшение как среднего (на 6 мкм или 11.5 % при 300 сек), так и максимального (на 9 мкм или 6.4 % при 300 сек) размеров частиц (табл. 1). Следует, однако, отметить, что при использованном режиме работы АВС снижение размеров частиц ОСВ происходило не так значительно, как в случае с ОФ-ТКО. Вероятно, это связано с изначально более мелкими частицами, содержащимися в ОСВ, а также более высокой устойчивостью частиц, в частности флокул активного ила, к механическому измельчению за счет ударного воздействия.

Таким образом, эффективность снижения размеров частиц органических отходов в результате обработки в аппарате вихревого слоя значительно зависит от начального размера частиц. При этом, чем больше начальные размеры частиц, тем более эффективным будет измельчение.

Таблица 1. Зависимость параметров Д50 и Д90 от продолжительности обработки ОСВ и ОФ-ТКО в аппарате вихревого слоя (АВС)

Время обработки в АВС, сек	ОСВ_Д50, мкм	ОСВ_Д90, мкм	ОФ-ТКО_Д50, мкм	ОФ-ТКО_Д90, мкм
0	47.5	116.6	183.2	385.4
37.5	47.1	117.1	118.3	346.0
75	45.8	114.2	112.1	338.5
150	44.8	113.2	67.2	207.6
300	42.0	109.1	69.9	209.2

Результаты эксперимента по метаногенному сбраживанию ОСВ и ОФ-ТКО представлены на рисунке 3. В начальные 5–7 суток эксперимента во флаконах с образцами ОСВ и ОФ-ТКО, обработанными в АВС, наблюдалась более высокая скорость образования метана, чем в необработанных образцах (ОСВ_0 сек и ОФ-ТКО_0 сек), причем наиболее заметной разница была в эксперименте с ОФ-ТКО. Небольшое накопление летучих жирных кислот (ЛЖК) происходило во всех флаконах, кроме инокулята, однако их суммарная концентрация не превышала 0.7 г./л и снижалась до 0.3 г./л после 4–7 суток эксперимента, что свидетельствовало о стабильной работе метаногенного сообщества, содержавшегося в исходном инокуляте (Angelidaki and Sanders, 2004). Из рисунка 3 видно, что конечный выход метана был практически одинаковым независимо от времени обработки в АВС и составлял 290–300 и 316–340 мл CH_4/г ОВ субстрата, соответственно, для ОСВ и ОФ-ТКО. В то же время, содержание метана в биогазе, характеризующее его теплотворную способность, увеличивалось после обработки субстратов в АВС, и было максимальным при наиболее длительной обработке (табл. 2). Так, при продолжительности обработки ОСВ и ОФ-ТКО в АВС в течение 300 сек, среднее содержание CH_4 в биогазе увеличивалось на 6.4 и 6.3 %, соответственно.

Степень разложения органического вещества ОСВ и ОФ-ТКО после обработки в АВС увеличилась в среднем на 8.5 и 15.7 % (табл. 3). Более эффективное разложение органического вещества обработанной ОФ-ТКО, по всей видимости, напрямую связано с лучшим измельчением в АВС (табл. 1).

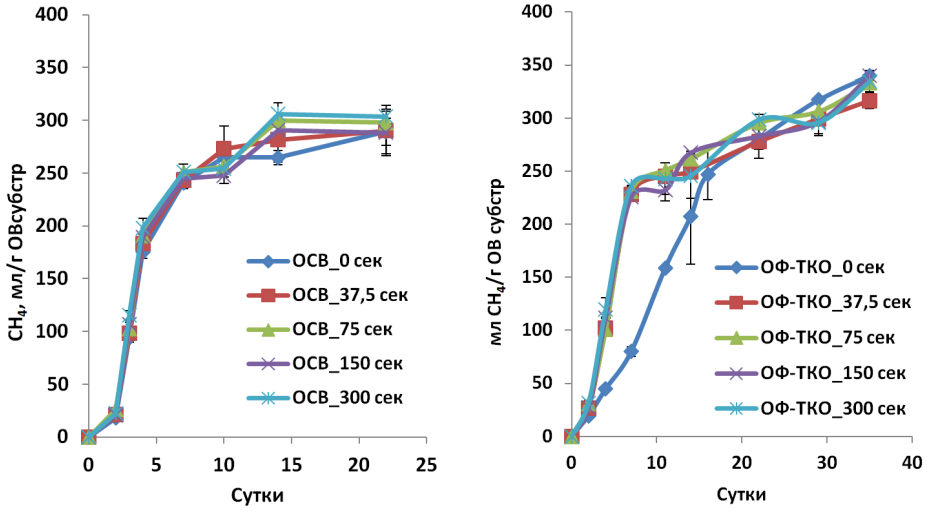


Рисунок 3 – Динамика образования метана в процессе термофильного сбраживания ОСВ (слева) и ОФ-ТКО (справа), измельченных в АВС при разной продолжительности обработки.

Исследование кинетики метаногенеза проводили путем внесения экспериментальных данных по образованию метана в модифицированное уравнение Гомперца (МУГ) (1) и уравнение первого порядка (УПП) (2),

$$P_{МУГ} = \gamma \exp\left(-\exp\left(\frac{K(\lambda - t)e^{1}}{\gamma} + 1\right)\right) \quad (1)$$

$$P_{УПП} = P_{макс}(1 - \exp(-kt)) \quad (2)$$

где $P_{МУГ}$ и $P_{УПП}$ – кумулятивное производство метана (л/г ОВ субстрата) за время t, γ – потенциальный выход метана (л/г ОВ субстрата), K – максимальная скорость выхода метана (л / (г ОВ сутки)), λ – продолжительность лаг-фазы (сутки), t – время, при котором рассчитывается кумулятивный выход метана (сутки), $P_{макс}$ – максимальный выход метана (мл/г ОВ), k – константа гидролиза (сутки$^{-1}$).

В таблице 2 представлены основные кинетические константы образования метана из ОСВ и ОФ-ТКО. В качестве параметра для оценки общей продолжительности процесса анаэробного сбраживания использовали время, необходимое для получения 90 % потенциального выхода метана ($T_{90\%}$). Параметр $T_{90\%}$ можно использовать для оценки времени удержания в анаэробных реакторов, работающих в непрерывном режиме, а также для прогнозирования эффективности биоконверсии органического вещества в биогаз, скорости образования и удельного выхода метана (Mao et al., 2017). Если вычесть из $T_{90\%}$ лаг-фазу (λ), то можно определить эффективную продолжительность метаногенного разложения органического отхода ($T_{эфф.}$), т. к. лаг-фаза в непрерывном процессе практически отсутствует.

Из данных, представленных в таблице 3, видно, что МУГ (ур. 1) и УПП (ур. 2) с высокой достоверностью описывают процесс термофильного анаэробного сбраживания ОСВ и ОФ-ТКО, о чем говорит высокое значение коэффициента корреляции R^2 (0.93–1.00). Потенциальный выход метана γ при обработке ОСВ в АВС немного увеличивался, в среднем на 3 %, при этом какой-либо корреляции увеличения параметра от времени обработки в АВС не наблюдалось. В то же время, параметр γ, рассчитываемый с помощью МУГ (ур. 1), в эксперименте с ОФ-ТКО снижался в среднем на 9.3 % после обработки в АВС, причем с увеличением продолжительности обработки в АВС этот параметр немного увеличивался.

Максимальная скорость метанообразования (K) из ОСВ положительно коррелировала со временем обработки в АВС, причем наибольший рост параметра K наблюдался при обработке в течение 150 сек и более (на 10–13 %). После обработки ОФ-ТКО в АВС происходил более, чем 2-х кратный рост параметра K. Интересно, что увеличение продолжительности обработки ОФ-ТКО более 37.5 сек практически не влияло на рост максимальной скорости метанообразования.

Лаг-фаза процесса (λ), обусловленная адаптацией инокулята к «ударной» нагрузке по ОВ в самом начале эксперимента, проводившегося в периодическом режиме, слабо зависела от наличия и времени предобработки ОСВ в АВС, и составляла в среднем 1.83 суток. Вследствие лучшего измельчения, лаг-фаза в эксперименте с ОФ-ТКО уменьшалась тем сильнее, чем дольше происходила предварительная обработка в АВС. Так, после 300 сек обработки ОФ-ТКО в АВС, снижение λ составило почти 62 % (на 1.5 суток).

Время $T_{90\%}$, составляло от 5.73 до 6.45 суток и несколько увеличивалось при обработке ОСВ в АВС. Такая же зависимость наблюдалась и для параметра $T_{эфф.}$, получаемого после вычета лаг-фазы λ из $T_{90\%}$. Частичное механическое разрушение флокул активного ила, вероятно, привело к выделению в среду слаборастворимых и, возможно, трудноразлагаемых в анаэробных условиях внеклеточных полимерных соединений. Это подтверждается тем, что процесс метаногенеза из образцов ОСВ, обработанных в АВС в течение 75, 150 и 300 с, имел 2 выраженные фазы, до 7-х и после 10-х суток эксперимента, между которыми образования метана не наблюдалось (рис. 3, слева).

В то же время, параметры $T_{90\%}$ и $T_{эфф}$ после обработки ОФ-ТКО в АВС снижались значительно, более чем в 2 раза (табл. 2). При этом, с увеличением продолжительности обработки ОФ-ТКО параметры $T_{90\%}$ и $T_{эфф}$ несколько увеличивались (на 1 и более суток), что вероятно также связано с выделением в среду трудноразлагаемых органических соединений, как и в случае с ОСВ. Попадание в сбраживаемую смесь частиц металла вследствие механического разрушения игл в рабочей камере (рис. 1) также могло оказать влияние на рассчитываемые параметры.

Таблица 2 – Зависимость характеристик и кинетических параметров процесса анаэробного сбраживания ОСВ и ОФ-ТКО от продолжительности обработки в аппарате вихревого слоя (АВС)

Параметр	Единица измерения	Время предобработки ОСВ в АВС, сек					Время предобработки ОФ-ТКО в АВС, сек				
		0	37.5	75	150	300	0	37.5	75	150	300
Удаление ОВ субстрата	%	38.1	39.5	40	40.3	41.5	56	64.6	59.9	70.4	64.2
pH конечное	–	7.69	7.53	7.37	7.33	7.35	7.06	6.94	6.64	6.94	6.9
CH_4 в метане	%	76.2	79.5	79.2	76.2	83.1	58.8	60.6	61.2	62.1	62.5
Модифицированная модель Гомперца											
γ	мл CH_4/г ОВ	268.5	275.9	280	270.2	281.5	339.1	285.1	311.5	312.4	321.4
K	мл CH_4/(г ОВ сутки)	83.1	83.7	85.4	91.5	93.9	18.5	41.4	39.2	41	38.8
λ	сутки	1.88	1.82	1.78	1.85	1.81	2.42	1.46	1.21	1.22	0.93
$T_{90\%}$	сутки	5.74	6.1	6.34	5.82	6.45	24.3	9.7	10.7	10.3	10.8
$T_{эфф}$	сутки	3.86	4.27	4.57	3.96	4.64	21.9	8.2	9.5	9.1	9.9
R^2	–	0.99	0.99	0.98	0.98	0.98	1.00	0.97	0.97	0.97	0.97
Модель первого порядка											
k	сутки$^{-1}$	0.21	0.21	0.21	0.22	0.22	0.067	0.153	0.146	0.150	0.157
R^2	–	0.93	0.93	0.93	0.93	0.93	0.98	0.96	0.96	0.96	0.97

Константа гидролиза k, полученная из кинетической модели первого порядка (ур. 2), использовалась для оценки пригодности ОСВ и ОФ-ТКО для анаэробного сбраживания и оценки стадии, ограничивающей скорость процесса. Чем выше константа k, тем лучше идет процесс анаэробного сбраживания. Из представленных в таблице 2 данных видно, что k практически не зависела от времени обработки ОСВ в АВС, однако значительно (в 2.2–2.3 раза) увеличивалась после обработки ОФ-ТКО в АВС.

В целом, можно сделать вывод, что эффективность измельчения органических отходов, таких как ОСВ и ОФ-ТКО, в аппарате вихревого слоя значительно зависит от начального размера частиц; чем больше начальные размеры, тем более эффективным будет измельчение. Осадки сточных вод состоят из небольших частиц, поэтому влияние обработки в АВС (при использованных в работе технологических режимах) на эффективность анаэробного сбраживания ОСВ было минимальным. В то же время, предобработка ОФ-ТКО в АВС приводила к значительному улучшению характеристик анаэробного сбраживания, описываемых кинетическими константами метаногенеза. Следует отметить, что целесообразным представляется обработка ОФ-ТКО в АВС не более 0.5 минут (≈ 37.5 сек), так как при более длительной обработке характеристики процесса анаэробного сбраживания улучшались незначительно.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18–29–25042.

ЛИТЕРАТУРА

Харитонова Н.В., Корнилаев Е.М. Оценка воздействия полигонов захоронения ТБО на подземные воды: сб. докл. 4-го Межд. конгр. по управлению отходами «ВейстТэк-2005». Москва, 31 мая – 3 июня 2005 г.

Биотехнология и микробиология анаэробной переработки органических коммунальных отходов: коллективная монография / общая ред. и составл. А.Н. Ножевниковой, А.Ю. Каллистова, Ю.В. Литти, М.В. Кевбрина; – М.: Университетская книга, 2016. – 320 с., ISBN 978–5–98699–166–5

Козлов М.Н., Дорофеев А.Г., Асеева В.Г. Микробиологический контроль активного ила биореакторов очистки сточных вод от биогенных элементов // Москва: Наука. 2012. 80 с.

Веб-сайт фирмы ООО АППАРАТ-НН (http://apparat-nn.ru/)

Angelidaki I. and Sanders W. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants // Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 2004. V.3. 117–29.

Mao C., Zhang T., Wang X., Feng Y., Ren G., Yang G. Process performance and methane production optimizing of anaerobic co-digestion of swine manure and corn straw // Scientific reports. 2017. 7: 9379. 31–9.

УДК 620.193.81

ВОЗДЕЙСТВИЕ ТИОНОВЫХ И НИТРИФИЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ НА МЕТАЛЛИЧЕСКИЕ МОДЕЛЬНЫЕ ПЛАСТИНЫ

М.С. Петрова[1], Г.Г. Няникова[1], М.А. Майорова[2]

[1] Санкт-Петербургский государственный технологический университет, Санкт-Петербург, Россия
[2] АО «ВНИИ гидротехники им. Б.Е. Веденеева, Санкт-Петербург, Россия

Биоповреждения материалов и сооружений является серьезной экологической и технологической проблемой. Так, при эксплуатации гидротехнических сооружений (ГТС) происходит деградация поверхности бетонных и железобетонных конструкций ГТС не только под воздействием физических и химических факторов, но и в результате жизнедеятельности микроорганизмов. Микробному заселению способствуют влажная среда, шероховатость поверхности конструкций и др. Биоповреждениям подвержены практически все материалы, в том числе металлы, бетоны, полимеры, композиционные материалы на основе различных связующих. Под воздействием микроорганизмов на поверхности металлических конструкций образуются значительные по объему отложения продуктов коррозии.

Наиболее значимым недостатком существующих методов изучения коррозионной активности является длительность и различные условия (лабораторные и натурные) проведения испытаний, затрудняющие сопоставление результатов. Также очень важно для оценки результатов испытаний на биостойкость, проводимых в лабораторных и климатических условиях, учитывать процессы старения материалов, которые проходят одновременно с биоповреждениями [1].

К наиболее коррозионно-активным микроорганизмам относятся тионовые (сероокисляющие), сульфатредуцирующие, нитрифицирующие, железоокисляющие, аммонифицирующие [2].

Целью данной работы было исследовать коррозионную активность бактерий, выделенных из проб воды и грунта, отобранных в Финском заливе вблизи комплекса защитных сооружений (КЗС). Объектами исследования служили образцы конструкционной стали марки Ст-20.

В стерильные пластиковые чашки размером 24 х 24 см заливали агаризованную питательную среду. Для культивирования тионовых бактерий использовали селективную среду Бейеринка, г/л: $Na_2 S_2 O_3 \times 5H_2 O$ – 5,0; $NH_4 Cl$ – 0,1; $NaHCO_3$ – 1,0; $Na_2 HPO_4 \times 12H_2 O$ – 0,2; $FeSO_4 \times 7H_2 O$ – 0,01, агар-агар – 20; pH = 9,2. Для культивирования нитрифицирующих бактерий использовали селективную среду Виноградского, г/л: $(NH_4)_2 SO_4$ – 2,0; $K_2 HPO_4 \times 12H_2 O$ – 1,0; $MgSO_4$ – 0,5; $FeSO_4 \times 7H_2 O$ – 0,01; NaCl – 2,0; $CaCO_3$ – 1,0, агар-агар – 20; pH = 7,5. После застывания среды делали посев из накопительных культур тионовых и нитрифицирующих микроорганизмов, выделенных ранее из проб воды и грунта Финского залива вблизи КЗС [3]. На поверхность среды выкладывали предварительно обработанные над пламенем горелки пластины, по 3 в каждую чашку. Чашки помещали в термостат при температуре 28 °С и выдерживали в течение двух месяцев, каждую неделю визуально оценивали рост микроорганизмов и характер коррозионных процессов.

Первые признаки коррозионного процесса были выявлены через неделю после начала инкубирования, причем в образцах с тионовыми бактериями он был более выражен. Через 3 недели признаки коррозионной деятельности микроорганизмов были более заметны и через 2 месяца можно было наблюдать ярко выраженную коррозионную активность тионовых бактерий (рис. 1) и менее выраженную коррозионную деятельность нитрифицирующих бактерий (рис. 2).

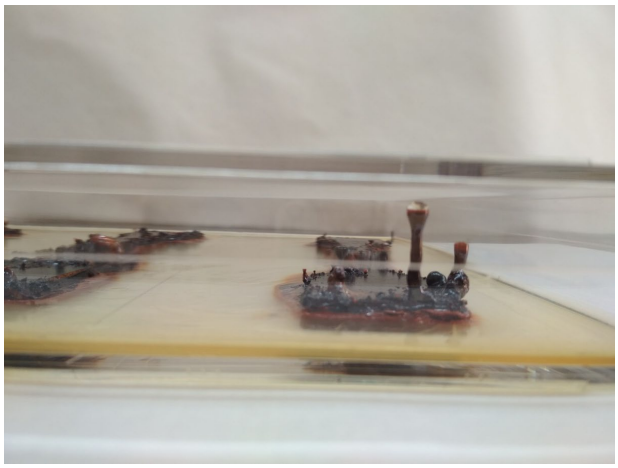


Рисунок 1 – Наросты, образовавшиеся на пластинах конструкционной стали СТ-20 под действием тионовыми бактерий (через 60 сут. после посева)



Рисунок 2 – Пластины конструкционной стали СТ-20 в присутствии нитрифицирующих бактерий (через 60 сут. после посева)

Таким образом, можно сделать вывод о том, что культура тионовых бактерий обладает более выраженной в сравнении с нитрифицирующими микроорганизмами коррозионной активностью в отношении конструкционных материалов, таких, как конструкционная сталь Ст-20.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18–29–05031/18 мк.

ЛИТЕРАТУРА

1 Анализ методов оценки биостойкости промышленных материалов (критерии, подходы) / Д.В. Кряжев [и др.] // Вестник Нижегородского ун-та им. Н.И. Лобачевского. – 2013, 2 (1). – С. 118–124.

2 Определение состава микробного сообщества, выделенного с поверхности типовых образцов материалов, экспонированных в прибрежной зоне Баренцева моря / Г.Г. Няникова [и др.] // Известия СПбГТИ (ТУ). – 2019, № 49 (75) – С. 102–108.

3 Выявление потенциально коррозионных микроорганизмов из проб воды Финского залива. В кн.: Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: тез. докл. XI междунар. науч. конф. / Петрова М.С. [и др.] // Минск: Белоруская навука. – 2019. – С. 263–264.

Актуальная биотехнология

№3 (30), 2019

УДК 606:577.151.5

ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ В СИЛИКАГЕЛИ ЖИВЫЕ КЛЕТКИ: МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОЛУЧЕНИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ

О.Н. Понаморева, В.А. Алферов

Тульский государственный университет, Тула, Россия

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы возрастает интерес к разработке новых функциональных материалов с использованием методов золь-гель химии, которая является характерной особенностью соединений кремния и некоторых других элементов этой группы периодической системы [1–3]. Преимущества золь-гель технологий заключаются в возможности получения необычной морфологии микро- и наноразмерных структур материалов, использовании экологически безвредных исходных веществ (предшественников, прекурсоров), мягкие условия синтеза и, в целом, экологически чистые технологии получения инертных и биосовместимых материалов [4]. При использовании в золь-гель синтезе дополнительных органических соединений и / или алкилзамещенных силановых прекурсоров образуются гибридные органо-неорганические материалы (ОРМОСИЛ, ормосилы) [5–6]. Сочетание силикатных материалов с биологическими компонентами привело к созданию биогибридных функциональных материалов, которые находят применение, прежде всего, в биотехнологии для разработки биокатализаторов, биореакторов, биофильтров, биосенсоров и др., в биомедицине и тканевой инженерии и других областях деятельности человека [7–9].

С развитием методов нанобиотехнологий появилось новое направление исследований по получению «живых» гибридных материалов, в которых в силикагели или ормосилы иммобилизованы живые клетки [10–11]. Важным аспектом в этих исследованиях является направленный синтез структур типа «клетка в оболочке», которые напоминают некоторые природные одноклеточные организмы – радиолярии и диатомовые водоросли, эволюционировавшие таким образом, чтобы сохранить свои виды от воздействия неблагоприятных жестких условий и защитить свой генетический материал с помощью твердой оболочки из кремнезема [12–13]. В течение последнего десятилетия самыми распространенными исследованиями в химии материалов является изучение новых стратегий самосборки молекул для формирования искусственной оболочки вокруг клеток, т. е. создание биомиметических структур, подобных клеткам диатомей, или, так называемых, «искусственных спор», которые, как и природные споры микроорганизмов, обладают особой стабильностью и защитой против вредных факторов (рис. 1) [14].

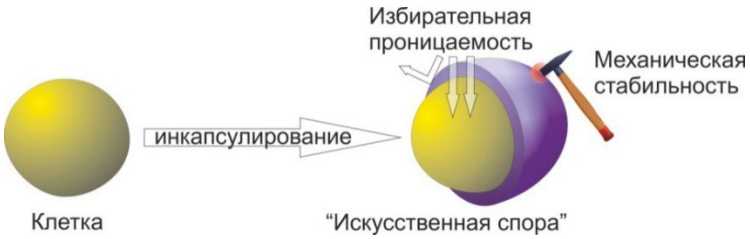


Рисунок 1. «Искусственные споры»: клетка заключена в тонкую прочную искусственную оболочку

В этом обзоре мы постарались представить ключевые моменты в развитии методических подходов для получения структур «клетка в оболочке» с использованием золь-гель химии кремния, что стало возможно с развитием методов нанабиотехнологий.

МЕХАНИЗМ И УСЛОВИЯ ФОРМИРОВАНИЯ СИЛИКАТНЫХ ЗОЛЬ-ГЕЛЬ МАТЕРИАЛОВ

Формирование золь-гель матриц на основе эфиров кремниевой кислоты включает процессы гидролиза исходных предшественников или прекурсоров (как правило, алкоксисиланов) и конденсации гидролизованных соединений – кремниевой кислоты или ее производных. На свойства образующегося геля влияют предшественники (алкоксисиланы и алкилалкоксисиланы), скорость гидролиза которых зависит от структуры и числа алкокси- и алкильных заместителей. В первой реакции, один или два силановых прекурсора (например, тетраметоксисилан $Si(OCH_3)_4$ (ТМОС) или метилтриметоксисилан $CH_3 Si(OCH_3)_3$ (МТМС)), гидролизуются в присутствии воды, в результате происходит формирование силанольных (Si-OH) групп (рис. 2 (1) и (2)) [15]. Поликонденсация гидролизованных производных приводит к образованию оксоалкоксопроизводных (рис. 2 (3)).

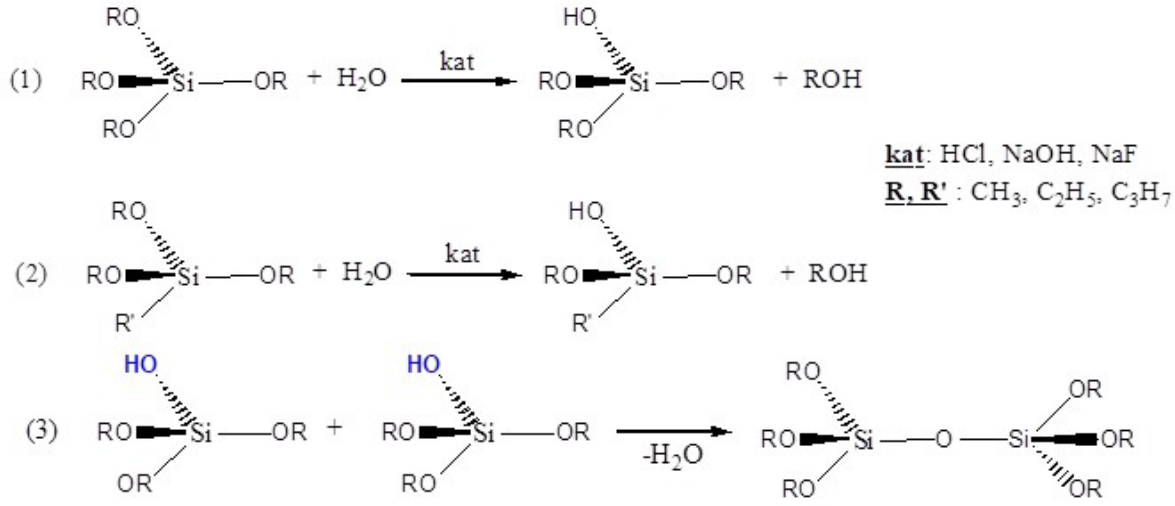


Рисунок 2. Схема реакций гидролиза и конденсации в ходе золь-гель синтеза силикагелей (ормосилов) из алкоксисиланов и алкилалкоксисиланов.

В результате получают высокодисперсный коллоидный раствор – золь. Увеличение концентрации дисперсной фазы приводит к появлению коагуляционых контактов между частицами и началу структурирования – гелеобразования (вторая стадия золь-гель процесса). В присутствии других молекул или частицы происходит их встраивание в структуру геля (рис. 3) [16].

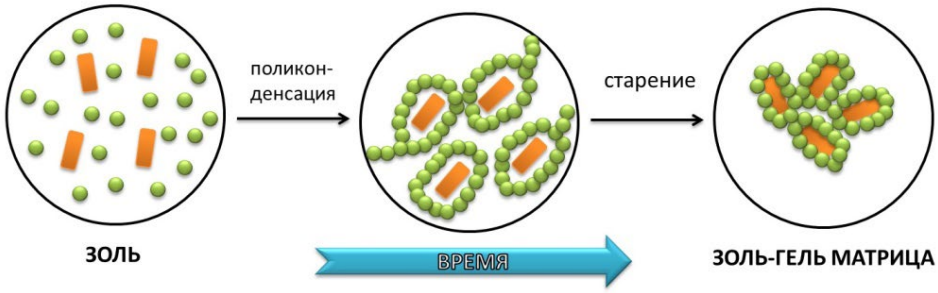


Рисунок 2. Схема формирования и уплотнения геля в присутствии биоматериала (биомолекул или клеток)

Характеристики отдельных золь-гель процессов связаны с рядом факторов, которые оказывают воздействие на скорость реакций гидролиза и конденсации (pH, температура и время реакции, концентрация реагентов, природа и концентрация катализаторов, H_2 O/Si молярное отношение). Таким образом, контролируя эти факторы, можно изменять структуру и свойства золь-гель производных неорганических сетей в широком диапазоне. При проведении реакции гидролиза в кислых условиях образуются линейные полимеры, что приводит к формированию кристаллического геля, а в присутствии основных катализаторов – разветвленные кластеры или коллоидные гели [17].

Для повышения стабильности структур, регулирования реологических свойств и управления процессами структурообразования на прочность контактов воздействуют путем создания в растворе пространственной структуры высокомолекулярного органического полимера (полиэтиленгликоля (ПЭГ), поливинилового спирта (ПВС), поливинилпирролидона (ПВП) и др.) [18]. Такие системы обладают высокой пластичностью и практически неограниченной седиментационной устойчивостью [19]. Гидрофильные полимеры выступают в роли структурообразующих агентов (СА), как показано на рисунке 3 [20].

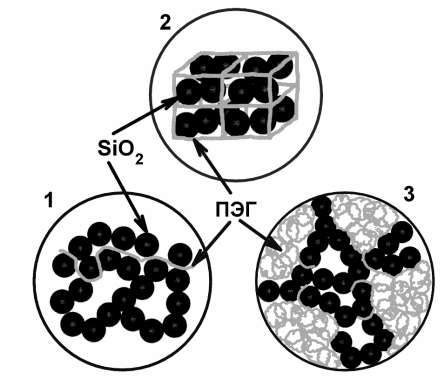


Рисунок 3. Схематическое представление системы SiO2-ПЭГ, где черные сферы частицы диоксида кремния, серые кривые – макромолекулы ПЭГ 1 – низкомолекулярные ПЭГ; 2 – образование флуктуационной сетки; 3 – кластерная структура

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ В СИЛИКАГЕЛИ

Попытки иммобилизовать живые клетки в силикатные материалы, чтобы имитировать процессы окаменения, предпринимались в семидесятые годы прошлого века неоднократно. Однако первое сообщение по целенаправленной иммобилизации клеток в золь-гель материалы было сделано только в конце 80-х годов [21]. В этой работе исследовалась инкапсуляция дрожжей Saccharomyces cerevisiae в силикагель. В выводах указывались основные проблемы, с которыми столкнулись исследователи: негативное влияние этанола, образующегося в ходе гидролиза предшественника (тетраэтоксисилана, ТЭОС) и добавляемого в реакционную смесь, и уменьшения внутренней поверхности геля на жизнеспособность клеток, особенно в ходе «старения» геля, что отражалось на долговременном сохранении жизнеспособности микроорганизмов. Следует отметить, что выбор спиртовых дрожжей был неслучайным, поскольку, в целом, решалась проблема жизнеспособности микроорганизмов в присутствии этанола. После более чем двадцатилетних исследований многие обозначенные выше проблемы в значительной степени разрешены.

Так, для улучшения механических свойств силикатной матрицы предложено использовать наряду с алкосиланами органомодифицированные силановые прекурсоры, так называемые, гидрофобные добавки, – метилтриэтоксисилан и диметилдиэтоксисилан [22]. Применение в ходе иммобилизации клеток дополнительно органических и природных соединений (например, глицерина), гидрофильных полимеров позволило создать биосовместимое окружение для живых клеток [23]. Гидрофильные полимеры участвуют в формировании структуры геля в целом, т. е. выступают в качестве СА. Параллельно были предприняты усилия для расширения разнообразия живых организмов, которые могут быть захвачены в силикатные золь-гель материалы, включая почти все типы клеток от прокариот (бактерии, цианобактерии, но не архебактерии) до эукариот (грибов, растительных и животных клеток) [10]. Так, в работе [24] иммобилизацию бактерий Escherichia coli проводили в присутствии глицерина, который, как полагают авторы, формировал гидрофильную оболочку вокруг бактерий, препятствующую взаимодействию кремниевых кислот с поверхностью клетки. Развитие этого направления можно проиллюстрировать исследованиями по иммобилизации бактерий (анаэробных и участвующих в спиртовом брожении) по технологии, как ее назвали авторы, «рыбка в сетях». В составе композиции кроме ТЭОС входил блок-сополимер и высокомолекулярный ПЭГ, как СА [25].

БИОСОВМЕСТИМЫЙ (БЕЗАЛКОГОЛЬНЫЙ) ЗОЛЬ-ГЕЛЬ ПУТЬ ДЛЯ ИНКАПСУЛИРОВАНИЯ ЖИВЫХ БАКТЕРИЙ В СИЛИКАГЕЛИ

Для предотвращения контакта живых клеток со спиртом разработано несколько протоколов иммобилизации биоматериала, одним из которых является двухшаговый путь иммобилизации клеток в силикагели и ормосилы [26]. Первоначально гидролиз алкоксисиланов в кислой среде, реакционную смесь разбавляют в два раза водой и упаривают спирт на роторном испарителе.

К образовавшемуся золю добавляют водную суспензию клеток, при этом увеличивается pH конечной системы и запускается процесс конденсации. К суспензии клеток или в реакционную смесь прекурсоров добавляли стабилизирующие структуру клеток или геля соединения, такие как ПЭГ. В ходе иммобилизации генно-инженерных штаммов со встроенным геном природной люминесценции продемонстрировано, что природа диоксида кремния, процедура синтеза и добавление различных веществ модулируют разный по величине клеточный стресс (жизнеспособность) и, следовательно, «живые» гибридные материалы, синтезированные в правильно подобранных условиях, могут более эффективно функционировать, что важно при разработке биореакторов.

ПОЛИОЛСОДЕРЖАЩИЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКИ

Другим подходом для снижения токсического воздействия на клетки спиртов, выделяющихся при гидролизе алкоксисиланов, может стать использование полиолмодифицированных силанов в качестве предшественников в синтезе силикагеля [27]. В работе [28] показано, что цианобактерии можно обездвижить в силикагелях, полученных из предшественника алкоксида, который высвобождает этиленгликоль при гидролизе и полимеризации. Этот путь намного более биосовместим по сравнению с использованием тетраметиокси- или тератраэтоксисиланов. Тем не менее, выживаемость клеток остается довольно слабой, и практически полностью исчезает через 9 недель при использовании наилучшего состава геля. Авторы считают, что необходимы глубокие исследования, чтобы выявить возможности проектировать фотобиореакторы на основе цианобактерий, иммобилизованных в силикагели на основе полиолмодифицированных предшественников.

ТЕХНОЛОГИЯ БИОСИЛ

Технология Биосил (Biosil) основана на формировании слоя золь-гель кремнезема на поверхности целых клеток, который образуется из предшественников кремнезема в газовой фазе [29]. Суть метода заключается в том, что силановые предшественники (ТЭОС, МТЭС и др.) смешивают в атмосфере азота, нагревают до 70–90^0 С и пропускают поток инертного газа. Насыщенный алкоксидом газ контактирует с клетками таким образом, что золь-гель-предшественники контактируют с водой, присутствующей на поверхности клетки, а также с реакционноспособными группами макромолекул, составляющих стенку или клеточную мембрану. Золь-гель оболочка образуется непосредственно на поверхности клетки. Биосил-технологию применили для создания «искусственной поджелудочной железы» [30]. Островки Лангерга́нса панкреатической железы крыс после обработки газообразными силановыми производными сохраняли первоначальные размеры и сохраняли жизнеспособность и функции. Силикатный материал равномерно распределялся по поверхности островка, и толщина слоя составляла 0,1–2,0 мкм. Клинический потенциал инкапсулированных клеток был продемонстрирован на экспериментах in vivo путем трансплантации крысам с диабетом. После трансплантации наблюдалось длительное восстановление нормального уровня глюкозы.

ДВУХСЛОЙНОЕ ИНКАПСУЛИРОВАНИЕ КЛЕТОК

Инкапсулированные в силикагели клетки не способны делиться, и это проблема. Для увеличения жизненного пространства для клеток разработана специальная процедура иммобилизации биоматериала в двухслойные матрицы, что позволяет осуществляться клеточной пролиферации в жидких полостях, созданных внутри кремниевой матрицы [31]. В этом случае клетки предварительно иммобилизуются в шариках Ca(II) – альгината, которые впоследствии захватываются силикатной матрицей. Иммобилизованные таким образом нитчатые грибы Stereum hirsutum применили для биоремедиации загрязненной воды. Полученное гибридное устройство проявляло хорошую физическую, химическую и биологическую стабильность и эффективно участвовало в разложении и удалении красителя малахитового зеленого, даже в растворах с высокой концентрацией красителя. Это явилось следствием регулируемого транспорта красителя через поры силикагеля и сохранения ферментов деградации красителя внутри гидрогеля. Авторы считают, что полученные результаты открывают возможность биоремедиации без внесения чужеродных микроорганизмов в окружающую среду и могут быть распространены на огромное разнообразие штаммов благодаря высокой биосовместимости такого способа иммобилизации. В последующих исследованиях было предложено разжижать альгинат после образования силикагеля, чтобы клетки оставались в макропространстве.

Эта процедура использовалась для инкапсулирования дрожжей (Sacharomyces cerevisiae) и бактерий (Escherichia coli и Bacillus subtilis) и более чувствительных растительных клеток, что позволило получить не только чрезвычайно высокую начальную жизнеспособность, но также и возможность пролиферации клеток внутри. Это особенно важно для разработки биореакторов, которые требуют высокой плотности клеток для биосинтеза белков [32]. Физиологии микроорганизмов, иммобилизованных в силикагели и другие неорганические полимеры, посвящена монография [33].

КЛЕТОЧНО-НАПРАВЛЕННАЯ СБОРКА БИО-НАНО-ИНТЕРФЕЙСОВ

Одним из самых известных методов синтеза сферических монодисперсных частиц кремнезема микронного размера является синтез Стробера (Stober), который проводится в присутствии основого катализатора NH_4 OH в присутствии амфифильных соединений [34]. В условия синтеза Стобера постоянно вносились многочисленные модификации с целью получения монодисперсных упорядоченных наноразмерных частиц кремнезема. Синтез Стробера использовали для инкапсулирования микроорганизмов (Saccharomyces cerevisiae и бактериальных клеточных линий). [35]. Однако, для управления образованием биосовместимых, однородных наноструктур на основе диоксида кремния вместо синтетических поверхностно-активных веществ использовали амфифильные фосфолипиды. Оказалось, что на поверхности клеток образовывались многослойные фосфолипидные везикулы, которые взаимодействовали с матрицей силикагеля и помогали уменьшить стресс при сушке. Поверхности клеток являются доступными и могут быть использованы для локализации дополнительных белков, плазмид и нанокристаллов. Авторы продемонстрировали увеличенную жизнеспособность клеток в сочетании с интенсивной экспрессией репортерного белка. Более того, в ходе липид-ориентированной сборки силикагеля из предшественников кремниевой кислоты в присутствии живых клеток, клетки влияли на процесс, окружая себя жидким, многослойным липидным пузырьком, который последовательно взаимодействует с упорядоченной кремнеземной мезофазой. Этот био-нано-интерфейс уникален тем, что его однородная наноструктура предотвращает чрезмерное высыхание воды, поддерживая жизнеспособность клеток, и в то же время обеспечивает доступность поверхности клеток для небольших молекул. По сравнению с существующими схемами иммобилизации, такими как инкапсуляция в золь-гелевых матрицах, авторы показали, что этот процесс происходит в результате активного взаимодействия между живой клеткой и окружающей матрицей, которое они называли клеточно-направленной сборкой. Они предположили, что клеточно-направленная сборка создает уникальную локализованную наноструктурированную микросреду, в которой устанавливаются и поддерживаются трехмерные химические градиенты. В последующих исследованиях этой научной группы [36–37] было обнаружено, что фосфолипиды с короткой цепью управляют образованием тонкопленочных кремнеземных мезофаз во время индуцированной испарением самосборки, и что введение клеток в реакционную систему изменяет путь самосборки. Клетки образуют упорядоченную липидную мембрану, которая образует взаимосвязанный интерфейс с кремнеземной мезофазой, которая уникальна тем, что она выдерживает высыхание, но при этом поддерживает доступ к молекулам, введенным в трехмерную матрицу кремнезема. Жизнеспособность клеток сохраняется в отсутствие буфера, что делает эти конструкции полезными в качестве автономных датчиков на основе клеток. В ответ на гиперосмотический стресс клетки высвобождают воду, создавая градиент pH, который поддерживается внутри наноструктурированного хозяина и служит для локализации липидов, белков, плазмид, липидизированных нанокристаллов и других компонентов на клеточной поверхности. Эта активная организация био-нано-интерфейса может быть достигнута во время струйной печати или избирательного смачивания – процессов, позволяющих структурировать клеточные массивы.

Недавно команда исследователей из той же лаборатории применила все три разработанных ранее способа инкапсуляции дрожжей в силикатные матрицы: клеточно-управляемая инкапсуляция в присутствии липидов; образование геля в присутствии глицерина; формирование матрица в газовых условиях в токе азота [38–39]. Эта работа представляет собой комбинацию эксперимента и анализа, направленную на проектирование и разработку процедур 3D-инкапсуляции, чтобы стимулировать и, возможно, контролировать четко определенные физиологические поведения живых клеток.

КРАТКИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ НАШЕЙ НАУЧНОЙ ГРУППЫ ПО ИММОБИЛИЗАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ В ЗОЛЬ-ГЕЛЬ МАТРИЦЫ СИЛИКАГЕЛЯ И ОРМОСИЛА

Исследования по иммобилизации микроорганизмов в силикагели с использованием методов золь-гель химии в нашем научном коллективе можно условно разделить на три направления: выявление параметров и условий золь-гель синтеза (pH, катализатор, предшественники силикагеля, соотношение реагентов, содержание гиброфобной добавки в виде алкилалкоксисиланов, время синтеза) на образование структуры типа «клетка в оболочке»; роль органических полимеров (ПЭГ с различными молекулярными массами и ПВС) и содержание гидрофобной добавки в виде алкилалкоксисиланов на формирование 3D структур ормосилов различного строения; выяснение роли различных микроорганизмов на формирование определенных структур «живых» гибридных материалов.

Мы показали, что в определенных условиях золь-гель синтеза каждая клетка дрожжей является центром формирования гибридной структуры и направляет образование оболочки силикагеля на своей поверхности, как в присутствии ПЭГ, так и в присутствии ПВС, но при определенном соотношении силановых прикурсоров (рис. 4) и типе гидрофобной добавки (метилтриэтоксисилане или диметилдиэтоксисилане [40–45].

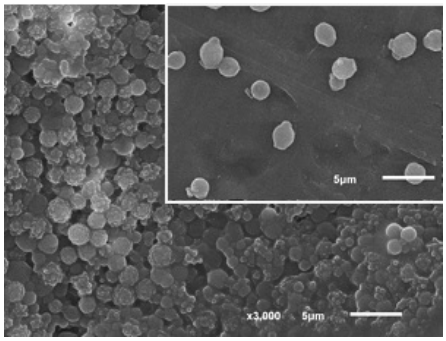


Рисунок 4. СЭМ изображение биогибридного материала на основе дрожжей Debaryomyces hansenii BKM Y-2482, инкапсулированных в золь-гель матрицы ТЭОС и МТЭС (15:85 об.%) в присутствии ПВС20000

Нам впервые удалось зафиксировать процесс образования капсулы вокруг клеток дрожжей методом оптической микроскопии [41–43]. Более того, зафиксировали сжатие и восстановление размеров оттдельных клеток дрожжей, что можно объяснить реакцией живой клетки на оснмотический стресс. Это согласуется с последними исследованиями, подробно описанными в работах [37, 39].

Структура гибридного материала зависит от размеров молекул гидрофильных полимеров. В присутствии ПЭГ с молекулярными массами 1000 и 2000 Да наблюдается образование преимущественно монолитной структуры гибридного материала, при использовании ПЭГ с более высокими молекулярными массами наблюдаются отчетливые фрактальные структуры с размером частиц от 0,7 до 2 мкм [44]. В присутствии ПВС также формируются структуры «клетка в оболочке», но материал в целом представляет более гибкий и позволяет формировать пленки на твердой поверхности [46]. Это обусловлено способностью ПВС образовывать водородные связи в процессе формирования геля.

Дыхательная активность инкапсулированных дрожжей в присутствии солей тяжелых металлов и после УФ-облучения не изменялась, в то время как свободные дрожжи потеряли жизнеспособность. Эти результаты указывают на беспрецедентные защитные функции кремнийорганической оболочки вокруг клеток дрожжей, что следует учитывать при разработке новых биотехнологий [41, 42, 46–48]. Биогибридные материалы можно хранить в течении года при температуре -18^{o} С без потери активности.

Гибриды со структурой – клетки метилотрофных дрожжей Ogataea polymorpha BKM Y-2559 в органосиликатной оболочке – могут применяться для разработки биосенсоров для мониторинга степени очистки метанолсодержащих стоков и биофильтров для очистки сильнокислых сточных вод производств метанола [42, 46, 47]. Инкапсулированные в органосиликатную матрицу дрожжи Debaryamyces hansenii использованы при разработке БПК-биосенсора [48–50].

Разработанный БПК-биосенсор является перспективным инструментом для мониторинга загрязнений сточных вод. Инкапсулированные в золь-гель матрицу дрожжи Debaryamyces hansenii могут составить основу биофильтра для очистки вод от органических загрязнений. Степень очистки достигает 100 % после 2 часов работы.

Кратко результаты исследований по этому направлению, выполненные в Тульском государственном университете, суммированы в мини-обзорах [51, 52]. В заключение отметим, что на свойства биогибридного материала на границе раздела био-нано значительно влияет биологическое поведение клеток, а не только химия силикагеля. Эта способность может представлять интерес как новый мощный метод для изучения сложного клеточного поведения, а также для разработки биоэлектроники и биосенсоров на основе клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Danks, A. E., S. R. Hall and Z. Schnepp. *The evolution of 'sol-gel' chemistry as a technique for materials synthesis.* Materials Horizons. 2016. **3**(2): 91-112.
2. Kumar, S., M. M. Malik and R. Purohit. *Synthesis methods of mesoporous silica materials.* Materials Today: Proceedings. 2017. **4**(2): 350-357.
3. Narayan, R., U. Y. Nayak, A. M. Raichur and S. Garg. *Mesoporous silica nanoparticles: a comprehensive review on synthesis and recent advances*. 2018. Pharmaceutics. 10(3): 118.
4. Avnir, D., T. Coradin, O. Lev and J. Livage. *Recent bio-applications of sol-gel materials.* Journal of Materials Chemistry. 2006. **16**(11): 1013-1030.
5. Gupta, R. and A. Kumar. *Molecular imprinting in sol-gel matrix*. Biotechnol Adv. 2008. **26**(6): 533-547.
6. Boury, B. and R. J. P. Corriu. *Auto-organisation of hybrid organic-inorganic materials prepared by sol-gel chemistry*. Chemical Communications. 2002. (8): 795-802.
7. Depagne, C., C. Roux and T. Coradin. *How to design cell-based biosensors using the sol-gel process*. Anal Bioanal Chem. 2011. **400**(4): 965-976.
8. Jones, J. R. *Review of bioactive glass: From Hench to hybrids*. Acta Biomaterialia. 2013. **9**(1): 4457-4486.
9. Bagheri, E., L. Ansari, K. Abnous, S. M. Taghdisi, F. Charbgoo, M. Ramezani and M. Alibolandi. *Silica based hybrid materials for drug delivery and bioimaging.* Journal of Controlled Release. 2018. **277**: 57-76.
10. Meunier, C. F., P. Dandoy and B. L. Su. *Encapsulation of cells within silica matrixes: Towards a new advance in the conception of living hybrid materials*. J Colloid Interface Sci. 2010. **342**(2): 211-224.
11. Blondeau, M. and T. Coradin. *Living materials from sol–gel chemistry: current challenges and perspectives.* Journal of Materials Chemistry. 2012. **22**(42): 22335.
12. Nassif, N. and J. Livage. *From diatoms to silica-based biohybrids*. Chem Soc Rev. 2011. **40**(2): 849-859.
13. Park, J. H., D. Hong, J. Lee and I. S. Choi. *Cell-in-shell hybrids: chemical nanoencapsulation of individual cells.* Accounts of Chemical Research. 2016. **49**(5): 792-800.
14. Yang, S. H., D. Hong, J. Lee, E. H. Ko and I. S. Choi. *Artificial spores: cytocompatible encapsulation of individual living cells within thin, tough artificial shells.* Small. 2013. **9**(2): 178-186.
15. Brinker, C. J. and G. W. Scherer. *Sol-Gel Science. The Physics and Chemistry of Sol-Gel Process*., Academic Press. 1990. – 908 p.
16. Gupta, R. and N. K. Chaudhury. *Entrapment of biomolecules in sol-gel matrix for applications in biosensors: problems and future prospects.* Biosens Bioelectron. 2007. **22**(11): 2387-2399.
17. Kupareva, A., P. Mäki-Arvela, H. Grénman, K. Eränen and D. Y. Murzin. *The base-catalyzed transformation of tetramethyldisiloxane: influence of reaction media.* Journal of Chemical Technology & Biotechnology. 2015. **90**(1): 34-43.
18. Landry C.J.. et al. *In situ polymerization of tetraethoxysilane in polymers: chemical nature of the interactions.* Polymer (Guildf). 1992. **33**(7): 1496–1506.
19. Pandey, S. and S. B. Mishra. *Sol–gel derived organic–inorganic hybrid materials: synthesis, characterizations and applications*. Journal of Sol-Gel Science and Technology. 2011. **59**(1): 73-94.
20. Gorbunova, O. V., O. N. Baklanova, T. I. Gulyaeva, M. V. Trenikhin and V. A. Drozdov. *Poly(ethylene glycol) as structure directing agent in sol–gel synthesis of amorphous silica.* Microporous and Mesoporous Materials. 2014. **190**: 146-151.
21. Carturan G, Campostrini R, Diré S, Scardi V, De Alteriis E. *Inorganic gels for immobilization of biocatalysts: inclusion of invertase-active whole cells of yeast (Saccharomyces cerevisiae) into thin layers of SiO_2 gel deposited on glass sheets*. Journal of Molecular Catalysis. 1989. **57**(1):L13-L6.
22. Inama L, Diré S, Carturan G, Cavazza A. *Entrapment of viable microorganisms by SiO2 sol-gel layers on glass surfaces: trapping, catalytic performance and immobilization durability of Saccharomyces cerevisiae.* J Biotechnol. 1993. **30**(2):197-200.
23. Liu, L., L. Shang, S. Guo, D. Li, C. Liu, L. Qi and S. Dong. *Organic-inorganic hybrid material for the cells immobilization: long-term viability mechanism and application in BOD sensors*. Biosens Bioelectron. 2009. **25**(2): 523-526.

24. Nassif N, Bouvet O, Noelle Rager M, Roux C, Coradin T, Livage J. *Living bacteria in silica gels*. Nature materials. 2002. **1**(1):42-4.

25. Niu X, Wang Z, Li Y, Zhao Z, Liu J, Jiang L, et al. *"Fish-in-Net", a Novel Method for Cell Immobilization of Zymomonas mobilis*. PloS one. 2013. **8**(11):e79569.

26. Ferrer ML, Yuste L, Rojo F, del Monte F. *Biocompatible sol−gel route for encapsulation of living bacteria in organically modified silica matrixes.* Chemistry of Materials. 2003. **15**(19):3614-8.

27. Desimone MF, Alvarez GS, Foglia ML, Diaz LE. *Development of sol-gel hybrid materials for whole cell immobilization*. Recent Patents on Biotechnology. 2009. **3**(1):55-60.

28. Meunier CF, Rooke JC, Leonard A, Xie H, Su B-L. *Living hybrid materials capable of energy conversion and CO_2 assimilation*. Chemical Communications. 2010. **46**(22):3843-59.

29. Boninsegna, S., P. Bosetti, G. Carturan, G. Dellagiacoma, R. Dal Monte and M. Rossi. *Encapsulation of individual pancreatic islets by sol–gel SiO_2: A novel procedure for perspective cellular grafts.* Journal of Biotechnology. 2003. **100**(3): 277-286.

30. Carturan G, Dal Toso R, Boninsegna S, Dal Monte R. *Encapsulation of functional cells by sol–gel silica: actual progress and perspectives for cell therapy.* Journal of Materials Chemistry. 2004. **14**(14):2087-98.

31. Perullini M, Jobbágy M, Mouso N, Forchiassin F, Bilmes SA. *Silica-alginate-fungi biocomposites for remediation of polluted water.* Journal of Materials Chemistry. 2010. **20**(31):6479-83.

32. Spedalieri, C., C. Sicard, M. Perullini, R. Brayner, T. Coradin, J. Livage, S. A. Bilmes and M. Jobbágy. *Silica@proton-alginate microreactors: a versatile platform for cell encapsulation.* Journal of Materials Chemistry B. 2015. **3**(16): 3189-3194.

33. Kuncová, G. and Trögl J. Physiology of microorganisms immobilized into inorganic polymers. Handbook of Inorganic Chemistry Research. D. A. Morrison, Nova Science Publishers. 2010. pp: 53-101.

34. Stober, W.; Fink, A.; Bohn, E. *Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range.* J. Colloid Interface Sci. 1968. **26**:62–69.

35. Baca, H. K., E. Carnes, S. Singh, C. Ashley, D. Lopez and C. J. Brinker. *Cell-directed assembly of bio/nano interfaces — a new scheme for cell immobilization*. Accounts of Chemical Research. 2007. 40(9): 836-845.

36. Harper, J. C., C. Y. Khirpin, E. C. Carnes, C. E. Ashley, D. M. Lopez, T. Savage, H. D. T. Jones, R. W. Davis, D. E. Nunez, L. M. Brinker, B. Kaehr, S. M. Brozik and C. J. Brinker. *Cell-Directed Integration into Three-Dimensional Lipid−Silica Nanostructured Matrices.* ACS Nano. 2010. **4**(10): 5539-5550.

37. Baca, H. K., E. C. Carnes, C. E. Ashley, D. M. Lopez, C. Douthit, S. Karlin and C. J. Brinker (). *Cell-directed-assembly: Directing the formation of nano/bio interfaces and architectures with living cells*. Biochimica et biophysica acta. 2011. **1810**(3): 259-267.

38. Johnson, P. E., P. Muttil, D. MacKenzie, E. C. Carnes, J. Pelowitz, N. A. Mara, W. M. Mook, S. D. Jett, D. R. Dunphy, G. S. Timmins and C. J. Brinker. *Spray-dried multiscale nano-biocomposites containing living cells*. ACS Nano. 2015. **9**(7): 6961-6977.

39. Fazal, Z., J. Pelowitz, P. E. Johnson, J. C. Harper, C. J. Brinker and E. Jakobsson. *Three-dimensional encapsulation of Saccharomyces cerevisiae in silicate matrices creates distinct metabolic states as revealed by gene chip analysis*. ACS Nano. 2017. **11**(4): 3560-3575.

40. Каманина О.А., Федосеева Д.Г., Мачулин А.В.,. Алферов В.А, Понаморева О.Н. *Микроорганизмы и кремнийорганические золь-гель структуры: синергизм формирования архитектуры биоматрикса*. Атуальная биотехнологияю 2014. № 3 (10):35-36.

41. Ponamoreva O., Kamanina O., Alferov V., Machulin A., Rogova T., Arlyapov V., Alferov S., Suzina N., Ivanova E.., *Yeast-based self-organized hybrid bio-silica sol–gels for the design of biosensors.* Biosensors and Bioelectronics. 2015. **67**:321-326.

42. Kamanina O., Lavrova D., Arlyapov V., Alferov V., Ponamoreva O. *Silica sol-gel encapsulated methylotrophic yeast as filling of biofilters for the removal of methanol from industrial wastewater*. Enzyme and Microbial Technology. 2016. **92**:94-98.

43. Каманина О.А., Бурмистрова Т.В., Лаврова Д.Г., Мачулин А.В., Понаморева О.Н. *Клетки микроорганизмов как структурообразующие агенты в синтезе гибридных кремнийорганических материалов с применением золь-гель технологии*. Известия Тульского государственного университета. 2016. №1:3-11.

44. Lavrova D., Kamanina O., Machulin A., Suzina N., Alferov V., Ponamoreva O. *Effect of polyethylene glycol additives on structure, stability, and biocatalytic activity of ormosil sol–gel encapsulated yeast cells*. Journal of Sol-Gel Science and Technology. 2018. **88**:1-5.

45. Ponamoreva, O.N., Lavrova, D.G., Kamanina, O.A., Rybochkin, P.V. Machulin, A.V. Alferov, V.A. *Biohybrid of methylotrophic yeast and organically modified silica gels from sol–gel chemistry of tetraethoxysilane and dimethyldiethoxysilane.* Journal of Sol-Gel Science and Technology. 2019. https://doi.org/10.1007/s10971-019-04967-8

46. Каманина О.А, Бурмистрова Т.В., Лаврова Д.Г., Понаморева О.Н. *Биогибридные материалы на основе силановых прекурсоров и клеток метилотрофных дрожжей*. Актуальная биотехнология. 2016. № 3(18): 97-100.

47. Понаморева О.Н., Алферов В.А., Каманина О.А., Мачулин А.В., Федосеева Д.Г. *Гибридные биоматериалы на основе инкапсулированных в органосиликатные материалы метилотрофных дрожжей и их применение в биосенсорном анализе*. Известия Тульского государственного университета. 2015. №1:124-132.
48. Каманина О.А., Афонина Е.Л., Понаморева О.Н., Строителев В.В. *БПК-биосенсор на основе инкапсулированных в органосиликатную матрицу дрожжей Debaryomyces hansenii*. Актуальная биотехнология. 2015. № 3(14):66-67.
49. Понаморева О.Н., Афонина Е.Л., Каманина О.А., Лаврова Д.Г., Арляпов В.А., Алферов В.А., Боронин А.М. *Дрожжи Debaryomyces hansenii в органосиликатной оболочке как основа гетерогенного биокатализатор*. Биотехнология. 2017. 33(4):44-53.
50. Ponamoreva O.N., Afonina E.L., Kamanina O.A., Lavrova D.G., Arliapov V.A., Alferov V.A., Boronin A.M. *Yeast Debaryomyces hansenii within ORMOSIL shells as a heterogeneous biocatalyst.* Applied Biochemistry and Microbiology. 2018. **54**(7): 24–30.
51. Понаморева О.Н. *Биомиметические материалы: инкапсулированные в золь-гель кремнезема клетки микроорганизмов*. Известия Тульского государственного университета. 2016. №2: 42-52.
52. Понаморева О.Н., Алферов В.А. *Биомиметические материалы на основе инкапсулированных в ормосил клеток дрожжей как перспективные биокатализаторы для экобиотехнологии*. Актуальная биотехнология. 2017. № 2(21):114-118.

УДК 602.4:628.35:664

РАЗРАБОТКА БИОСЕНСОРНОГО АНАЛИЗАТОРА ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА

В.А. Алферов, В.А. Арляпов, Н.Ю. Юдина, М.Г. Зайцев

Тульский государственный университет, Тула, Россия

Экспресс-оценка степени загрязнения объектов окружающей среды органическими соединениями является необходимым компонентом экологического контроля. Учитывая постоянно растущий перечень веществ, поступающих как загрязнители в окружающую среду, эффективным инструментом анализа оказываются методы, основанные на интегральной оценке органических компонентов, а не только на определении содержания индивидуальных веществ. Биохимическое потребление кислорода (БПК) является одним из наиболее широко используемых показателей для контроля чистоты водных сред и представляет, по определению, количество кислорода, необходимое для биохимического окисления органических веществ, содержащихся в образце. Традиционная методика определения БПК требует инкубирования насыщенной кислородом пробы в течение 5, 10 или 20 суток ($БПК_5$, $БПК_{10}$ или $БПК_{20}$, соответственно) [1, 2]. Отсутствие оперативности существенно снижает ценность традиционной методики. Поэтому активно разрабатываются методы экспресс-оценки БПК, основанные на использовании биосенсорных анализаторов. Принципиальным отличием данного метода от стандартного является значительное сокращение времени анализа от 5 суток до нескольких минут.

Биосенсорные анализаторы БПК представляют собой современные аналитические инструменты и с успехом используются для контроля водных экосистем (наряду с традиционными методами определения БПК) за рубежом. К преимуществам биосенсоров можно отнести: короткое время ответа, портативность, удобство в работе, а также отсутствие специальных требований к подготовке исследуемого образца [3]. Микроорганизмы, на которых основан рецепторный элемент БПК-биосеноров, являются доступным биологическим материалом. Клетки микроорганизмов легко воспроизводятся, культивируются и поддерживаются в чистой культуре. В некоторых случаях они обеспечивают жизнеспособность и активность ферментных систем в течение нескольких лет. Важно отметить, что в России аналогичные анализаторы до настоящего времени промышленно не выпускались. Кроме того, отсутствовала аттестованная методика экспресс-определения БПК.

На данный момент описано большое количество лабораторных моделей и несколько промышленно выпускаемых биосенсорных анализаторов БПК. Биосенсоры позволяют производить определение БПК в среднем диапазоне 2–300 мг/л за время порядка нескольких минут. Однако большое количество публикаций, выходящих регулярно по данной тематике, свидетельствуют о том, что еще не получены характеристики, которые остановили бы процесс дальнейшего поиска. Актуальными проблемами разработки БПК-сенсоров являются повышение чувствительности анализа, увеличение времени жизни биоматериала в рецепторных элементах биосенсоров и упрощение требований по обслуживанию анализатора [4, 5].

Указанные вопросы составляют цель исследования данной работы. Решение описанных выше проблем может осуществляться, с одной стороны, разработкой конструкции анализатора, которая позволит упростить работу и обслуживание БПК-биосенсора при невысокой стоимости. С другой стороны, работа направлена на подбор штаммов микроорганизмов, обладающих широкой субстратной специфичностью и разработку новых способов иммобилизации биоматериала, обеспечивающих длительное время функционирование биосенсора при сохранении высокой активности биокатализатора.

Электрохимические измерения в работе проводили с использованием анализатора растворенного кислорода «Эксперт-009» (ООО «Эконикс-эксперт», Россия), сопряженного с персональным компьютером, работающим под управлением специализированного программного обеспечения EXP2PR (ООО «Эконикс-эксперт», Россия). Измеряемым параметром (ответом биосенсора) являлась максимальная скорость изменения концентрации кислорода при добавлении субстратов (мг O_2/ $дм^3$ ·мин). Датчиками являлись кислородные электроды типа Кларка с иммобилизованными клетками микроорганизмов. В качестве модельной использовали смесь глюкозы и глютаминовой кислоты (ГГС) в массовом соотношении 1:1 (глюкоза: глютаминовая кислота), которую применяют как стандарт в определении $БПК_5$ в Российской Федерации и международной практике [1, 2]. В соответствии с нормативной документацией [1] принимали, что $БПК_5$, равное 205 мг $O_2/дм^3$, соответствует раствору, содержащему 150 мг/$дм^3$ глюкозы и 150 мг/$дм^3$ глутаминовой кислоты ($БПК_5 = 0{,}68 \times С_{ггс}$).

Основной задачей при определении показателя БПК является измерение концентрации кислорода в ходе биохимической реакции с иммобилизованными микроорганизмами. Каждый микроорганизм имеет определенную субстратную специфичность, то есть способен окислять определенный круг субстратов. Стандартный метод определения БПК требует инкубирования насыщенной кислородом пробы воды, в которую вносят активный ил (смесь различных микроорганизмов), имеющий очень широкий спектр окисляемых субстратов. Таким образом, использование микроорганизмов с широкой субстратной специфичностью является необходимым требованием и позволяет повысить правильность определения БПК методом с использованием биосенсора.

В работе произведена оценка спектра окисляемых субстратов для 10 штаммов микроорганизмов, относящихся к родам: Arxula, Pichia, Candida и Debaryomyces. Все используемые культуры микроорганизмов были получены во Всероссийской коллекции микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН. Оценка субстратной специфичности отдельных штаммов исследуемых микроорганизмов проведена с использованием 34 субстратов, относящихся к различным классам органических соединений. В качестве метода иммобилизации было использовано включение в гидрогель модифицированного поливинилового спирта (ПВС). ПВС химически и микробиологически стабилен, нетоксичен и биосовместим [6], что обуславливает эффективное использование полимера в качестве матрицы для иммобилизации клеток микроорганизмов. Новым подходом авторского коллектива к иммобилизации микроорганизмов для создания распознающих элементов биосенсоров является использование N-винилпирролидона для модификации ПВС [7]. N-винилпирролидон не только практически нетоксичен, но и повышает активность некоторых микроорганизмов [8]. Использование N-винилпирролидона для модификации ПВС позволяет значительно повысить механические характеристики полимера и, как результат, долговременную стабильность получаемых рецепторных элементов при сохранении высокой чувствительности и широкой субстратной специфичности [6]. На рисунке 1 представлен пример диаграммы субстратной специфичности для дрожжей Debaryomyces hansenii ВКМ Y-2482, иммобилизованных в химически модифицированный ПВС.

В результате изучения субстратной специфичности показано, что из всех используемых микроорганизмов дрожжи D. hansennii ВКМ Y-2482 характеризуются наиболее широкой субстратной специфичностью и окисляют вещества большой группы представленных классов органических соединений, таких как спирты, углеводы, аминокислоты и поверхностно-активные вещества, нитрофенолы, которые могут быть обнаружены в сточных и поверхностных водах.

Характеристики разработанного биосенсорного анализатора на основе микроорганизмов Debaryomyces hansenii ВКМ Y-2482, иммобилизованных в химически модифицированный поливиниловый спирт, представлены в таблице 1.

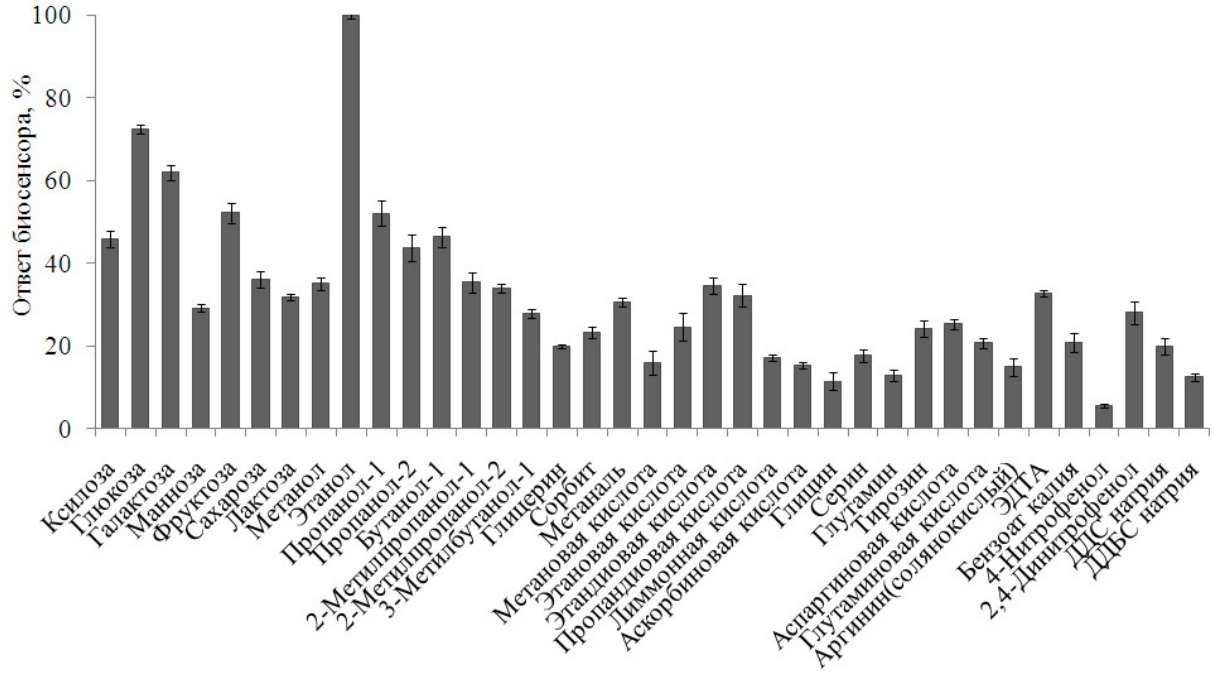


Рисунок 1. Субстратная специфичность рецепторного элемента на основе дрожжей Debaryomyces hansenii BKM Y-2482, иммобилизованных в химически модифицированный ПВС.

Таблица 1. Характеристики биосенсорного анализатора на основе микроорганизмов D. hansenii.

Характеристика биосенсора	Описание характеристики	Значение характеристики
Операционная стабильность	Относительное стандартное отклонение по 15 последовательным измерениям, %	2,0
Долговременная стабильность	Время, в течение которого величина ответа биосенсора на одну и ту же концентрацию ГГС составляло не менее 25 % от начальной, суток	42
Чувствительность	Тангенс угла наклона линейного участка зависимости ответа сенсора от $БПК_5$, $мин^{-1}$	0,0047 ± 0,0003
Длительность одиночного измерения	мин	5–7
Диапазон определяемых содержаний $БПК_5$	мг $O_2/дм^3$	0,16–30,0

Полученное значение нижней границы (0,16 мг $O_2/дм^3$) позволяет анализировать образцы воды категории «очень чистая». Важно отметить, что разработанный амперометрический биосенсорный анализатор по аналитическим и метрологическим характеристикам не только не уступает мировым аналогам [3, 4], но и частично превосходит их. Так, он обладает более низкой нижней границей определяемых значений $БПК_5$ в сравнении с описанными прототипами [9, 10]. Кроме того, единичный анализ БПК с помощью разработанного анализатора требует меньших временных затрат [4, 11].

ФБУ «ЦСМ Московской области» на собственной испытательной базе с 01.09.2015 по 11.12.2015 г. провёл испытания созданного анализатора в целях утверждения типа анализаторов растворенного кислорода «Эксперт-009» в соответствии с программой испытаний, утвержденной ФБУ «ЦСМ Московской области» 25.09.2015 г. Результаты испытаний положительные. Испытания разработанного амперометрического биосенсорного анализатора проводились на базе «Центра экспертизы, аттестации и сертификации ТулГУ» (Аттестат аккредитации № РОСС RU.001.21АЛ36).

Анализируемые пробы представляли собой сточные воды городских очистных сооружений, отобранные на разных стадиях очистки, сточные воды пищевого комбината, талые воды с территории металлоперерабатывающего предприятия и поверхностные воды нескольких водоемов Тульской области. Определение $БПК_5$ стоков стандартным методом разбавления проводилось согласно действующим в РФ нормативным документам [1]. Корреляция между значениями БПК, определенными с помощью разработанного анализатора, и значениями БПК, определенными стандартным методом разбавления составила R = 0,9999 (рисунок 2).

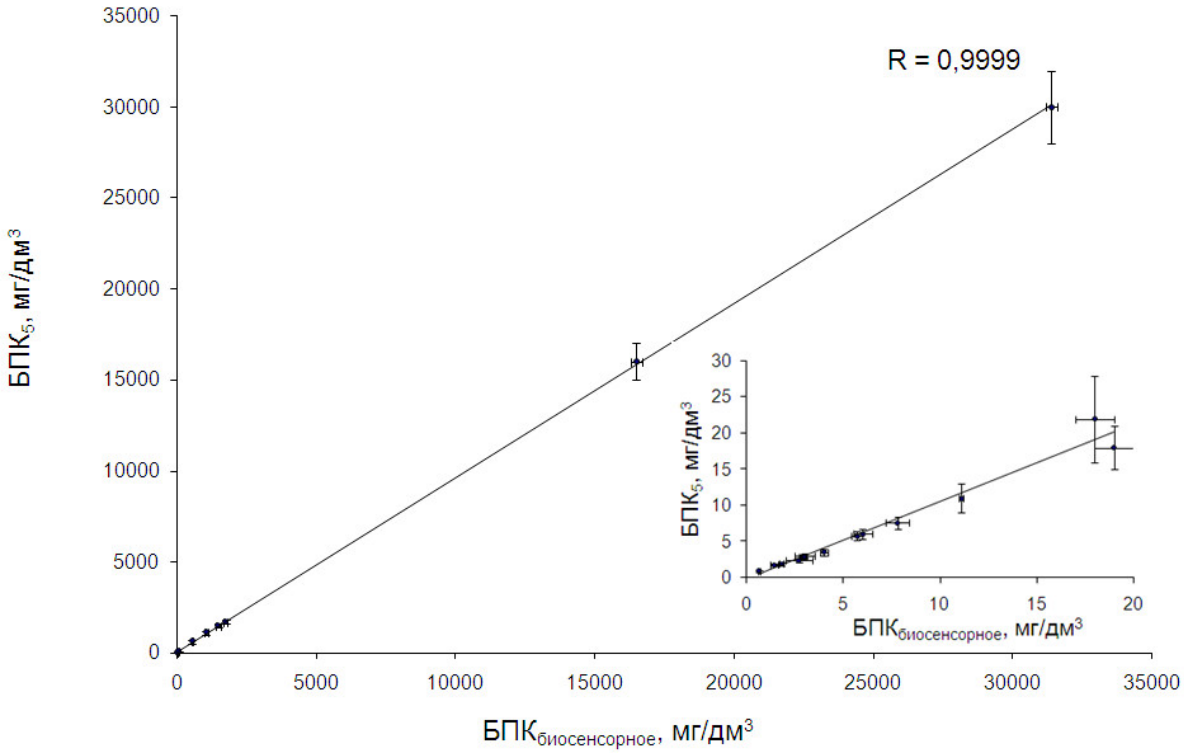


Рисунок 2. Корреляция между значениями БПК, определенными с помощью разработанного биосенсора и значениями БПК, определенными стандартным методом.

Важно отметить, что по коэффициенту корреляции между значениями $БПК_5$, определенными стандартным методом, и значениями БПК, определенными с использованием биосенсора, разработанный амперометрический анализатор превосходит большинство известных коммерчески-доступных аналогов [3, 11]. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования разработанного биосенсорного анализатора как прототипа опытных образцов приборов для серийного применения.

На основе полученных результатов создана методика МУ 09–16/001 «Методика (метод) выполнения измерений биохимического потребления кислорода после 5 дней инкубации ($БПК_5$) в поверхностных пресных, подземных (грунтовых), питьевых, сточных и очищенных сточных водах с помощью анализатора растворенного кислорода с амперометрическим датчиком с рецепторным элементом на основе иммобилизованных микроорганизмов». Данная методика аттестована Федеральным государственным бюджетным учреждением здравоохранения «Головной центр гигиены и эпидемиологии Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУЗ ГЦГ и ЭФМБА России). Свидетельство об аттестации методики измерений: № 09–16/001.311955.2016 от 30.11.2016 г. Таким образом, сформирована вся нормативная база для использования созданного анализатора в аккредитованных лабораториях РФ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Количественный химический анализ вод. Методика выполнения измерений биохимической потребности в кислороде после n-дней инкубации (БПКполн) в поверхностных пресных, подземных (грунтовых), питьевых, сточных и очищенных сточных водах. // Министерство охраны окружающей среды и природных ресурсов. РФ. 1997. Москва: 25 с.

2. Water quality-determination of biochemical oxygen demand after n days (BODn) – Part 1: Dilutionand seeding method with allylthiourea addition. 2003.

3. Jouanneau S., Recoules L., Durand M.J., Boukabache A., Picot V., Primault Y., Lakel A., Sengelin M., Barillon B. Methods for assessing biochemical oxygen demand (BOD): A review // Water research. 2014. Т. 49. С. 62–82.

4. Понаморева О.Н., Арляпов В.А., Алферов В.А., Решетилов А.Н. Микробные биосенсоры для определения биологического потребления кислорода // Прикладная биохимия и микробиология. Т. 47. № 1. 2011. С. 5–15.

5. Bourgeois W., Burgess J.E., Stuetz R.M. On-line monitoring of wastewater quality: a review // Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 2001. V 76. 337–348.

6. Handbook of Biosensors and Biochips. // Edited by Marks R.S., Cullen D.C., Karube I., Lowe C.R., Weetall H. 2007. 356 p.

7. В.А. Алферов, Н.М. Филатова, Л.Д. Асулян, И.В. Блохин, А.А. Горячева. Получение стабильного рецепторного элемента биосенсора, иммобилизацией бактериальных клеток Gluconobacter oxydans в пленку из поливинилового спирта, модифицированного N-винилпирролидоном. // Известия ТулГУ Естественные науки. 2011. № 1. С. 210–219.

8. Демаков В.А., Максимова Ю.Г., Максимов А.Ю. Иммобилизация клеток микроорганизмов // Прикл. биохим. микробиол. 2008. № 2. С. 30–31.

9. Jianbo J., Tang M., Chen X., Qi L., Dong S. Co-immobilized microbial biosensor for BOD estimation based on sol–gel derived composite material // Biosen. Bioelectron. 2003. V. 18. № 8. P. 1023–1029.

10. Jiang Y., Xiao L-L, Zhao L, Chen X., Wang X., Wong K-Y. Optical biosensor for the determination of BOD in seawater. // Talanta 2006. V. 70. № 1. P. 97–103.

11. Chang I.S., Moon H., Jang J.K., Kim B.H. Improvement of a microbial fuel cell performance as a BOD sensor using respiratory inhibitors// Biosen. Bioelectron. 2005. V. 20. № 9. P. 1856–1859.

УДК 631.46:579.222.2

БАКТЕРИАЛЬНАЯ АССОЦИАЦИЯ – ДЕСТРУКТОР СТОЙКИХ ОРГАНИЧЕСКИХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ (ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ)

Д.О. Егорова[1,2], Е.А. Шестакова[1], А.А. Пьянкова[1], Т.Д. Кирьянова[2], Л.Н. Ананьина[1]

[1] «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

[2] Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Полихлорированные бифенилы (ПХБ) на протяжении полувека (1930–1980 гг.) производились в значительных масштабах и использовались при производстве поливинилхлоридов, неопрена, пластмасс, пенорезины, кровельных и изоляционных материалов (торговые марки Galbestos, Armaflex, Arobor), гидравлических и смазочных жидкостей (торговые марки Turbinol, Santovac). Одним из направлений являлось включение ПХБ в качестве пластификатора в полимеры, синтетические покрытия для различных поверхностей, копировальную бумагу, печатные платы, изоляционную ленту. На долю ПХБ в данных материалах приходилось от 3 до 30 %. Другим направлением использования полихлорированных бифенилов являлось их применение в качестве самостоятельных материалов в трансформаторах и конденсаторах. В СССР для этих целей выпускали коммерческие смеси ПХБ марок Совол, Совтол-10 и Трихлорбифенил. Объем их производства составил 127 тыс. т. В США при производстве электротехнического оборудования было использовано более 430 тыс. т. полихлорированных бифенилов торговой марки Aroclor (Трегер, 2013; Erikson, Kaley II, 2011).

Согласно Стокгольмской конвенции «О стойких органических загрязнителях» (2001 г.), полихлорированные бифенилы запрещены к производству и применению как особо опасные для животных и человека соединения, а их запасы должны быть уничтожены до 2028 г. (http://chm.pops.int). Россия приняла на себя обязательства по выполнению положений Стокгольмской конвенции в 2011 г., о чем свидетельствует Федеральный закон от 27.06.2011 № 164-ФЗ «О ратификации Стокгольмской конвенции о стойких органических загрязнителях» (РГ, 2011).

В настоящее время производство и применение полихлорированных бифенилов на данный момент запрещено международным соглашением (Стокгольмская конвенция., 2001; Aken et al., 2010), однако ПХБ продолжают оставаться в составе использованного оборудования и материалов на предприятиях и местах складирования, а также в окружающей среде.

В силу физико-химических особенностей ПХБ являются трудноразлагаемыми материалами. Наиболее перспективными в этом направлении рассматриваются биотехнологии, основанные на использовании деградативного потенциала аэробных бактерий.

Таким образом, представляется актуальным изучение особенностей трансформации полихлорированных бифенилов бактериальными ассоциациями

Цель работы – изучение видового состава и деградативных свойств бактериальной ассоциации, полученной в результате селекции в присутствии бифенила/ПХБ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Ассоциация PN2 была получена в результате трехэтапной селекции, в основе которой лежал метод накопительного культивирования. Образец почвы был отобран на территории предприятия, длительное время использовавшего для производства продукции «Совол» (г. Пермь, Россия). В качестве селективного фактора на первой стадии использовали коммерческую смесь полихлорированных бифенилов марки «Совол», в последующих стадиях – бифенил. На третьем этапе была получена стабильная ассоциация аэробных бактерий.

Для изучения бактериального разнообразия ассоциации PN2 проведен ДГГЭ-анализ генов 16S рРНК, амплифицированных с тотальной ДНК ассоциаций. Фрагменты 16S рДНК, отличающиеся электрофоретической подвижностью (ДГГЭ), были реамплифицированы после элюирования из геля. У 4 фрагментов 16S рДНК были определены нуклеотидные последовательности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что в ассоциации PN2 доминировал представители рода Pseudomonas. Наиболее близкородственным штаммом являлся P. japonensis 12–3 (AB008507) (99.2–99.4 % уровень сходства по гену 16S рРНК). Так же в ассоциации выявлены бактерии, близкородственные штаммам родов Pseudoxanthomonas (97.4 % уровень сходства по гену 16S рРНК) и Acidovorax (уровень сходства по гену 16S рРНК – 99.2 %).

Путем высева на агаризованную минеральную среду, содержащую в качестве источника углерода бифенил (в концентрации 1 г/л), получены 15 чистых культур. В результате ВОХ-ПЦР установлено, что ряд выделенных штаммов обладают одинаковыми профилями (рисунок). В одну геномогруппу были выделены изоляты под номерами 2, 4 и 8, а также самостоятельную группу образуют изоляты 10 и 13. Для дальнейшего исследования из каждой группы были взяты по одному изоляту.

Идентификация 12 штаммов на основании анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК показала принадлежность штаммов к родам Micrococcus, Pseudoxanthomonas, Strakeya, Pseudomonas, Ochrobactrum, Stenotrophomonas, Brevibacterium, Microbacterium, Achromobacter и Bosea (таблица).

Однако в чистую культуру не были выделены бактерии рода Acidovorax, выявленные методом ДГГЭ. Можно предположить, что бактерии рода Acidovorax не способны использовать бифенил в качестве ростового субстрата, однако входят в состав ассоциации как «консументы», то есть способны использовать как источник углерода соединения, образующиеся при трансформации бифенила другими членами ассоциации PN2.

В результате анализа ростовых параметров установлено, что удельная скорость роста ассоциации PN2 в среде К1 с дифенилов в качестве источника углерода PN2 – 0.516 $ч^{-1}$. Установлено, что ассоциация PN2 осуществляет разложение моно-, ди- и трихлорированных бифенилов, а также коммерческие смеси полихлорированных бифенилов торговых марок «Делор 103» и «Совол».

Наибольшую активность бактериальная ассоциация проявляет по отношению к 2-хлорбифенилу, осуществляя 100 %-ю деструкцию за 1 сутки культивирования. При этом в среде отмечено накопление 2-хлорбензойной кислоты, незначительное содержание промежуточного метаболита (ГОФДК) и свободных ионов хлора. Разложение 3- и 4-хлорированных бифенилов происходит несколько медленнее, однако за трое суток культивирования также достигается 100 %-разложение исходного субстрата.

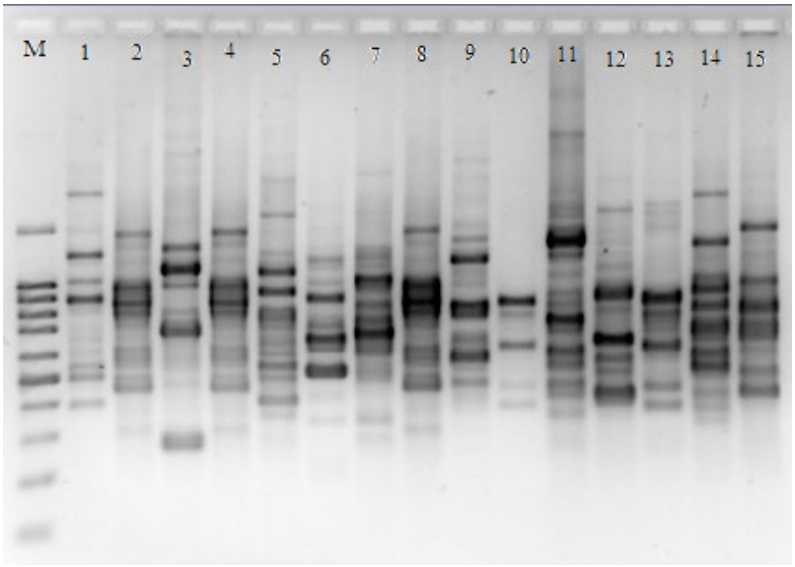


Рисунок. Электрофореграмма фрагментов ДНК, полученных методом BOX-ПЦР. М – маркер молекулярных масс O'GeneRulerTM 100bp DNA Ladder ("Fermentas", Литва), номера дорожек соответствуют номеру изолированного штамма

Таблица Результаты филогенетического анализа фрагментов гена 16S рРНК штаммов, выделенных из ассоциации PN2

Штамм	Типовой штамм ближайшего родственного вида, номер в базе данных GenBank	Сходство фрагмента гена 16S рРНК, %	Количество анализированных нуклеотидов
PNS1	Micrococcus luteus NCTC 2665^T (CP001628)	100	897
	Micrococcus yunnanensis YIM 65004^T (FJ214355)	100	
	Micrococcus aloeverae AE-6^T (KF524364)	100	
PNS2	Pseudoxanthomonas mexicana AMX 26B^T (AF273082)	100	890
PNS3	Starkeya novella DSM 506^T (CP002026)	98,74	955
PNS4	Pseudomonas monteilii NBRC 103158^T (BBIS01000088)	99.77	869
	Pseudomonas plecoglossicida NBRC 103162^T (BBIV01000080)	99.77	
PNS5	Ochrobactrum anthropi ATCC 49188^T (CP000758)	100	837
	Ochrobactrum lupini LUP21^T (NNRN01000040)	100	
	Ochrobactrum cytisi ESC1^T (AY776289)	100	
PNS6	Stenotrophomonas indicatrix WS40^T (KJ452162)	99.77	874
PNB1	Brevibacterium sandarakinum DSM 22082^T (LT629739)	97.51	843
PNB3	Pseudomonas kunmingensis HL22–2^T (JQ246444)	99.3	863
PNB4	Microbacterium resistens NBRC 103078^T (BCRA01000173)	99.6	892
PNB5	Brevibacterium epidermidis NBRC 14811^T (BCSJ01000023)	98.73	866
PNB6	Achromobacter deleyi LMG 3458^T (HG324053)	100	885
PNB7	Bosea eneae 34614^T (AF288300)	99.66	890
	Bosea vestrisii 34635^T (AF288306)	99.66	
	Bosea lupini LMG 26383^T (FR774992)	99.66	

Стоит отметить, что штаммы, входящие в ассоциацию PN2, способны разлагать 3-хлорбензойную и 4-хлорбензойную кислоты, о чем свидетельствует снижение концентрации данного метаболита при трансформации 3-ХБ и 4-ХБ. Анализ количества выделенного хлора позволяет предположить, что разложение 4-ХБК происходит через стадию отщепления иона хлора от молекулы кислоты, тогда как разложение 3-ХБК осуществляется без стадии дехлорирования с образованием в качестве следующего метаболита хлоркатехола.

Ассоциация PN2 характеризуется наличием бифенил диоксигеназ, способных окислять как орто-, так и пара-замещенное кольцо молекулы хлорбифенила. При этом окисление конгенеров ПХБ, содержащих моно(пара) – хлорированное кольцо происходит эффективнее, чем конгенеров с моно(орто) – хлорированным кольцом в молекуле. Уровень деструкции 2,4' – ХБ и 2, 4, 4' – ХБ за трое суток составил 86.2 % и 100 % соответственно, тогда как при разложении 2,2'–ХБ и 2,4,2'–ХБ уровень деструкции составил 70 % и 97.4 % соответственно. В процессе трансформации было зафиксировано образование ГОФД с соответствующей длиной волны, подтверждающей окисление по моно-замещенному кольцу молекулы, а также образование 2-хлорбензойной (при разложении диХБ) и 2,4–дихлорбензойных (при разложении триХБ) кислот.

Анализ деградативной активности ассоциации PN2 к коммерческим смесям ПХБ показал, что эффективнее происходит разложение «Совола», несмотря на то, что в данной смеси преобладают конгенеры ПХБ с 5 и 6 заместителями в молекуле, тогда как в смеси «Делор 103» преобладают менее хлорированные конгенеры ПХБ. В процессе деструкции коммерческих смесей ПХБ было зафиксировано накопление в среде незначительного количества ионов хлора, а также на ВЭЖХ-хроматограммах было зафиксировано присутствие моно-, ди- и три-хлорированных бензойных кислот (количественный анализ не производился).

Таким образом, бактериальная ассоциация PN2 обладает уникальным деградативным потенциалом – эффективно разлагает хлорированные бифенилы, содержащие от 1 до 6 заместителей в молекуле, как в составе коммерческих смесей, так и в виде индивидуальных конгенеров и может быть использована как основа в биотехнологиях, направленных на уничтожение ПХБ.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18–29–05016мк.

ЛИТЕРАТУРА.

Российская Федерация. Законы. О ратификации Стокгольмской конвенции о стойких органических загрязнителях: федер. закон : [принят Гос. Думой 17 июля 2011 г. : одобр. Советом Федерации 22 июня 2011 г.]. – Российская Газета, 29 июня 2011.

Стокгольмская конвенция «О стойких органических загрязнителях». http://chm.pops.int/Portals/0/sc10/files/a/stockholm_convention_text_r.pdf

Трегер Ю. СОЗ – стойкие и очень опасные // The Chemical Journal. 2013. № 1. P. 30–34.

Aken B.V., Correa P.A., Schnoor J.L. Phytoremediation of polychlorinated biphenyls: new trends and promises // Environ. Sci. Technol. 2010. V.44. P. 2767–2776.

Erikson M.D., Kaley II R.G. Applications of polychlorinated biphenyls // Environ. Sci. Pollut. Res. 2011. V.18. P. 135–151.

УДК 579:57.033

ВЛИЯНИЕ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ СФАГНОВОГО ПЕРЕХОДНОГО ТОРФА НА РОСТ ШТАММА-НЕФТЕДЕСТРУКТОРА RHODOCOCCUS SP. X5 ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Е.В. Акатова, Ю.А. Пронькина, К.Р. Семенова, М.М. Герцен, Е.Д. Дмитриева

Тульский государственный университет, Тула, Россия.

Гуминовые вещества (ГВ), образующиеся при разложении животных и растений под действием микроорганизмов и абиотических факторов окружающей среды, представляют собой сложенные высокомолекулярные органические соединения с нерегулярной структурой. ГВ в большом количестве содержатся в твердых горючих ископаемых (горючих сланцев, ископаемых углей, торфов) [1, 2].

Биологическая активность ГВ интенсивно изучается в течение долгого времени. Наличие положительного ответа живых организмов на присутствие небольших доз гуминовых веществ в окружающей среде доказывают многочисленные исследования [3, 4]. Кроме того, ГВ могут выполнять и протекторную функцию, защищая живые организмы от воздействия различных токсикантов и ксенобиотиков [5]. В настоящее время одним из широко распространенных ксенобиотиков, загрязняющих экосистемы, является нефть и продукты ее переработки, которые попадают в окружающую среду при бурении, авариях транспортных средств, порывах нефтепроводов [6]. Очень остро стоит проблема разлива нефти в мировом океане и прибрежных земель.

При очистке почвенных и водных сред, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, широкое применение нашли методы биотехнологии, основанные на способности микроорганизмов использовать углеводороды нефти в качестве единственного источника углерода.

Деструкторами нефтяного загрязнения могут выступать микроорганизмы, сохранившиеся в загрязненной почве и воде, или специально вносимые микроорганизмы в виде биопрепарата культуры углеводородокисляющих микроорганизмов [7, 8].

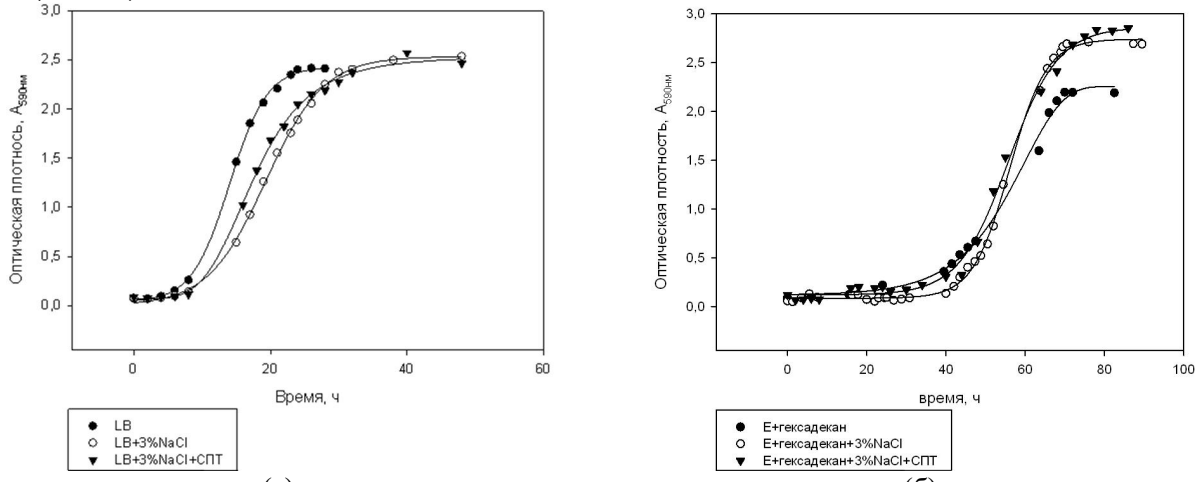
Микроорганизмы-нефтедеструкторы, входящие в биопрепараты, должны уметь приспосабливаться к изменениям окружающей их среды, например, повышенной солёности, перепадам температур [9]. В совокупности с биопрепаратами культур углеводородокисляющих микроорганизмов применение гуминовых веществ дает положительный экологический эффект, который заключается в быстром восстановлении естественных биогеохимических процессов почв. Однако такие сложные по химическому строению вещества как ГВ обладают двойным эффектом и в определенных условиях оказывают негативное воздействие на живые организмы [3, 10].

Таким образом, целью данного исследования являлось установление влияния ГВ, выделенных из сфагнового переходного торфа (СПТ), на рост штамма-нефтедеструктора Rhodococcus sp. X5 при различных условиях культивирования (повышенной солености среды и различных источниках углерода и энергии).

В данной работе изучали влияние ГВ СПТ на рост штамма Rhodococcus sp. X5, полученного из лаборатории биологии плазмид Института биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрябина РАН (г. Пущино). Бактерии входят в состав биопрепарата «МикроБак», применяемого для биоремедиации нефтезагрязненных территорий [9]. ГВ были выделены из сфагнового переходного торфа (СПТ). Данный торф был отобран на болоте Кочаки 2 у деревни Ясная поляна, Тульская область. Сфагновый переходный торф образован на сплавине толщиной 1,5 м, которая плавает на поверхности карстового провала глубиной 7 м. Торф имеет низкую степень разложения 10–15 %, состоит из стеблей сфагновых мхов, остатков осок, пушицы и клюквы. Цвет торфа светло-коричневый.

ГВ выделяли методом щелочной экстракции, готовили рабочий раствор с концентрацией 1г/л согласно работе [11]. Rhodococcus sp. X5 выращивали в богатой среде Лурия-Бертани (LB) и минеральной среде Эваса (E) с добавлением гексадекана (2 %) как единственного источника углерода и энергии. Влияние ГВ на рост микроорганизма оценивали по изменению физиологических параметров роста (длительности фаз роста и максимальной удельной скорости роста), для этого проводили периодическое культивирования в качалочных колбах объемом 750мл (объем среды – 100мл). ГВ в культуральную среду добавляли до конечной концентрации 50 мг/л, NaCl – 3 %. Приготовленные среды стерилизовали автоклавированием при 121ºС 40 мин. Культивирование проводили в шейкерах-инкубаторах при 28ºС с аэрацией 180 об/мин. Для определения физиологических параметров роста снимали кривые роста, для чего стерильные среды заражали 1мл инокулята (суточная культура, выращенная на среде Лурия-Бертани) и через определенные промежутки времени отбирали 3мл и измеряли оптическую плотность культуральной среды на фотометре при длине волны 590нм.

В результате работы были получены кривые роста Rhodococcus sp. X5 на средах с добавлением соли и ГВ СПТ (рис. 1). По полученным кривым роста были рассчитаны физиологические параметры роста (табл. 1).



(а) (б)

Рисунок 1. Кривые роста штамма Rhodococcus sp. X5 на средах с добавлением соли и гуминовых веществ сфагнового переходного торфа. (а) на богатой среде Лурия-Бертани (LB), (б) на минеральной среде Эванса (E) с добавлением гексадекана (2 %), как единственного источника углерода и энергии

Таблица.1. Продолжительность периодов роста и максимальная удельная скорость роста *Rhodococcus sp.* X5 при различных условиях культивирования

Физиологические параметры роста	среда LB			Среда Е с гексадеканом		
	Контроль	Добавление 3 % NaCl	Добавление 3 % NaCl и 50 мг/л ГВ СПТ	Контроль	Добавление 3 % NaCl	Добавление 3 % NaCl и 50 мг/л ГВ СПТ
Лаг-фаза	нет	нет	0–3 (3)	0–15 (15)	0–25 (25)	0–20 (20)
Ускорение роста, ч	0–4 (4)	нет	3–7 (4)	15–33 (18)	25–41 (16)	20–36 (16)
Экспоненциальная фаза, ч	4–13 (9)	0–13 (13)	7–13 (6)	33–60 (27)	41–55 (14)	36–53 (17)
Замедления роста, ч	13–20 (7)	13–30 (17)	13–32 (19)	60–70 (10)	55–65 (10)	53–65 (12)
Выход на стационарную фазу, ч	20	30	32	70	65	65
Максимальная удельная скорость роста, $ч^{-1}$	0,270	0,221	0,280	0,067	0,141	0,099

Из таблицы видно, что при росте на богатой среде LB добавление соли замедляет рост культуры в 1,2 раза, а также увеличивает продолжительность фазы замедления роста и выход на стационарную фазу роста. Это говорит о том, что, несмотря на устойчивость данных микроорганизмов к наличию соли в культуральной среде, деление микроорганизмов постепенно замедляется и ресурсы клетки задействованы на защиту и выживание микробов в гиперосмотических условиях.

Наличие ГВ СПТ в концентрации 50 мг/л в среде не влияет на рост микроорганизмов, однако, при добавлении ГВ СПТ в среду, содержащую 3 % соли, приводит к ускорению роста в 1,3 раза по сравнению ростом в среде с добавлением соли, и максимальная удельная скорость роста приближается к контрольному значению. Однако, как видно из таблицы 1, при наличии в среде ГВ появляется лаг-фаза, что говорит о приспособлении микроорганизмов к новым условиям среды. Кроме того, сокращается время экспоненциальной фазы роста и увеличивается стадия замедления роста, что свидетельствует о том, что среда с добавлением ГВ и соли с не является оптимальной для развития.

Данный факт можно объяснить формированием плотного полимолекулярного слоя, состоящего из молекул ГВ, сорбированного на поверхности и внутриклеточной стенки бактерий, который, с одной стороны, защищает клетку от воздействия осмотического давления, с другой стороны, препятствует нормальному обмену веществ между клеткой и питательным раствором и приводит к снижению роста [4, 12].

При росте на минеральной среде Эванса с гесадеканом как единственным источником углерода и энергии наблюдается другая картина. Добавление соли в культуральную среду приводит к увеличению максимальной удельной скорости роста в 2 раза. Что может говорить о более благоприятных для данной культуры условий развития, несмотря на то, что время адаптации микробов к данной среде увеличивается в 1,5 раза. Возможно, в данных условиях поступление субстрата в клетку проходит более легко. Добавление ГВ в культуральную среду приводит к замедлению роста и снижению максимальной удельной скорости роста в 1,4 раза по сравнению со средой с добавлением соли, что так же может быть связано с образованием полимерного слоя на поверхности клеток и препятствию поступления субстрата.

Таким образом, по полученным результатам можно заключить, что ГВ СПТ обладают незначительными протекторными свойствами и в некоторых условиях замедляют развитие микроорганизмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Орлов Д.С. Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации. М.: МГУ, 1990. 325 с.

2. Перминова И.В. Гуминовые вещества – вызов химикам XXI века // Химия и жизнь – XXI век. 2008. № 1. С. 50–55.

3. Куликова Н.А. Защитное действие гуминовых веществ по отношению к растениям в водной и почвенной средах в условиях абиотических стрессов: автореф. дис… д-ра биол. наук. М., 2008. 48 с.

4. Попов А.И. Гуминовые вещества: свойства, строение, образование/ Под ред. Е.И. Ермакова. СПб.: Изд-во С. – Петерб. ун-та, 2004. 248 с.

5. Акатова Е.В., Дмитриева Е.Д., Сюндюкова К.В., Леонтьева М.М., Музафаров Е.Н. Детоксицирующая способность гуминовых веществ торфов различного происхождения по отношению к ионам тяжелых металлов // Химия растительного сырья. 2017 г. № 1. С. 119–127.

6. Шамраев А.В., Шорина Т.С. Влияние нефти и нефтепродуктов на различные компоненты окружающей среды // ВЕСТНИК ОГУ. 2009. № 6. С. 642–645.

7. Рогозина Е.А., Тимергазина И.Ф., Моршунов П.А. Очистка нефтезагрязненных почв бактериями рода Pseudomonas – основой биопрепаратов НАФТОКС 12-Р и НАФТОКС 48-У // Нефтегазовая геология. Теория и практика. 2014. Т.9. № 2. С. 1–16.

8. Назарько М.Д., Щербаков В.Г., Александрова А.В. Перспективы использования микроорганизмов для биодеградации нефтяных загрязнений почв // Известие вузов. Пищевая Технология. 2004. № 4.С. 89–91.

9. Биопрепарат для очистки почв от загрязнений нефтью и нефтепродуктами, способ его получения и применения: патент № 2378060 Российская Федерация / Филонов А.Е., Кошелева И.А., Самойленко В.А., Шкидченко А.Н., Нечаева И.А., Пунтус И.Ф., Гафаров А.Б., Якшина Т.В., Боронин А.М., Петриков К.В. – № 2378060; заявл. 2007–07–05; опубл. 10.01.2009. Бюл. № 1. – 15 с.

10. Дмитриева Е.Д., Платонов В.В., Проскуряков В.А., Сыпченко А.Я., Хадарцев А.А. Биологическая активность сапропеля и препаратов на его основе. Деп. В ВИНИТИ 03.07.2003 – № 1262 В. 2003. 20 с.

11. Дмитриева Е.Д., Леонтьева М.М. Сюндюкова К.В., Молекулярно-массовое распределение гуминовых веществ и гиматомелановых кислот торфов различного генезиса Тульской области металлов // Химия растительного сырья. 2017. № 4. С. 187–194.

12. Овчинникова Т.Ф., Кудряшов А.П., Мажуль В.М., Наумова Г.В., Райцина Г.И. О мембранотропной активности гидрогумата – гуминового препарата из торфа // Научн. докл. высш. школы, Серия биол. науки. 1991. № 10. С. 103–109.

УДК 574.3.591

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ДАННЫЕ ПО СОДЕРЖАНИЮ МИКРОЯДЕР В ЭРИТРОЦИТАРНЫХ КЛЕТКАХ ПРУДОВЫХ ЛЯГУШЕК, ОБИТАЮЩИХ В ЗАГРЯЗНЕННОЙ ВОДНОЙ СРЕДЕ

Е.Б. Романова, Е.С. Рябинина

Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

В настоящее время активно исследуются цитогенетические и гематологические особенности клеток эритроидного ряда у представителей различных классов животных, в том числе, амфибий. Характерными чертами кроветворения амфибий являются: 1) различная локализация и специализация кроветворных участков у разных представителей; 2) диффузный характер кроветворения и интраваскулярное (в циркулирующей крови) протекание; 3) отсутствие деления на лимфоидное и миелоидное кроветворение (Гольберг и др., 1973). Активность работы органов гемопоэза амфибий (костного мозга, селезенки, печени) (Хамидов и др., 1978) определяется сезоном года. Известно, что весной эритроидные клетки начинают свою дифференцировку в костном мозге, затем продолжают в кровотоке, летом же эритропоэз смещается в кровоток (Акуленко, 2011).

Эритроцитарный ряд клеток (эритрон) (Castle, Minot, 1936) амфибий, берет свое начало от полипотентных стволовых клеток и включает ряд стадий: эритробласты, нормобласты (базофильные, полихроматофильные, оксифильные) и зрелые эритроциты (Чертков, Фриденштейн, 1977). По сравнению с млекопитающими эритроциты амфибий дольше сохраняют синтетическую активность в процессе созревания и в гемопоэтических очагах выявляются все стадии митоза дифференцирующихся эритроидных клеток, с максимальной частотой в полихроматофильных нормобластах (Charlemagne, 1972). В зрелых эритроцитах амфибий встречается и амитотическое деление (Хамидов и др., 1978). В результате неправильного хода клеточного деления или фрагментации ядра в процессе апоптоза, образуются микроядра – фрагменты ядра в эукариотической клетке, не содержащие полного генома. Микроядра образуются из ацентрических хромосомных или хроматидных фрагментов (кластогенный эффект) и целых хромосом или хроматид, которые отстают в анафазе и остаются вне дочерних ядер в телофазе (анеугенный эффект) (Catalan et al., 2000; Falck et al., 2002). Отстающие участки не могут двигаться к полюсам, поскольку оторваны от митотического веретена (Norppa, Falck, 2003), что и приводит к образованию микроядра в дочерней клетке. Различие между этими двумя механизмами, определяющими происхождение микроядер, очень важно (Norppa et al., 1993).

Учет микроядер (микроядерный тест) является относительно новым, но уже общепринятым цитогенетическим методом оценки мутагенного действия агентов различной природы. Особенно удобно наблюдать за микроядрами, локализованными в крупных ядерных эритроцитах амфибий (Крюков, 2000; Манских, 2006; Романова и др., 2018; Do Amaral et al., 2019; Yu Ma and etc., 2019 и др.). Согласно литературным данным, частота встречаемости микроядер в полихроматофильных эритроцитах млекопитающих, как правило, существенно выше (Ковалева, 2008), хотя в отдельных работах таких отличий не обнаружено (Ciet et al., 1993). Сравнительный анализ частоты встречаемости микроядер в эритроне амфибий ранее не проводился, между тем при оценке генотоксического воздействия экологических факторов вопрос соотношения юных и зрелых форм эритроцитов с микроядрами весьма актуален.

Цель работы: оценка доли эритроцитарных клеток с микроядрами в костном мозге и периферической крови прудовых лягушек (Pelophylax lessonae, Camerano 1882) урбанизированной территории Нижегородской области, собранных в течение полевых сезонов 2017–2018 гг.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор прудовых лягушек (80 особей) осуществляли в течение полевых сезонов 2017–2018 гг., на территории двух водных объектах. Первый: низинное болото п. Белкино (Нижегородская обл., Борский р-н, с.ш. 56.2862, в.д. 44.5480), расположен в 60 км от г. Нижнего Новгорода, рядом располагаются жилые дома и частные огороды, вокруг произрастает смешанный лес, местными жителями не посещается. Второй: оз. Вторчермет, искусственный водоем, созданный на месте добычи грунта (г. Н. Новгород, Московский р-н, с.ш. 56.3119, в.д. 43.8488), находится в промышленной части города с множественной застройкой, в зоне влияния ОАО «Вторчермет».

В водоемах в прибрежной зоне были отобраны пробы воды, в которых, с помощью спектрофотометра Hach DR-2800, определены химические загрязнители: железо общее, марганец, медь, хром, нитрат-ионы (NO_3), нитрит–ионы (NO_2), свинец, никель, цинк, сульфаты, сульфиды и водородный показатель (pH). По результатам анализа рассчитывали УКИЗВ (удельный комбинаторный индекс загрязненности воды) (Смирнова и др., 2011).

Для цитогематологического анализа от каждой особи были получены и окрашены мазки крови и костного мозга (Гематология, 2004). Подсчет микроядер и их дифференцировку: 1-оформленные; 2-прикрепленные; 3-палочковидные; 4-разрыхленные (Жулева, Дубинин, 1994 с модификациями), осуществляли на микроскопе Meiji Techno с использованием иммерсионного объектива при общем увеличении х1500. Окуляр микрометром проводили измерение большой (2a) и малой (2b) оси каждого микроядра и рассчитывали его площадь (мкм^2) по формуле эллипса: $S = \pi ab$, где a – большая полуось эллипса, b – малая полуось эллипса, $\pi = 3.14$.

Статистический анализ проводили непараметрическими методами с расчетом критериев: Уилкоксона (W); Дана (D), Манна-Уитни (Z), критерия z – при сравнении долей. Критический уровень значимости (a) принимали = 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дифференцированный подсчет микроядер выявил их наличие, как в молодых, так и зрелых эритроцитах. В обеих выборках все четыре вида микроядер встречались только в зрелых эритроцитах крови (2017 год). В 2018 году палочковидные микроядра в эритроцитарных клетках разной зрелости не обнаружены.

В нормобластах костного мозга прудовых лягушек оз. Вторчермет преобладали микроядра оформленного вида, доли прикрепленных и разрыхленных в динамике двухлетних наблюдений менялись несущественно. Суммарная доля микроядер в эритроцитарных клетках костного мозга прудовых лягушек оз. Вторчермет оставалась высокой: в 2017 – (9.5 ± 1.55 ‰), в 2018 – (5.12 ± 1.15 ‰) (рис. 1).

Иное соотношение видов микроядер в эритроцитарных клетках костного мозга наблюдалась в выборке прудовых лягушек бол. Белкино. В 2017 г. в костном мозге лягушек встречались только эритроциты с оформленными микроядрами, в 2018 г. были обнаружены два типа микроядер, при этом эритроциты с микроядрами прикрепленного вида преобладали над эритроцитами с оформленными микроядрами. Суммарная доля микроядер статистически значимо выросла в 2018 году по сравнению с предыдущим годом ($W = 2.93$; $p = 0.003$).

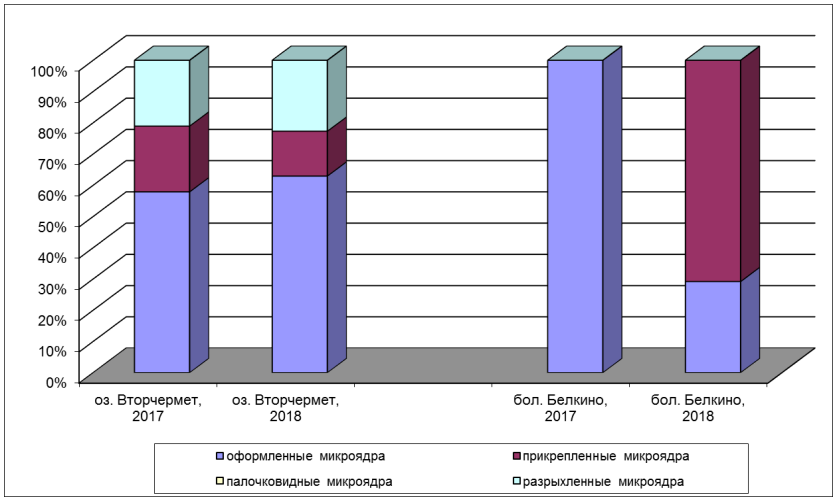


Рис. 1. Доли микроядер разных видов в эритроцитарных клетках костного мозга прудовых лягушек

Доля микроядер в более зрелых эритроцитах, циркулирующих в крови прудовых лягушек популяции оз. Вторчермет, в отличие от нормобластных клеток костного мозга, в 2018 году по сравнению с 2017 годом увеличивалась ($W = 3.5$; $p < 0.001$), за счет доли прикрепленных микроядер ($W = 3.75$; $p = 0.0001$) на фоне уменьшения доли разрыхленных микроядер ($W = 3.4$; $p = 0.0006$) (рис. 2). При этом отметим в этой выборке в 2018 году почти трехкратное превышение доли микроядер в зрелых эритроцитах крови по сравнению с эритроцитарными клетками костного мозга ($W = 4.28$; $p < 0.001$).

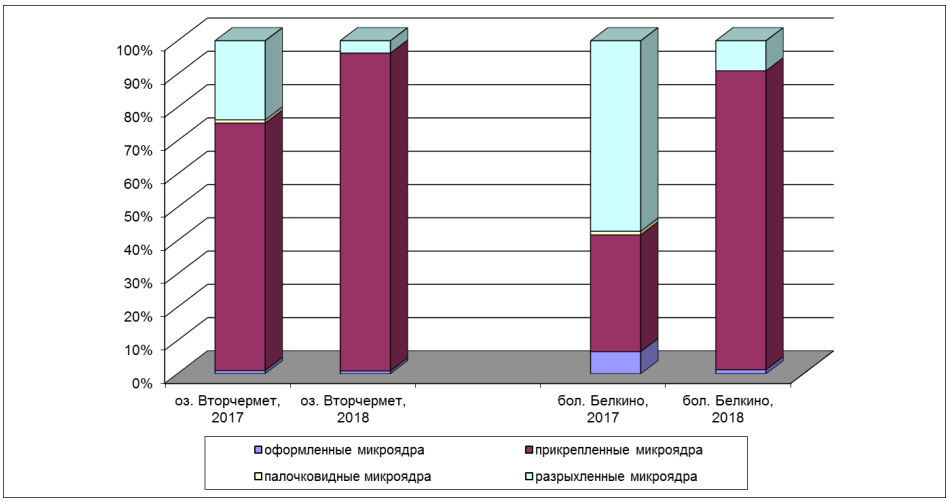


Рис. 2. Доли микроядер разных видов в эритроцитах периферической крови прудовых лягушек

В эритроцитах периферической крови прудовых лягушек бол. Белкино в 2018 году происходило общее увеличение суммарной доли микроядер про сравнению с 2017 ($W = 4.57$; $p < 0.001$), за счет появления прикрепленных видов ($W = 2.38$; $p = 0.017$). В этой выборке встречаемость микроядер в эритроцитах периферической крови была выше, чем в эритроцитарных клетках костного мозга, как в 2017 г. ($W = 4.07$; $p = 0.001$), так и в 2018 г. ($W = 1.96$; $p = 0.04$).

Ранее нами было выявлено отсутствие различий в размерных характеристиках микроядер конкретного вида в поли- и нормохроматофильных эритроцитах (Romanova, Ryabinina, 2018), что подтвердилось и в настоящем исследовании. Так, например, разрыхленные микроядра в эритроцитах костного мозга и периферической крови прудовых лягушек оз. Вторчермет имели сопоставимую среднюю площадь, в мкм^2: в 2017 г.: (7.04 ± 1.12) и (7.44 ± 0.68), соответственно, $Z = 0.66$; $p = 0.5$; в 2018 г.: (8.97 ± 3.58) и (7.71 ± 0.95), соответственно, $Z = 0.07$; $p = 0.94$.

Наиболее крупными были разрыхленные микроядра, самыми мелкими – прикрепленные микроядра. Так, средняя площадь прикрепленных микроядер в эритроцитах крови прудовых лягушек бол. Белкино составляла: (1.19 ± 0.34) мкм^2, в 2017 г. и (1.14 ± 0.03) мкм^2, в 2018 г. (W = 0.53; p = 0.59). Отметим, что размерные характеристики прикрепленных микроядер эритроцитов крови озерных лягушек оз. Вторчермет статистически значимо превышали аналогичный показатель особей бол. Белкино, в 2017 (D = 3.45, p = 0.0005), и в 2018 г. (D = 2.23, p = 0.025).

Из литературных источников известно, что маленькие микроядра возникают в основном из ацентрических фрагментов, тогда как большие – из дицентриков или целых хромосом (Pincu, 1985). Дицентрики имеют содержание ДНК в диапазоне от 5 до 15 % от содержания ДНК в ядре G1 (Nusse, Kramer, 1984). По нашим данным прикрепленные микроядра имеют наименьший размер, можно полагать, что в них содержится лишь фрагмент ДНК.

Анализ данных литературы и собственные полученные результаты позволяют заключить, что причины, определяющие нарушения процесса деления и приводящие к образованию микроядер, могут быть связаны с факторами, обладающими статокинетическим действием (задерживающими и вызывающими нарушения в фазах митоза, связанных с формированием веретена деления и расхождением хромосом). Например, воздействием тяжёлых металлов и других загрязнителей водной среды (Кармазин, Пескова, 2010; Игнатова и др., 2016; Carvalho et al., 2019), действием ионизирующего излучения (Красавин и др., 2004; Башлыкова, 2017), паразитарными инвазиями (Бекиш и др., 2003; Побяржин, Бекиш, 2003) шумовое, физическое и другие виды воздействий и др.

Согласно проведенному гидрохимическому анализу, качество вод водных объектов в наблюдаемый период характеризовалось IV–V (грязная – очень грязная – экстремально грязная). Несмотря на то, что состояние вод оз. Вторчермет, согласно УКИЗВ (табл. 1) по сравнению с 2017 годом незначительно улучшилось: снизилась концентрация марганца (в 4 раза), меди (в 1.3 раза), сульфидов (в 19 раз), высокая частота микроядер в клетках эритроцитарного ряда указывает на эколого-генетическое неблагополучие водной среды и иллюстрирует суммарный ответ организма на комплексное загрязнение окружающей среды (химическое, физическое, биологическое и пр.).

Таблица 1 Гидрохимический анализ загрязненности воды исследуемых водоемов

Водоемы	Год	УКИЗВ, отн. ед.	Класс качества воды
оз. Вторчермет	2017	9.1	IV, очень грязная, разряд «в»
	2018	6.6	IV, грязная, разряд «б»
Бол. п. Белкино	2017	12.1	V, экстремально грязная
	2018	12.5	V, экстремально грязная

Результаты гидрохимического анализа проб воды бол. Белкино в 2018 году показали возрастание концентрации железа (увеличение концентрации в 3 раза по сравнению с 2017 годом) и концентрации меди (в 2.1 раза), существенно превышающие ПДК$_{рыб.хоз}$, что отразилось на повышении индекса загрязненности вод.

Подводя итог анализу цитогенетических нарушений в эритроцитарных клетках прудовых лягушек, длительно обитающих в загрязненной водной среде на урбанизированной территории, можно заключить, что наиболее неблагоприятна экологическая ситуация в оз. Вторчермет, что подтверждается возрастанием доли микроядер в течение периода наблюдений (z = 9.1; p < 0.001). Ряд исследователей относят оформленные ядра к естественным (фоновым) микроядрам для данного вида животных, образование которых связано с нарушениями веретена деления клетки (Жулева, Дубинин, 1994). Изучаемое генотоксическое воздействие может индицировать образование только одного вида микроядер, и другие виды могут быть неинформативными для анализа (Norppa, Falck, 2003). Полагаем, что к наиболее информативным видам микроядер, иллюстрирующих цитогенетическое неблагополучие водной среды, следует отнести прикрепленные микроядра, являющиеся результатом структурных нарушений хромосом. Кроме того, ряд генотоксинов может изменять соотношение юных и зрелых форм эритроцитов, которые гибнут быстрее, что существенно влияет на оценку цитогенетического воздействия. В этой связи отметим, что количество микроядер существенно варьирует в зависимости от анализируемой гемопоэтической ткани, что и диктует целесообразность оценки нестабильности генома методом анализа микроядер, как и полихроматофильных (молодых), так и нормохроматофильных (более зрелых) эритроцитарных клетках амфибий.

ЛИТЕРАТУРА

Акуленко Н.М. Сосудистое русло как часть гемопоэтической системы бесхвостых амфибий // Вестник зоологии. 2011. Т. 43, №. 4. С. 359–366.

Башлыкова Л.А. Наследование цитогенетических и молекулярно-клеточных эффектов в клетках костного мозга животных при хроническом воздействии ионизирующего излучения // Известия Самарского научного центра РАН. 2017. Т. 19 № 2(3). С. 420–425.

Бекиш В.Я., Колмогоров В.И., Побяржин В.В. Микроядерный тест в клетках мозга и семенников мышей линии СВА при гельминтозах // Вестник ВГМУ. 2003. Т. 2, №. 2. С. 67–72.

Гематология. Новейший справочник / Под ред. К.М. Абдулкадырова. СПб.: Изд-во Сова, 2004. 928 с.

Гольдберг Д.И. Гематология животных. Томск: Изд-во ТГУ, 1973. 182 с.

Жулева Л.Ю., Дубинин Н.П. Использование микроядерного теста для оценки экологической обстановки в районах Астраханской области // Генетика. 1994. Т. 30, № 7. С. 999–1004.

Игнатова И.В., Епринцев С.А., Калаев В.Н. и др. Оценка состояния среды водных экосистем в районе крупных горнодобывающих предприятий (на примере Павловского горно-обогатительного комбината) // Современные проблемы науки и образования. 2016. №. 6. С. 573–583.

Кармазин А.П., Пескова Т.Ю. Использование гематологических показателей озерной лягушки Rana ridibunda (Pallas 1771) для определения зоны токсического действия нефти // Современная герпетология. 2010. Т. 1, №. ½. С. 3–7.

Ковалева О.А. Цитогенетические аномалии в соматических клетках млекопитающих // Цитология и генетика. 2008. № 1. С. 58–72.

Красавин Е.А., Говорун Н.Л., Шмакова И.В. и др. Генетическое действие излучений с разными физическими характеристиками на клетки человека и млекопитающих // Физика элементарных частиц и атомного ядра. 2004. Т. 35, №. 6. С. 1–30.

Крюков В.И. Модифицирование импульсным электромагнитным полем индуцируемых свинцом частот микроядер в эритроцитах личинок бесхвостых амфибий // Экология. 2000. № 3. С. 238–240.

Манских В.Н. К вопросу о механизмах образования микроядер в соматических клетках бесхвостых амфибий в норме и при действии N-нитрозо-N-метилкарбамида // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2006. Т. 141, №. 2. С. 217–220.

Петров Р.В. Иммунология. М: Медицина. 1982. 308 с.

Побяржин В.В., Бекиш В.Я. Нарушения в геноме хозяина при экспериментальном гименолепидозе в зависимости от дозы введенного инвазионного материала при заражении // Вестник ВГМУ. 2003. Т.3, №. 4. С. 85–89.

Романова Е.Б., Шаповалова К.В., Рябинина Е.С. Лейкоцитарный состав крови и микроядра в эритроцитах амфибий загрязненных водных объектов Нижегородской области // Принципы экологии. 2018. № 2. С. 125–139.

Смирнова В.М., Макеев И.С., Благодаткин А.В. Метод комплексной оценки загрязненности поверхностных вод по гидрохимическим показателям. Определение удельного комбинаторного индекса загрязненности воды (УКИЗВ) и класса качества воды. Нижний Новгород, 2011. 19 с.

Хамидов Д.Х., Акилов А.Т., Турднева А.А. Кровь и кроветворение у позвоночных животных. Ташкент: Фан, 1978. 168 с.

Чертков И.Л., Фриденштейн А.Я. Клеточные основы кроветворения (кроветворные клетки-предшественники). М.: Медицина, 1977. 274 с.

Pincu M, Callisen H, Norman A. DNA content of micronuclei in human lymphocytes / Int. J Radiat Biol. 1985. Vol. 47. P. 423–432.

Carvalho W.F., Ruiz de Arcaute C., Perez-Iglesias J.M. et al. DNA damage exerted by mixtures of commercial formulations of glyphosate and imazethapyr herbicides in Rhinella arenarum (Anura, Bufonidae) tadpoles // Ecotoxicology. 2019. Vol. 28. P. 367–377.

Castle W., Minot G. Pathologic physiology and clinical description of the anemia. Oxford University Press. N.Y., 1936. 132 p.

Catalan J., Falck G.C. M., Norppa H. The X chromosome frequently lags behind in female lymphocyte anaphase // Am. J. Hum. Genet. 2000. Vol. 66. P. 687–691.

Charlemagne J. Methodological Aspects of the differentiation of blood elements in the Axolot Ambystome mexicanum Shawn // Z. Zellforsch. 1972. Vol. 123. P. 224–239.

Cliet I., Melcion C., Cordier A. Lack of productivity of bone marrow micronucleus test versus testis micronucleus test: comparison with four carcinogens // Mutat. Res. 1993. Vol. 292. P. 105–111.

Do Amaral D.F., Guerra V., Gonçalves A., et al. Ecotoxicity of nanomaterials in amphibians: A critical review // Science of the Total Environment. 2019. Vol. 686. P. 332–344.

Falck G.C. M., Catalan J., Norppa H. Nature of anaphase laggards and micronuclei in female cytokinesis-blocked lymphocytes // Mutagenesis. 2002. Vol. 17 (2). P. 111–117.

Norppa H., Falck G.C. M. What do human micronuclei contain? // Mutagenesis. 2003. Vol. 18 (3). P. 221–223.

Norppa H., Luomahaara S., Heikanen H. et al. Micronucleus assay in lymphocytes as a tool to biomonitor human exposure to aneuploidogens and clastogens // Environmental Health Perspectives Supplements. 1993. Vol. 101 (3). P. 139–143.

Nusse M, Kramer J. Flow Cytometric Analysis of Micronuclei Found in Cells After Irradiation // Cytometry. 1984. Vol. 5. P. 20–25.

Romanova E.B., Ryabinina E.S. Cytogenetic Approach to Primary Assessment of Habitat Quality // Opera Med Physiol. 2018. Vol. 4 (1). P. 19–22.

Yu Ma, Bo Li, Yang Ke, Yu Hui. Zhang Effects of low doses Trichlorfon exposure on Rana chensinensis tadpoles // Environmental Toxicology. 2019. Vol. 34. P. 30–36.

УДК 543.9:663:3664

ИММОБИЛИЗАЦИЯ БАКТЕРИЙ PARACOCCUS YEEI, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ АКТИВНОГО ИЛА, В ОРГАНОСИЛИКАТНЫЕ МАТРИЦЫ

О.А. Каманина, Е.А. Ланцова, М.С. Тимошина

Тульский государственный университет, Тула, Россия

Бытовая и производственная деятельность человека вызывают все большее загрязнение водных объектов рек, озер, водохранилищ, морей. Для обеспечения эффективных мер экологического контроля и дезактивации загрязнений разрабатывают методы и оборудование для быстрой и чувствительной оценки степени загрязнения воды. Одним из наиболее широко используемых показателей для мониторинга загрязнителей в водной среде является биохимическое потребление кислорода (БПК), то есть количество растворенного кислорода (в мг), необходимое для окисления всех биодеградируемых органических соединений, которые происходят в 1 дм^3 воды.

Обычный метод определения БПК является известный как $БПК_5$ представляет собой сложную и трудоемкую процедуру, включающую пятидневную инкубацию, а также требует значительного опыта и навыков для получения воспроизводимых результатов [1]. В этом контексте значительное внимание уделяется разработке экспресс-методов определения БПК с использованием биосенсорных анализаторов, основанных на применении микроорганизмов, способных метаболизировать широкий спектр органических соединений, что позволит провести интегральную оценку плотности загрязнения, значительно повысить операционную эффективность анализа и снизить его стоимость [2].

Для оценки общего количества органических примесей в природных и сточных водах целесообразно применение низкоселективных микробных сенсоров, например, на основе активного ила водоочистного предприятия, адаптированных к химическому составу тестируемых сточных вод, которые позволяют производить оценку индекса БПК. Однако БПК-биосенсоры на основе активного ила нестабильны в работе, так как биоценоз активного ила может меняться с течением времени. Поэтому эффективно в качестве биораспознающего материала для БПК-сенсора применять чистую культуру микроорганизмов, выделенных из активного ила. Это будет способствовать более эффективной биодеградации содержащихся в пробе органических соединений за счет расширения спектра окисляемых субстратов, и обеспечивать устойчивость биоматериала к воздействию негативных факторов окружающей среды и высокую стабильность рецепторного элемента.

Для повышения стабильности рецепторного элемента используют различные методы иммобилизации биоматериала. Одним из современных подходов для иммобилизации микроорганизмов является их микрокапсулирование, т. е. получение структур, представляющих собой клетки, окруженные полупроницаемой оболочкой [3].

Для получения таких материалов часто применяют золь-гель метод, который не требует энергоемкого, дорогостоящего оборудования, является экономичным и экологически чистым, а самое главное, реакции золь-гель синтеза протекают в мягких условиях, что важно для иммобилизации живых клеток микроорганизмов [4].

Ранее в нашем научном коллективе установлена возможность инкапсулирования дрожжей в органосиликатные матрицы с использованием золь-гель технологий, как способа получения стабильных гетерогенных биокатализаторов БПК-биосенсоров [5]. Впервые показано, что дрожжевые клетки участвуют в самоорганизованном формировании архитектуры гибридного материала, и в определенных условиях образуется структура «клетки в оболочке». Однако пока выявлены не все параметры и условия для направленного формирования таких структур.

При использовании поливинилового спирта (ПВС), как структуроуправляющего агента в золь-гель синтезе органомодифицированных материалов, возможно образование органосиликатных пленок благодаря способности ПВС формировать гидрогели. Однако оставалось неизвестным, возможно ли образование оболочки вокруг клеток микроорганизмов, выделенных из активного ила бактерий Paracoccus yeei ВКМ В-3302 (P. yeei). Поэтому в работе провели иммобилизацию бактерий P. yeei в золь-гель матрицы различного состава и оценили морфологию получаемых биокатализаторов на основе иммобилизованных бактерий.

В работе были сформированы 7 гетерогенных биокатализаторов на основе клеток бактерий Paracoccus yeei, выделенных из активного ила, иммобилизовнных в органосиликатную матрицу при использовании в качестве структуроуправляющего агента ПВС с различным соотношением тетраэтоксисилана (ТЭОС) и метилтриэтоксисилана (МТЭС): № 1 – 100/0, № 2 – 75/25, № 3 – 60/40, № 4 – 50/50, № 5 – 40/60, № 6 – 25/75 и № 7 – 0/100. С помощью оптической микроскопии в работе визуализировали морфологию органосиликатной матрицы в системах с различным содержанием МТЭС при использовании в качестве структуроуправляющего агента ПВС.

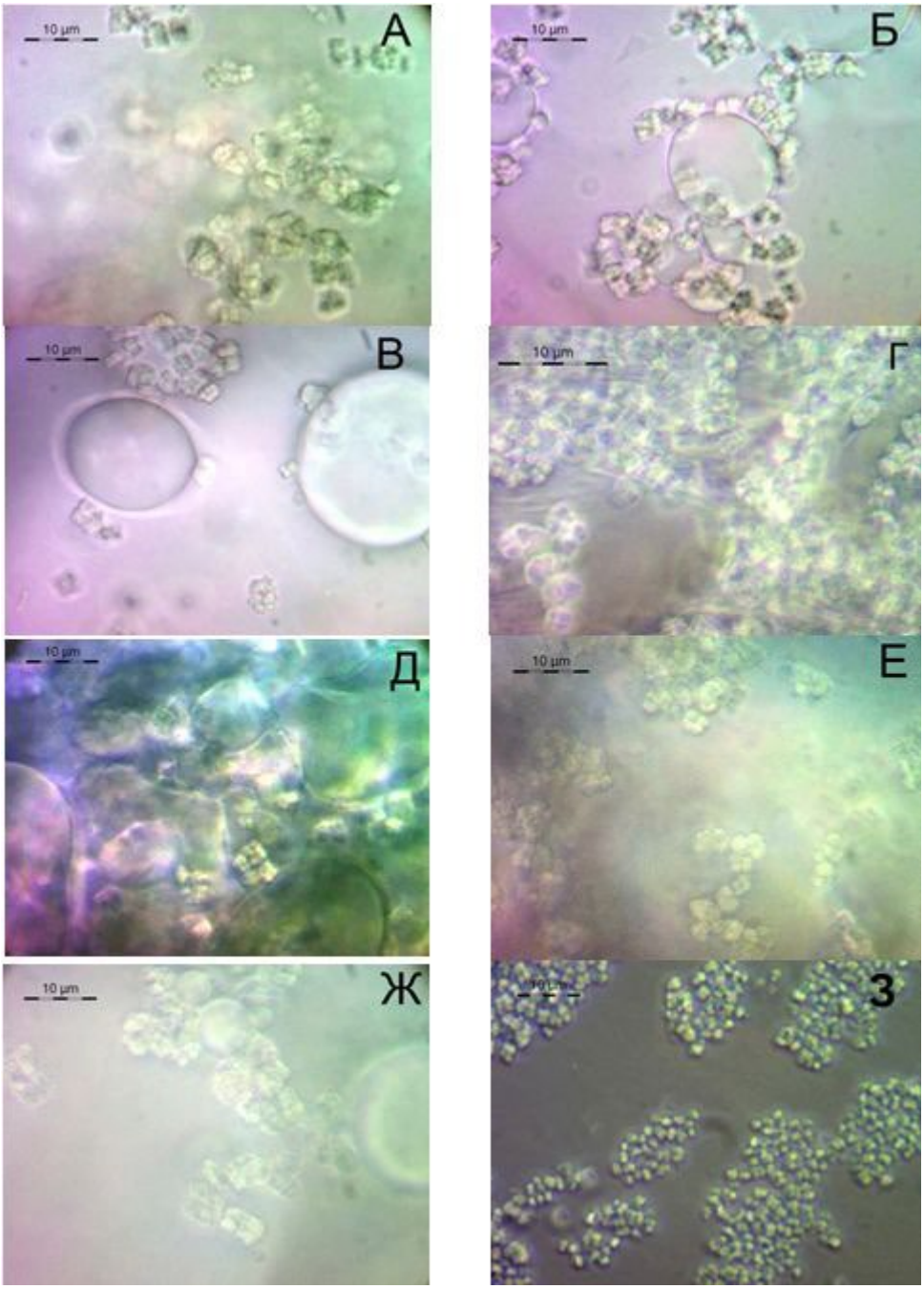


Рис. 1. Фотографии иммобилизованных бактерий в золь-гель матрицы, полученные с помощью оптической микроскопии с соотношением ТЭОС/МТЭС: А – 100/0; Б – 75/25; В – 60/40; Г – 50/50; Д – 40/60; Е – 25/75; Ж – 0/100; З – чистая культура бактерий Paracoccus yeei

При формировании матрицы с иммобилизованными бактериями Paracoccus yeei с соотношением силановых прекурсоров ТЭОС/МТЭС 100/0, 75/25, 60/40, 50/50, 40/60, 25/75 и 0/100 уменьшается плотность матрицы, что связано с увеличением концентрации гидрофобной добавки. Из рисунка 1а видно, что структура матрицы без гидрофобной добавки наиболее плотная, при увеличении содержания МТЭС появляются сферические частицы размером до 25 мкм. При формировании матрицы с соотношением силановых прекурсоров ТЭОС/МТЭС 25/75 и 0/100 формируется рыхлая матрица, из которой могут вымывать клетки микроорганизмов. Однако при использовании матрицы с соотношением ТЭОС/МТЭС 50/50 и 40/60 на поверхности сферических частиц находятся, по-видимому, инкапсулированные клетки микроорганизмов. Возможно, при этих соотношениях происходит наиболее эффективная иммобилизация бактерий, но это требует дополнительных исследований.

В дальнейшем необходимо определитьаналитические и метрологические характеристики биосенсора на основе разработанных гетерогенных биокатализаторов, полученных при иммобилизации в различные золь-гель матрицы бактерий P. yeei. А также оценить защитные функции образующейся капсулы вокруг бактерий Paracoccus yeei ВКМ В-3302, выделенных из активного ила.

Работа выполнена в рамках Государственного Задания
МИНОБРНАУКИ РФ (№ 0824_2019–0007).

ЛИТЕРАТУРА

ПНД Ф 14.1:2:3:4.123–97 Количественный химический анализ вод. Методика выполнения измерений биохимической потребности в кислороде после n-дней инкубации (БПКполн.) в поверхностных пресных, подземных (грунтовых), питьевых, сточных и очищенных сточных водах

Ohshima H. On the electrophoretic mobility of biological cells / H. Ohshima, T. Kondo // Biophis. Chem. – 2001. V. 39, P. 191–198.

S. Rathore, P.M. Desai // Microencapsulation of microbial cells // Journal of Food Engineering. – 2013. V. 116, P. 369–381.

M. Blondeau, T. Coradin // Living materials from sol–gel chemistry: current challenges and perspectives // Journal of Materials Chemistry 2012, V. 22(42), P. 335–343.

О.Н. Понаморева, Е.Л. Афонина, О.А. Каманина, Д.Г. Лаврова, В.А. Арляпов, В.А. Алферов, А.М. Боронин // Дрожжи Debaryomyces hansenii в органосиликатной оболочке как основа гетерогенного биокатализатора // Журнал Биотехнология 2017, Т. 33, No 4, С. 44–53

УДК 620.95

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИМЕРНОЙ МАТРИЦЫ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ БИОАНОДОВ ТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ

С.В. Алферов, Н.А. Клименова

Тульский государственный университет, Тула, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Одним из актуальных направлений при поиске путей замещения ископаемых энергоносителей и снижения экологической нагрузки на окружающую среду является разработка альтернативных источников энергии – биотопливных элементов (БТЭ), в которых осуществляется преобразование химической энергии различных веществ в электрическую в процессе биологических трансформаций. Эффективность работы БТЭ напрямую зависят от способа иммобилизации биокатализатора на поверхности электрода. В большинстве разработанных к настоящему времени БТЭ биоматериал закрепляется на электроде путем адсорбции или формируется биопленка. Внедрение микроорганизмов в полимерные гели позволяет сохранить активность ферментных систем, увеличить срок службы биоанодов, а также защитить клетки от воздействий внешних факторов. Создание прочных проводящих полимерных матриц возможно на основе хитозана, модифицированного нейтральным красным [1]. Таким образом целью данной работы являлась разработка биоанода на основе бактерий Gluconobacter oxydans, иммобилизованных в проводящую матрицу на основе модифицированного хитозана.

Хитозан – это высокомолекулярный полимер глюкозамина, деацетилированная форма широко распространенного в природе полимера хитина. Обычно коммерчески доступный хитозан имеет степень деацетилирования около 80–90 %, то есть обладает достаточным количеством аминогрупп для растворения в водных растворах кислот, таких как уксусная, муравьиная и молочная, в которых не растворим хитин [2]. Хитозан обладает прекрасной способностью к пленкообразованию и адгезии, высокой биосовместимостью и биоразлагамостью, нетоксичен.

Нейтральный красный является диазиновым красителем, участвует в двухэлектронном переносе. Ранее было показано, что данный медиатор способен ковалентно пришивается к графитовому электроду при помощи амидной связи между карбоксильной группой на поверхности электрода и аминогруппой красителя. Таким образом, для нейтрального красного предпочтительнее использование его иммобилизованным на поверхности анода, а не в растворе, в том числе в составе полимерных матриц, что является перспективным при разработке биотопливных элементов и биосенсоров на основе графитового электрода [3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали бактерии Gluconobacter oxydans subsp. industrius (ВКМ В-1280) (Всероссийская коллекция микроорганизмов, ИБФМ РАН). Культивирование бактерий проводили на питательной среде, следующего состава: D-сорбит – 200 г./л; дрожжевой экстракт – 20 г./л; дистиллированная вода – 100 мл, pH среды – 5,2–5,5, при температуре 28° С, в течение 18–20 часов. После культивирования клетки собирали центрифугированием при 10000 об/мин 10 мин. и отмывали двукратно 20 мМ натрий-фосфатным буфером с pH 6,0. Осевшие клетки ресуспендировали в новой порции буфера и центрифугировали 10 мин при 10000 об/мин. Полученные осадки подсушивали на воздухе в течение часа, и замораживали для длительного хранения при температуре -15° С.

Ячейка биотопливного элемента представляла собой две взаимосвязанных кюветы, объём анодного отделения был равен объему катодного и составлял 3 мл. Электродами служили графитовые стержни диаметром 8 мм, площадь рабочей поверхности электродов составляла 300 мм^2. Высота погружения электродов в раствор – 10 мм. Камеры разделяли протонселективной мембраной МФ-4СК («Пластполимер, Санкт-Петербург, Россия).

В качестве фонового раствора использовали 30 мМ натрий-фосфатный буфер pH = 6,0, в качестве субстрата биоокисления использовали глюкозу с концентрацией в кювете 10 мМ.

Измерения потенциала проводили с помощью гальванопотенциостата IPC Micro ("Вольта", Россия). Регистрацию ответов на добавку субстрата в измерительную ячейку начинали после установления стационарного состояния электрода. Оценку электрических характеристик производили после достижения стационарного значения генерируемого потенциала. Измеряемым параметром в процессе биокаталитического окисления субстрата в режиме генерации потенциала являлась величина разности потенциалов за время проведения эксперимента.

Для получения проводящей матрицы на основе хитозана 30 мг клеток бактерий G. oxydans перемешивали с раствором хитозана и нейтральным красным, полученную суспензию наносили на графитовый электрод (высота нанесения 1 см).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Производительность биотопливного элемента в первую очередь зависит от эффективности и устойчивости биокатализатора. Иммобилизация биоматериала играет важную роль в сохранении активности биологических объектов, а также дает возможность многократного использования электродов в условиях биотопливного элемента. Иммобилизация клеток, содержащих специфические ферменты, устраняет необходимость длительных и дорогостоящих процедур разделения и очистки ферментов. Для иммобилизации можно использовать различные полимерные органические матрицы. При выборе полимерной матрицы необходимо учитывать особенности распределения в ней микробных клеток. Равномерное распределение клеток позволяет увеличить их площадь контакта с электродом, следовательно, генерируемый потенциал в такой системе теоретически должен быть выше, чем при образовании конгломератов клеток в матрице. Этим качествам отвечает матрица на основе хитозана. В настоящей работе данная матрица, модифицированная медиатором нейтральным красным, была использована для иммобилизации целых клеток бактерий G. oxydans.

На первом этапе был произведен подбор количества хитозана, при котором генерируется максимальный потенциал и матрица наиболее стабильна. 1 % раствор хитозана в 1 % уксусной кислоте использовался в количестве 5, 10, 15, 20 и 25 мкл, все остальные параметры оставались постоянными. Оценка потенциала производилась при приложенном внешнем сопротивлении 150 кОм, полученный вид зависимости представлен на рисунке 1.

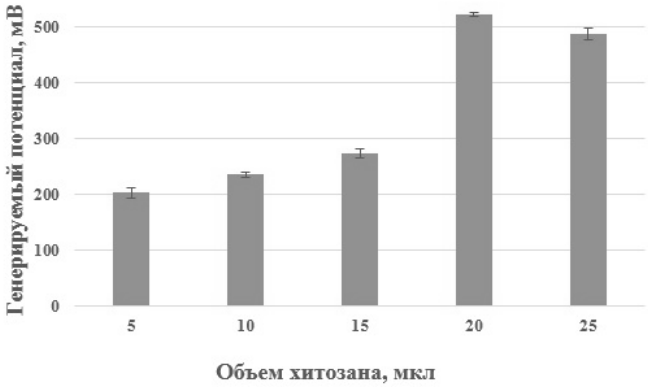


Рис. 1. Зависимость величины генерируемого потенциала от количества полимерного хитозана, модифицированного нейтральным красным в макете БТЭ на основе клеток G. oxydans

Таким образом оптимальное количество смеси хитозана с нейтральным красным, применяемой для иммобилизации, составляет 20 мкл. При этом генерируемый потенциал в макете БТЭ при использовании внешнего сопротивления 150 кОм составил 520 ± 10 мВ.

Важнейшими характеристиками БТЭ являются мощность и долговременная стабильность биоанода. Мощность позволяет оценить возможность применения БТЭ в качестве источника электропитания. Для достижения максимальных значений мощности необходимо учитывать сопротивление, эффективность медиатора электронного транспорта, рабочую поверхность анода и др. Определение максимальной мощности производили методом пика в макете БТЭ на основе целых клеток G. oxydans, иммобилизованных в хитозан совестно с нейтральным красным, при приложенном внешнем сопротивлении в интервале от 10 до 200 кОм. Полученные данные представлены на рисунке 2.

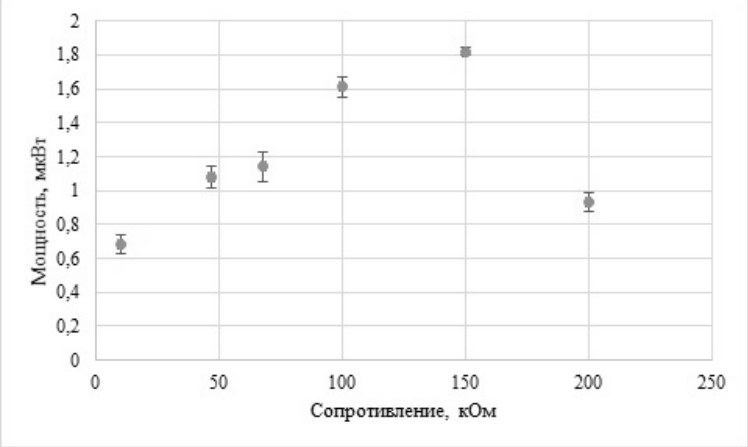


Рис. 2. Зависимость мощности БТЭ от внешнего сопротивления при иммобилизации клеток G. oxydans в хитозан, модифицированный нейтральным красным

Пик мощности, генерируемой в данной системе БТЭ наблюдается при приложенном внешнем сопротивлении 150 кОм: P_{max} = 1,8 ± 0,1 мкВт. Значение мощности БТЭ недостаточно полно отражает эффективность изучаемого элемента. Для сравнения и описания разработанных моделей БТЭ рекомендуется использовать понятие удельной мощности, т. е. нормированной к единице поверхности [4]. Значение удельной мощности в исследуемом макете БТЭ составило 6,1 ± 0,2 мВт/м^2.

Долговременная стабильность характеризует устойчивость работы электрода в течение длительного периода времени. За время стабильной работы иммобилизованного электрода принимается время, в течение которого величина генерируемого потенциала составляла не менее 50 % от первоначальной активности. Долговременную стабильность определяли путём ежедневного измерения величины генерируемого потенциала при добавлении 30 мкл раствора глюкозы (концентрация в анодном отделении 10 ммоль/л). Между измерениями электроды хранились в буферном растворе в холодильнике. Для электрода на основе полимерной матрицы хитозана падение потенциала на 50 % от первоначального значения происходит на четвертые сутки. Не смотря на не высокие значение долговременной стабильности, электроды на основе модифицированного хитозана показывают значительно увеличение величин генерируемого потенциала и мощности БТЭ относительно разработанных ранее макетов на основе бактерий G. oxydans [5].

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания Минобрнауки № 0824_2019–0007.

ЛИТЕРАТУРА

Скрябин К.Г. Хитин и хитозан, получение, свойства, применение // М.: Наука, 2002 – С. 368.

Новочадов В.В., Семенов П.С., Лябин М.П., Гайфуллин Н.М. Бесклеточная матрица на основе хитозана с повышенными хондроиндуктивными совйствами // Вестник новых медицинских технологий 2012 В. 10 С. 54–57.

Kaipeng Wang, Yuwen Liu, Shengli Chen Improved microbial electrocatalysis with neutral red immobilized electrode // Journal of Power Sources – 2011 – V. 196 – P. 164–168.

Logan E. Microbial fuel cells // John Willey & Sons – 2008.

С.В. Алферов П.Р. Минайчева, В.А. Арляпов, Л.Д. Асулян, В.А. Алфёров, О.Н. Понаморёва, А.Н. Решетилов. Биоанод для микробного топливного элемента на основе бактерий Gluconobacter oxydans, иммобилизованных в полимерную матрицу // Прикладная биохимия и микробиология. Т. 50. № 6. 2014 – С. 570–577.

УДК 631.422

FORMS OF CADMIUM COMPOUNDS IN SOILS CONTAMINATED BY EMISSIONS FROM NOVOCHERKASSK POWER STATION

V.A. Chaplygin, T.M. Minkina, S.S. Mandzhieva, S.N. Sushkova, T.S. Dudnikova, T.V. Bauer, I.V. Zamulina, N.P. Chernikova, D.V. Bren, I.P. Lobzenko

Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia

INTRODUCTION

The identification of the heavy metals (HM) compounds in the soil and their bonds with different soil components is the basic tool for studying the small geochemical cycles of elements in landscapes of technogenic zones [3, 6]. There is available published information by now about the concentrations of different HM compounds in soils obtained mostly using the methods of their extraction fractionating [11]. They allowed answering some ecologically important questions and revealing the understudied problems. The capability of these methods to reveal the regional particularities of the studied soils is important. However, the information about the importance of particular soil components in the HMs retention is insufficiently complete. The integration of the available literature data on the soil absorbing capacity relative to the HM is difficult particularly because of the diversity of the methods used for their extracting and the difference between the properties of the studied soils, including their regional features [4, 7].

The soils of the Lower Don Region (Russia) are especially noteworthy because of the complex anthropogenic impact on them. The region is the country's biggest producer of agricultural products and an industrial juggernaut. The enterprises of the mining and processing industry, the power industry, and the metallurgy industry are active sources of environmental pollution with HM. The emissions of the Novocherkassk power station (NPS) comprise up to 1 % of the total pollutant emissions to the atmospheric air of Russia and up to 99 % of the aerosol emissions in Rostov oblast. The atmospheric emissions contain soot (more than 30 t/year), vanadium pentoxide (about 8 t/year), iron oxides (more than 5 t/year), chromic anhydride (about 0.1 t/year), etc. The concentrations of Cd in Novocherkassk city air exceed the allowable levels of these metals [2].

These facts determined the goals of our work: to study the regularities of the formation and transformation of Cd compounds in the soils of the NPS environs.

MATERIALS AND METHODS

The studied objects were represented by the soils of monitoring plots subjected to the influence of the NPS emissions. The monitoring plots were established at different distances from the NPS (1.0 – 20.0 km) in 2000 (Fig. 1). A relatively greater number of plots were arranged in the "main direction" from the NPS according to the wind direction to the north-west of the pollution source through the residential areas of the city of Novocherkassk (plots 4, 5, 6, 8, 9, and 10).

The plots for monitoring the observations are situated on virgin lands or fallow lands, and the soil cover of these plots is mostly composed of Chernozems Calcic. Plot 2 is occupied by a sandy Fluvisols Umbric, and plot 3, which is situated on the floodplain only 300 m away from plot two, by a light clay Phaeozems Calcaric. The soils in plots 6 and 8 are heavy loamy Phaeozems Calcaric ones. The soil samples for studying the soil properties and the concentrations of the HM compounds were taken yearly from the depth of 0–20 cm. The soil reaction was slightly alkaline (pH 7.2–7.7), and the carbonate concentrations made up 0.2–0.7 %. The studied soils differed in their particle-size composition. The chernozems Calcic and Phaeozems Calcaric developed on loess-like loams were heavy loamy, and the Fluvisols Umbric on alluvial deposits had a light texture. The light clayey Phaeozems Calcaric soil on the alluvial deposits had maximal contents of clay and silt. The content of humus in these soils did not strongly vary (4.2–4.8 %), except for the sandy Fluvisols Umbric (2.9 %). They were also characterized by low a cation exchange capacity (CEC), namely, 10 mmol (+) / 100 g soil.

According to the bonding strength, two groups of HM compounds in the soils under study were singled out: HMs strongly bound to the soil (SB) and those LB to the soil (LB). However, the metal compounds in each of these groups are dissimilar as well, because they are retained by soil components by means of different binding mechanisms. The parameters of the fractional-group composition of the HM in the studied soils were investigated using combined scheme for fractioning the HM compounds [10]. When analyzing them, we focused on the proportion between the metal compounds firmly and loosely bound with the soil components, which determined the ecological consequences of the soil contamination with metals.

The application of a combined fractionating procedure allows determining the heterogeneous composition of the metal compounds firmly and loosely bound with the soil components. They are retained by these components through different mechanisms and represent different fractions. The metal concentrations in these fractions were found with analytical methods and by calculation (Table 1). The metal concentrations in the soil extracts were determined with atomic absorption spectrophotometry (AAS). The total content of the metals loosely bound with the soil components was found as the sum of the exchangeable, complex, and absorbed specifically by the carbonates and iron (hydro) oxides fractions; the content of the firmly bound compounds was found as the sum of the metals firmly retained by the organic substances, iron (hydro) oxides, and silicates. The proportions were calculated between the fractions of the metals that represented the groups of firmly and loosely bound compounds and between the loosely and firmly bound metals in the soil as a whole (LB/FB).

RESULTS AND DISCUSSION

The total content of Cd in the soils of plots 9 and 10 (0.2–0.3 mg/kg) (Table 2) 15–20 km away from the source of the pollution was close to its Clarkes by Vinogradov [8] (0.5 mg/kg) and to the regional background (0.3 mg/kg) levels [1, 2].

The distance of the points of the sampling and the wind direction are the main factors of the formation of the Cd content in the soils around the Novocherkassk Power Station. The total content of Cd in plots 4 and 5 (1.2–1.6 km to the northwest of the source of the pollution) was the most increased (5 – 6 times) in comparison with the background soils (Table 2). All the studied soils located 1–5 km away from the NPS were classified as contaminated ones, and the total contents of the Cd in these soils significantly exceeded their concentrations in the uncontaminated soils.

The compounds of Cd in the uncontaminated soils were obviously dominated by the firmly bound ones, the portion of which comprised 90–93 % of the total content the metal (Table 2). This was determined mostly by the Cd fixed within the structures of the silicates (the metal portion comprised 69–72 % of the total reserve of the firmly bound compounds of Cd in the soil). The concentrations of the loosely bound metal compounds sharply increase in the contaminated soils, and the absolute concentrations increased more pronouncedly than the relative values.

An especially high increase of the concentrations of the loosely bound metal compounds was observed in the soils with the maximum technogenic loads (plots 4 and 5). The portion of the loosely bound Cd forms increased maximally (up to 48 %) in the contaminated soils of plots 4 and 5 and even slightly exceeded the concentrations of the firmly retained metal compounds. The increase of the relative content of the loosely bound Cd forms was even lower in the soils 5 km away from the NPS (up to 31 %).

The fractional-group composition of the HM compounds demonstrated which fractions of the HM soil contamination were responsible for the increase of the HM concentrations in every group of the loosely and firmly bound compounds. The participation of silicates in the formation of the firmly bound compounds of the Cd was weak, and their portion decreased in some soils to 36 – 49 % of the firmly retained metals.

Table 1. Combined fractionation of metal compounds in the soil

Parameter	Determination method	
	experimental	calculation (from the difference between the HM contents in extracts)
1. Exchangeable metal compounds:		
Total	1 N NH_4 Ac, pH 4.8	
Easily exchangeable	1 M $MgCl_2$	
Difficultly exchangeable		Difference 1 N NH_4 Ac – 1 M $MgCl_2$
2. Metals bound to carbonates and occurring as separate phases:		
Total	No method	
Loosely bound (specifically sorbed)	1M $NaCH_3$ COO, pH 5	
Firmly bound (coprecipitated, occluded, chemisorbed, precipitates of low-soluble HM compounds)	No method	
3. Metals bound to Fe, Al, and Mn nonsilicate compounds:		
Total	0.04 M NH_2 OH×HCl	
Loosely bound (specifically sorbed)		Difference (1 N HCl – 1 N NH_4 Ac) – 1 M $NaCH_3$ COO
Firmly bound (occluded) (except Mn oxides)		Difference 0.04 M NH_2 OH · HCl – (1 N HCl – 1N NH_4 Ac – 1 M $NaCH_3$ COO)
4. Metals bound to organic matter:		
Total	30 % H_2 O_2	
Loosely bound (complexes)		Difference (1 % EDTA in 1 N NH_4 Ac) – 1 N NH_4 Ac
Firmly bound (chelates)		Difference 30 % H_2 O_2 – 1 % EDTA
5. Metals strongly bound to silicates	HF + $HClO_4$ extract from the residual soil fraction (after all extractions)	Difference between the total element content in the soil and the total content of all fractions (except the residual fraction)

Iron (hydro) oxides were the most active in the tight retention of the Cd in the contaminated soils, their participation increased in particular cases (plots 2 and 8) by more than two times in comparison with the uncontaminated soils. The participation of organic substances in the Cd retention practically did not change in the course of the soil contamination. The contributions of the Fe (hydro) oxides and organic matter were practically equal for Cr.

As for the fractional composition of the metal compounds loosely bound with the soil components, the data of Table 2 confirmed the regularity found for the changes of the LB/FB ratio of the HM compounds caused by the soil contamination. The soil contamination with metals proved to be accompanied by the increasing contribution to the formation of the loosely bound compounds, which are characterized by higher mobility.

Table 2. Total content and fractional-group composition of the Cd in the soils of the monitoring plots

Plot number; distance (km) and direction from the NPS	Total content, mg/kg	LB*/FB**	LB, % of the concentration in the group				FB, % of the concentration in the group		
			exchangeable	complex	specifically sorbed on carbonates	Fe and Mn (hydro) oxides	Organic substances	Fe (hydro) oxides	silicates
1. 1.0 NE	0,6	41/59	9	4	65	22	6	30	64
2. 3.0 SW	0,4	42/58	10	0	85	5	7	57	36
3. 2.7 SW	0,5	33/67	6	6	82	6	6	36	58
4. 1.6 NW	1,0	47/53	22	4	54	20	10	25	65
5. 1.2 NW	1,3	48/52	29	5	45	21	11	27	62
6. 2.0 NNW	1,0	44/56	22	7	53	18	16	26	58
7. 1.5 N	0,7	42/58	8	4	80	8	8	22	70
8. 5.0 NW	0,6	31/69	0	7	72	21	6	45	49
9. 15.0 NW	0,3	7/93	0	0	50	50	8	23	69
10.20.0 NW	0,3	10/90	0	0	50	50	11	17	72

*Group of the loosely bound compounds;**Group of the firmly bound compounds

The composition of the loosely bound metal compounds in the uncontaminated soils is dominated by the specifically absorbed forms; their portion for Cd exceeded 78 %. The carbonates had the maximum effect on the formation of the specifically absorbed Cd compounds reserves: the portion of Cd retained by the carbonates was in some cases almost an order of magnitude (7 times) higher than the fraction of the metal loosely bound with the iron (hydro) oxides.

The sharp increase in the contaminated soil of the content of exchangeable Cd is worth noting. The share of the exchangeable Cd compounds in the formation of the group of loosely bound compounds in the most contaminated soil increased almost by 30 times. Ecologically dangerous consequences of the soil contamination with Cr can be connected with the increase of its loosely bound with the carbonated forms in the contaminated soils.

CONCLUSION

The information capacity was proved of the results of the combined fractionation method of the metal compounds in soils. The obtained results allowed revealing the regularities of the Cd compounds formation in the uncontaminated soils around the NPC. The firmly bound forms predominately in the silicates predominate among the Cd compounds in the uncontaminated soils. The loosely bound compounds of metal were dominated by the least mobile specifically absorbed forms. The total contents of Cd increased in the soils contaminated with the emissions of the NPS by 1.4–6 times, and this increase was accompanied by a sharp increase of their mobility. The portion of its loosely bound compounds increased by 6 times and reached almost 50 % of the total content of this metal.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the President of the Russian Federation (grant no. MK-2818.2019.5), Russian Foundation for Basic Research (grant no. № 19–29–05265mk)

REFERENCES

Agafonov, E.V., 1994. Heavy Metals in Chernozems of Rostov Oblast. In Heavy Metals and Radionuclides in Agroecosystems. Moscow, pp. 22–26 [in Russian].

Belousova, N.V., 2001. Ecology of Novocherkassk. Problems and Solutions. Rostov-on-Don [in Russian].

Kirkham M.B., 2006. Cadmium in plants on polluted soils: Effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments, Geoderma. 137, 19–32.

Ladonin, D.V., Karpukhin, M.M., 2011. Fractional Composition of Nickel, Copper, Zinc, and Lead Compounds in Soils Polluted by Oxides and Soluble Metal Salts. Eur. Soil Sci. 44 (8), 874–885.

Methodological Guidelines on Determination of Heavy Metals in Agricultural Soils and Crop Produce. 1992. Moscow [in Russian].

Minkina, T.M., Motuzova, G.V, Nazarenko, O.G., Mandzhieva, S.S., 2009. Group composition of heavy metal compounds in the soils contaminated by emissions from the Novocherkassk Power Station. Eur. Soil Sci. 42 (13), 1533–1542.

Minkina, T.M., Motuzova, G.V., Nazarenko, O.G., Kryshchenko, V.S., Mandzhieva, S.S., 2008. Combined Approach for Fractioning Metal Compounds in Soils. Eur. Soil Sci. 41 (11), 1171–1179.

Nosovskaya, I.I., Solov'ev, G.A., Egorov, V.S., 2001. The Effect of the Long-Term Regular Application of Mineral Fertilizers and Manure on the Accumulation of Pb, Cd, Ni, and Cr in Soils and Interfarm Budget of the These Elements. Agrokhimiya. 1, 82–91 [in Russian]

Protasova, N.A., Gorbunova, N.S., 2006. Forms of Ni, Pb, and Cd Compounds in Chernozems of the Central Chernozemic Region. Agrokhimiya. 8, 68–76 [in Russian].

Vinogradov, A.P., 1957. Geochemistry of Rare and Dispersed Elements in Soils. Moscow [in Russian].

Tlustos, P., Szakova, J., Starkova, A., Pavlikova, D., 2005. A Comparison of Sequential Extraction Procedures for Fractionation of Arsenic, Cadmium, Lead, and Zinc in Soil. Central European Journal of Chemistry. 3(4), 830–851.

УДК 66.094.3.098.

СТРАТЕГИЯ РАЗРАБОТКИ БИОМАТЕРИАЛОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЭЛЕКТРОДОВ

Н.В. Лакина, В.Ю. Долуда, В.Г. Матвеева, Э.М. Сульман

Тверской государственный технический университет, Тверь, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Одним из перспективных направлений в развитии биоэнергетики является создание биотопливных элементов на основе ферметных электродов. Поэтому исследование эффективности процессов иммобилизации ферментов и их стабилизации имеет практическую направленность. Иммобилизация и стабилизация ферментов на электродах является критическим этапом для разработки биотопливных элементов [1, 2]. Так во многих исследованиях с прямым переносом электронов использовалась адсорбция для иммобилизации фермента [3]. Хотя прямая адсорбция ферментов доказала концепции биоэлектрокатализа, но этот метод не является эффективным для стабилизации поверхностных пленок, поскольку фермент может легко вымываться во время использования. Одним из наиболее широко применяемых ферментов является пероксидаза (КФ 1.1.11.7) [4]. Исследование неорганических носителей в качестве адсорбентов ферментов для приготовления промышленных гетерогенных биокатализаторов является актуальным направлением, поскольку неорганические носители обладают очевидными преимуществами перед органическими, а именно, эти носители относительно дешевы и доступны; имеют высокую механическую прочность и низкое гидродинамическое сопротивление; инертны и устойчивы в водных средах; и, что особенно важно, свойства неорганических носителей, их геометрическая форма, текстурные характеристики, химические свойства и морфология поверхности варьируются в очень широком диапазоне. Тем не менее, не более ¼ всех научных и прикладных работ посвящено использованию данных носителей для иммобилизации ферментов [5].

В данной работе исследуются методы иммобилизации пероксидазы на определенные виды стекла и керамику, с целью дальнейшего создания ферментных электродов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для чистоты эксперимента стекла и керамику отмывают гексаном (чда) от пыли и других, загрязняющих носитель, веществ; промывают дистиллированной водой и сушат при 30 °С. Затем отбирают 4 пробы по 9 носителей. С каждой пробой проводят следующие процедуры:

1 проба: берут 3 образца стекла и высушивают в муфельной печи, в течение суток, при следующих температурах: 120, 300, 600 ºС.

2 проба: 3 образца стекла помещают в тигли с NH_4 Cl. Носители высушивают в муфельной печи, в течении суток, при следующих температурах: 120, 300, 600 ºС.

3 проба: 3 образца стекла помещают в тигли с силаном, таким образом, чтобы стекла были покрыты этим реактивом. Носители высушивают в муфельной печи, в течении суток, при следующих температурах: 120, 300, 600 ºС. После прокаливания носители промывают изопропиловым спиртом и высушивают при 30 ºС

4 проба: 3 образца стекла помещают в тигли с NH_4 Cl. Носители высушивают в муфельной печи, в течение суток, при следующих температурах: 120, 300, 600 ºС. Затем стекла заливают силаном и прокаливают при той же температуре соответственно. После прокаливания носители промывают изопропиловым спиртом, водой и высушивают при 30 ºС. После сушки пробы помещают в эксикатор.

Для нанесения пероксидазы корня хрена на неорганические носители использовали обработку различными сшивающими агентами с последующем нанесением фермента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Активность иммобилизованных ферментных образцов оценивали по константе Михаэлиса. Полученные данные представлены на рисунке 1.

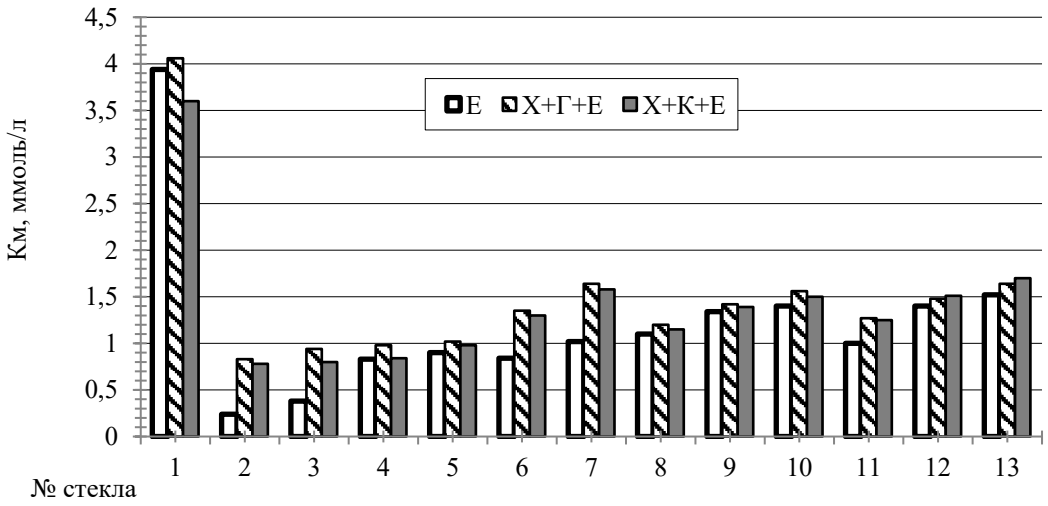


Рисунок 1 – Зависимость эффективности иммобилизации фермента от способов обработки образцов стекла и керамики

Из представленных диаграмм видно, что в серии экспериментов с непрокаленным носителем для иммобилизации фермента наименее активной является иммобилизованная ферментная система № 2, № 3, № 4. Она приготовлена путем последовательного нанесения хитозана, глутарового альдегида, пероксидазы, без предварительной обработки неорганических образцов.

Из серии экспериментов с носителем прокаленным при 120^0 С наиболее активной иммобилизованной системой являются № 5, № 8, № 11. № 5 приготовлен путем обработки раствором хитозана, глутаровым альдегидом и пероксидазой; № 8 приготовлен путем обработки носителя NH_4 Cl, хитозаном, глутаровым альдегидом, пероксидазой; № 11 приготовлен путем обработки носителя силаном, хитозаном, глутаровым альдегидом, пероксидазой; № 13 приготовлен путем обработки носителя силаном, NH_4 Cl, хитозаном, глутаровым альдегидом, пероксидазой.

Из серии экспериментов с носителем прокаленным при 300^0 С наиболее активной иммобилизованной системой являются № 10, № 11, № 12 и № 13. Образцы № 10 приготовлены путем обработки раствором хитозана, глутаровым альдегидом и пероксидазой; № 11 приготовлен обработкой NH_4 Cl, хитозаном, глутаровым альдегидом, пероксидазой; № 12 приготовлен путем обработки носителя силаном, хитозаном, глутаровым альдегидом, пероксидазой; № 13 приготовлен обработкой силаном, NH_4 Cl, хитозаном, карбодиимидом, пероксидазой.

Из серии экспериментов с носителем прокаленным при 600^0 С наиболее активной иммобилизованной системой являются № 7, № 10, № 12 и № 13. № 7 приготовлен путем обработки раствором хитозана, глутаровым альдегидом и пероксидазой; № 10 приготовлен путем обработки носителя NH_4 Cl, пероксидазой; № 12 приготовлен путем обработки носителя силаном, хитозаном, глутаровым альдегидом, пероксидазой; № 13 приготовлен путем обработки носителя силаном, NH_4 Cl, хитозаном, карбодиимидом, пероксидазой.

Этот факт можно объяснять тем, что прокаливание при 300ºС обеспечивает наибольшее количество гидроксильных групп на поверхности носителя, вследствие чего заряд данной поверхности наибольший и физическая иммобилизация происходит наиболее успешно, дальнейшая модификация силоксаном и NH_4 Cl привело к созданию оптимальной концентрации на поверхности носителя химически связанных аминогрупп необходимых для ковалентной связи со сшивающими и активирующими агентами.

Напротив, на поверхности образца, прокаленного при температуре 600ºС практически отсутствуют связанные гидроксильные группы, площадь поверхности минимальна и как следствие – иммобилизация практически не происходит.

Наибольшее сродство к субстрату пирокатехину наблюдается у иммобилизованных систем приготовленных с применением в качестве сшивающего агента – глутарового альдегида, так как приводит к получению максимального количества свободных альдегидных групп способных к взаимодействию с аминогруппами фермента пероксидазы. Хитозан же известен как хороший активатор пероксидазы, из-за наличия большого количества свободных аминогрупп и они могут активировать карбоскильные группы активного фермента за счет их Вандер-Ваальсового взаимодействия. А применение карбодиимида, вероятно, приводит к перекрестной сшивке между карбоксильными и аминогруппами группами пероксидазы и является следствием снижения работы активных центров пероксидазы.

Полученные биоматериалы на основе иммобилизованной пероксидазы достаточно перспективны для применения биотопливных электрогенерирующих элементов.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19–08–00186).

ЛИТЕРАТУРА

1 Arechederra M.N., Jenkins C., Rincon R.A., Artyushkova K., Atanassov P., Minteer S.D. Chemical polymerization and electrochemical characterization of thiazines for NADH electrocatalysis applications Electrochim. Acta, 55 (2010), pp. 6659–6664.

2 Goran J.M., Favela C.A., Rust I.M., Stevenson K.J. Enhanced electrochemical oxidation of NADH at carbon nanotube electrodes using methylene green: is polymerization necessary J. Electrochem. Soc., 161 (2014), pp. H3042-H3048.

3 Meredith M., Giroud F., Minteer S.D. Azine/hydrogel/nanotube composite-modified electrodes for NADH catalysis and enzyme immobilization Electrochim. Acta, 72 (2012), pp. 207–214.

4 Katz E., Willner I. Kotlyar A.B Anon-compartmentalized glucose/O2 biofuel cell by bioengineered electrode surfaces J. Electroanal. Chem., 479 (1) (1999), pp. 64–68

5. Gregg B.A., A. Heller Cross-linked redox gels containing glucose oxidase for amperometric biosensor applications Anal. Chem., 62 (3) (1990), pp. 258–263.

УДК 637.5.072

НУТРИЕНТНЫЙ СОСТАВ И БЕЗОПАСНОСТЬ МЯСНОЙ ПРОДУКЦИИ ОТ БЫЧКОВ РАЗНЫХ ПОРОД ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ ИХ СОДЕРЖАНИЯ

Х.Х. Тагиров, Р.С. Исхаков, Л.А. Зубаирова, А.А. Ламанов

Башкирский государственный аграрный университет, Уфа, Россия

Качество и безопасность во многом определяют конкурентоспособность пищевых продуктов.

Основной задачей обеспечения продовольственной безопасности является достижение физической и экономической доступности для каждого гражданина страны безопасных пищевых продуктов в объемах и ассортименте, которые соответствуют установленным рациональным нормам потребления пищевых продуктов, необходимых для активного и здорового образа жизни [1]. Пищевые продукты должны удовлетворять физиологическим потребностям человека в необходимых веществах и энергии, отвечать предъявляемым к продовольственному сырью и пищевым продуктам органолептическим и физико-химическим требованиям, соответствовать установленным нормативными документами требованиям к допустимому содержанию химических, радиоактивных, биологических веществ и их соединений, микроорганизмов и других биологических организмов, представляющих опасность для здоровья нынешнего и будущих поколений [2]. В связи с этим для обеспечения качественного и безопасного питания, а также сохранения здоровья населения необходим системный подход к вопросам контроля сырья и пищевых продуктов.

Для зоны Южного Урала, где повышена техногенная нагрузка на природные сельскохозяйственные агроэкосистемы, получение экологически безопасных продуктов питания является приоритетной задачей. Среди многочисленных загрязнителей особое место занимают тяжелые металлы. По экспертным оценкам, в Республике Башкортостан загрязнены тяжелыми металлами выше максимально допустимого уровня (МДУ) значительные площади сельскохозяйственных угодий, преимущественно в районах нефтедобычи и вблизи предприятий, относящихся к отраслям нефтехимии, химии, энергетики, машиностроения. Наиболее опасными элементами по масштабам распространения и объемам выбросов в условиях республики являются свинец, цинк, кадмий, медь. Как известно, обладая высокой устойчивостью и биологической активностью, токсические элементы способны мигрировать по всей пищевой цепи: почва – растение – животное – продукты питания – человек и тем самым создавать реальную угрозу для здоровья человека и животных [3, 4].

Целью данного исследования являлось изучение влияния технологии выращивания бычков на нутриентный состав и экологическую безопасность говядины. Для этого был проведён научно-хозяйственный опыт на бычках чёрно-пёстрой, симментальской и бестужевской пород. Для проведения опыта по принципу аналогов с учетом породы, пола и живой массы были подобраны 90 голов 8-месячных бычков, из которых сформированы 6 групп: первая и четвёртая – чёрно-пёстрая, вторая и пятая – бестужевская, третья и шестая – симментальская породы. Первые три группы содержались на откормплощадке; а 4, 5, 6 – в помещении. В помещении животные содержались беспривязно, в клетках по 15 голов в каждой. Доступ к кормушкам и автопоилкам был свободным.

Кормление животных осуществлялось по рационам, составленными на основе химического состава кормов и их фактической питательности в соответствии с рекомендациями [5].

Контрольный убой 18-месячных бычков для оценки мясной продуктивности проводился согласно «Методическим рекомендациям по оценке мясной продуктивности и качества мяса» [6].

Физико-химические показатели мяса изучались по общепринятым методикам [7]. Контроль экологической чистоты, полученного мяса, проводили по основным показателям, отвечающим за безопасность продовольственного сырья и пищевых продуктов в соответствии с требованиями СанПиН 2.3.2. 1078–01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов» и Технического регламента Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» ТР ТС 021/2011.

Качество мяса во многом обуславливается его химическим составом. Данные табл. 1 показывают, что мясо, полученное от бычков, содержавшихся в период откорма в помещении, отличалось наибольшим содержанием сухого вещества, в том числе и жира. Их преимущество по содержанию сухого вещества в средней пробе фарша над сверстниками содержавшиеся на площадке составляло 2,07–2,21 %. Эти различия обусловлены, вероятно, различной степенью жироотложения в организме подопытных животных.

Таблица 1 – Химический состав мясного фарша, %

Показатели	Группа подопытных бычков					
	I	II	III	IV	V	VI
Массовая доля, % Влага	70,83±0,90	70,51±1,75	70,45±0,85	68,62±1,16	68,44±1,17	68,26±1,08
Сухое вещество	29,17±0,90	29,49±1,75	29,55±0,85	31,38±1,16	31,56±1,17	31,74±1,08
в т. ч. : белок	18,48±0,94	18,52±0,51	18,53±0,48	18,26±0,56	18,32±1,51	18,46±1,62
жир	9,78±0,28	10,05±0,42	10,11±0,35	12,11±0,21	12,33±0,36	12,35±0,29
зола	0,91±0,03	0,92±0, 0, 6	0,91±0,02	0,91±0,5	0,91±0,03	0,93±0,04
Энергетическая ценность, кДж	677,32	688,17	690,60	761,49	770,79	773,88

Таким образом, полученная говядина от молодняка всех оцениваемых групп была с хорошими показателями пищевой ценности.

Химические элементы являются важнейшими катализаторами различных биохимических реакций, непременными и незаменимыми участниками процессов роста и развития организма, обмена веществ, адаптации к меняющимся условиям окружающей среды. Наибольшая часть металлов необходима для нормальной жизнедеятельности организма, так как изменение физиологических функций и метаболизма в организме наблюдается не только при избытке, но и при их недостатке (табл. 2).

Таблица 2 – Показатели экологической безопасности мяса

Показатель	ПДК	Группа					
		I	II	III	IV	V	VI
Массовая доля токсических элементов, мг/кг в т. ч.							
медь	5,0	0,42±0,08	0,44±0,11	0,38±0,06	0,40±0,05	0,42±0,12	0,37±0,09
цинк	70,0	31,42±1,08	30,21±1,11	29,43±1,21	31,21±1,30	29,82±1,09	29,13±1,05
свинец	0,50	0,21±0,04	0,19±0,03	0,20±0,02	0,19±0,02	0,19±0,04	0,18±0,03
кадмий	0,05	0,03±0,001	0,02±0,003	0,03±0,002	0,02±0,001	0,01±0,001	0,02±0,002
Радионуклиды, Бк/кг в т. ч.							
цезий-137	160	5,0					
Пестициды, мг/кг в т. ч.							
гексахлорциклогексан (а, ß, у изомеры),	0,1	не обнаружено					
ДДТ и его метаболиты.	0,1	не обнаружено					
Антибиотики, мг/кг в т. ч.							
левомитицин	не доп	не обнаружено					
тетрациклиновая гр.							
бацитрацин							

Особое внимание нами было обращено, на содержание в мясе таких элементов как медь и цинк. Это объясняется тем, что с одной стороны они являются жизненно необходимыми микроэлементами, с другой – высокие их концентрации могут оказывать токсическое действие. При дефиците меди у сельскохозяйственных животных отмечаются анемия, сбои функций нервной системы в виде нарушения координации движений, усугубляется йодная недостаточность. Дефицит цинка в организме животных вызывает нарушение обмена веществ, особенно белкового и углеводного; кератизация эпителия приводит к снижению барьерной функции кожи и слизистых оболочек; вследствие изменения свойств копытцевого рога происходит его чрезмерное разрастание и деформация; нарушается воспроизводительная функция [8]. Следует отметить, что не играющие существенной роли в нормальной жизнедеятельности организма свинец и кадмий определяются как токсические элементы.

Результаты исследований свидетельствуют о том, что оцениваемое мясо соответствовало по показателям безопасности нормативным требованиям. Содержание тяжёлых металлов в говядине не превышало пределы допустимых концентраций. Тем не менее, в образцах мясного сырья от животных, содержавшихся в помещении, установлено меньшее содержание металлов по сравнению с животными, находящихся на открытой площадке. По содержанию меди показатели отличались на 2,6–4,8 %, по свинцу – на 9,5–14,3 %, по кадмию – на 33,3–50,0 %. На концентрацию цинка не повлияли ни технология выращивания животных, ни их генотип.

Необходимо отметить, что в исследуемых образцах мяса пестициды и антибиотики не выявлены.

Таким образом, анализ полученных данных показал, что говядина, полученная от бычков разных пород при различных способах содержания в зоне Южного Урала, отличалась достаточно высоким качеством, а оценка экологической чистоты свидетельствует о её безопасности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Указ Президента РФ от 30 января 2010 г. № 120 «Об утверждении Доктрины продовольственной безопасности Российской Федерации». http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_96953/

2. Бирюкова, М.В. Безопасность продовольственного сырья и пищевых продуктов / М.В. Бирюкова, М.В. Гернет, Д.А. Еделев // Научно-информационный материал. М., 2010. 27 с.

3. Чернов, О.В. Экономико-экологический метод оценки зерновых культур в Республике Башкортостан / О.В. Чернов, Р.У. Гусманов. // Агропродовольственная политика России. 2013. № 2 (14). С. 72–74.

4. Давлетов, Р.Ш. Эффективность использования абердин-ангусского и лимузинского скота для производства говядины / Р.Ш. Давлетов, Х.Х. Тагиров, Р.Р. Шакиров. Уфа, 2005. 108 с.

5. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных: справ. пособие / А.П. Калашников, В.И. Фисинин, В.В. Щеглов, Н.И. Клейменов. 3-е изд., перераб. и доп. М.: Агропромиздат, 2003. 456 с.

6. Методические рекомендации по изучению мясной продуктивности и качества мяса крупного рогатого скота / ВАСХНИЛ. М., 1990. 86 с.

7. Антипова, Л.В. Методы исследования мяса и мясных продуктов / Л.В. Антипова, И.А. Глотова, И.А. Рогов. М.: Колос, 2001. 376 с.

8. Дронов, В.В. Способ фармакоррекции нарушений минерального обмена у коров / В.В. Дронов // Вестник Воронежского государственного аграрного университета. 2017. № 4 (55). С. 58–62.

УДК 631.879.34:676

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ РЕШЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ВОДНОЙ ВЫТЯЖКИ ИЗ КОРЫ ПРИ ПЕРЕРАБОТКЕ ДРЕВЕСИНЫ В АГРОПРОМЫШЛЕННОМ СЕКТОРЕ

А.Б. Дягилева, С.Б. Михайлова, А.И. Смирнова

Санкт-Петербургский государственный университет промышленных технологий и дизайна, Санкт-Петербург, Россия

Современный вектор развития агропромышленного комплекса направлен на производство органической экологически чистой продукции. Качество сельскохозяйственной продукции является приоритетным направлением развития этого вида деятельности, которое должно быть основано на процессном подходе и вписываться в общую концепцию национальной безопасности страны. Устойчивое развитие территорий является ключевым звеном в обеспечении качественной продукции, и подготовка посадочного материала сегодня требует использования новых экологически безопасных реагентов. Этими реагентами могут являться вторичные продукты, которые возможно выделить при комплексной переработке природного сырья в виде древесины при осуществлении технологических процессов ее окорки.

Известно, что в процессе вегетации, растительные культуры поглощают большое количество органоминеральных компонентов почвы [1], что способствует снижению ее плодородия. Для того чтобы восполнить потери органоминеральной составляющей почвенного слоя, принято после уборки урожая или перед посевом вносить удобрения. При введении в почву дополнительных «питательных» веществ, возникает несколько проблем, во-первых, неравномерность распределения удобрений по всей площади сельскохозяйственных угодий, что связано с неровностью рельефа местности, а во-вторых, изменчивость массопереноса от климатических условия [2]. Избыток или дефицит органоминеральных веществ негативно отражается на росте и развитии сельскохозяйственных культур с одной стороны, и вызывает изменение качественных показателей окружающей среды в целом.

Еще одна проблема заключается в том, что за счет выпадения атмосферных осадков, вносимые удобрения, которые не успевают усваиваться растениями и микроорганизмами в полном объеме, мигрируют в нижние слои почвы, что снижает их доступность при развитии корневой системы культурных растений.

Кроме того, эти вещества с дождевой водой через грунтовые воды попадают в водные объекты и создают благоприятную среду для развития сине-зеленых водорослей, вследствие чего происходит эвтрофикация водоемов.

Предварительная обработка семян и внесение их в почву вместе с природными органоминеральными соединениями на основе растительной биомассы в значительной степени может снизить негативное воздействие на окружающую среду, в том числе и на водные объекты. Такое решение будет являться развитием новой системы управления природно – территориальными комплексами [3], где одним из элементов управления качеством окружающей среды рассматривается комплексное использования воспроизводимого растительного сырья с регулированием основных показателей качества компонентов окружающей среды.

Деревообрабатывающая и целлюлозно-бумажная промышленности составляют значительную долю перерабатывающего комплекса воспроизводимых биоресурсов нашей страны. Следует отметить, что даже при реализации наилучших доступных технологий на этих предприятиях они используют в качестве целевых продуктов лишь малую часть от всей биомассы древесины. Комплексная переработка древесины на основе «зеленой химии» продолжает оставаться перспективным вектором развития как лесопромышленного, так и сельскохозяйственного комплекса.

На сегодняшний день существует большое количество крупных целлюлозно-бумажных и деревообрабатывающих предприятий, которые при деревообработке применяют мокрый способ окорки древесины с образованием коросодержащей сточной воды [4]. Этот поток сточной воды является наиболее проблемным для централизованных систем очистки предприятий и не рассматривается в технологии переработки биомассы древесины как потенциальное ценное сырье для получения новых продуктов. В традиционном варианте образования коросодержащей воды можно выделить два потока. Первый поток образуется непосредственно от окорочного оборудования, а второй – после короотжимного аппарата, причем суммарная концентрация органических веществ в последнем потоке более значительная. Эти потоки принято смешивать и подвергать локальной очистке [5], где удаляются взвешенные веществ, а часть воды возвращается на производство. Оставшаяся часть уходит на внеплощадочные очистные сооружения, где подвергается многостадийной очистке, включая биологическую.

При переходе предприятий на сухой метод окорки возникает необходимость предусматривать места временного размещения коры, в том числе, если предусмотрена схема ее переработки для целевого использования в виде компостов [6]. В этом случае будет формироваться поток с отведением сточных вод с территории хранения с содержанием специфических компонентов, которые при специальной подготовке могут быть использованы для агропромышленного комплекса в качестве целевого продукта.

Механизм взаимодействия воды с древесиной на стадии ее подготовки для дальнейшей переработки начинается с контакта и разрушения наиболее биологически активного слоя древесины – камбия, который содержит в своем составе все необходимые вещества для формирования высших растений. Под действием гидролиза и далее механического воздействия в виде короотжимных аппаратов в воду переходят биологически активные вещества, такие как моно- и полисахариды, фенольные соединения, фрагменты лигнина, экстрактивные соединения [7], которые при их различном сочетании обладают свойствами к стимуляции роста растений. Позитивный ростостимулирующий эффект при выращивании растительных культур на корокомпостах отмечается в ряде работ [6, 8]. Растения на протяжении всего вегетативного периода поглощают необходимые для роста и развития питательные вещества, причем для эффективного развития корневой системой системы предпочтительными являются вещества в растворенном виде [9]. Однако работы, где исследовались бы возможности компонентов водной вытяжки из биомассы коры при промышленной переработке древесины в качестве стимуляторов роста, в научной литературе практически отсутствуют, хотя часть органических соединений этой композиции являются прекурсорами для получения новых стимуляторов роста растений.

Целью работы являлось принципиально обосновать возможность использования водной вытяжки из коры при переработке древесины промышленным способом в качестве стимулятора роста высших растений и предложить техническое решение по реализации процесса их получения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для оценки влияния предполагаемого стимулятора роста на развитие высших растений в лабораторных условиях были подготовлены несколько моделей на основе промышленной коросодержащей воды (КВ) преимущественно хвойных пород древесины. Модель водной вытяжки из коры лиственных пород (ВВК) готовилась в лаборатории по технологии, приближенной к формированию коросодержащей сточной воды древесно-подготовительного цеха [4]. Концентрацию органических веществ в водной вытяжке оценивали по величинам ХПК, сухому и прокаленному остатку по соответствующим методикам, используемым в практике контроля сточных вод.

Растительными тест – объектами были выбраны кресс-салат и зерновая культура мягкая яровая пшеница «РАДА», которые используются в агрофизических исследованиях. В основе представленного исследования использовался метод определения всхожести [10]. Специфика этого метода исследования заключалась в подготовке водных композиций на основе коросодержащей воды и обработка ими посевного материала с последующим фиксированием через определенные промежутки времени биометрических параметров исследуемых объектов в виде длины корневой системы и ростка тестовых культур.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Учитывая тот факт, что отходы коры относятся к IV классу опасности, согласно федеральному классификационному каталогу отходов [11], и являются малоопасным веществам и, следовательно, композиции на их основе с большой вероятностью не должны оказывать токсичного воздействия на посевной материал. Однако в водной среде возможна трансформация ряда компонентов, и оценка токсичности коросодержащих потоков при разработке технологических решений должна пройти испытания для обоснования целесообразности их использования в растениеводстве.

В данной работе в качестве примера приводятся исследования по определению фитотоксичности на кресс-салате «Ажур», как на особенно чувствительном тест – объекте. В таблице 1 приведены некоторые биометрические показания в виде длины корневой системы и ростков при обработке этого посевного материала при различной кратности разбавления водной вытяжки после отжима коры. В качестве минеральной составляющей в композиции использовался внутренний резерв минеральных веществ, перешедших при мокрой обработке, и их общее содержание составляет 1,6 – 2 масс %.

Таблица 1. Изменение биометрических показателей кресс-салата в зависимости от кратности разбавления ВВК

Кратность разведения	Среднее значение длины корня, см	Среднее значение длины ростка, см
Контроль (вода)	5,5 ± 0,4	3,8 ± 0,2
1:100	7,5 ± 0,5*	3,9 ± 0,1**
1:10	8,2 ± 0,5*	4,4 ± 0,2*
1:1	7,1 ± 0,5*	5,4 ± 0,2*
ВВК	6,9 ± 0,4*	5,5 ± 0,2*

* – достоверное значение относительно контроля; ** – недостоверное значение

Приведенные данные показывают, что компоненты коросодержащей воды лиственных пород древесины не обладает фитотоксичностью по отношению к выбранной культуре, однако ростостмулирующий эффект по корневой системе при использовании более концентрированных композиций снижается. Аналогичные данные были получены при исследовании различных композиций на основе КВ, которые также показали отсутствие фитотоксичности исследованных композиций по отношению к этой культуре.

Известно, что посевной материал зерновых культур является потенциальным источником патогенной микрофлоры в виде микотоксинов, которые препятствуют полноценному развитию растения. Параллельно основным исследованиям была оценена степень зараженности посевного материала путем проведения микробиологического анализа в соответствии с ГОСТом [12]. По результатам микробиологического анализа было обнаружено присутствие на зерновом посевном материале плесневых грибов семейства Aspergillaceae и дрожжей.

Влияние различных композиций коросодержащей воды на развитие патогенной микрофлоры при прорастании зерновых культур оценивалось на седьмые сутки после обработки. В качестве примера на рисунке 1 представлена зависимость количества зараженных грибами проростков от разведения модельной воды на основе КВ.

Согласно представленной зависимости можно сделать вывод, что с увеличением концентрации органических веществ в модели на основе КВ уменьшается количество зараженных плесневыми грибами проростков. Данное явление объясняется наличием в коросодержащей воде ряда специфических веществ, которые обладают фунгицидными свойствами.

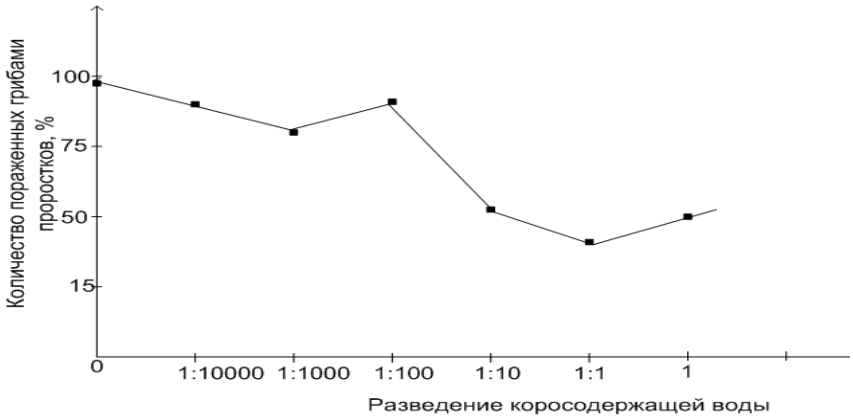


Рис. 1. Зависимости пораженных грибами проростков от кратности разведения КВ.

ВЫВОДЫ

Таким образом, в работе показана принципиальная возможность использования водной вытяжки из коры при переработке древесины промышленным способом как в качестве стимулятора роста высших растений, так и препарата, который обладает фунгицидными свойствами. Подготовка водных композиций для целевого использования может быть реализована на базе основного технологического процесса локальной очистки этих потоков с использованием биологически очищенной воды для регулирования концентрации активных компонентов. На основе комплекса экспериментальных материалов подготовлена и подана заявка на изобретение по способу получения новых стимуляторов роста.

ЛИЕТЕРАТУРА

1. Минеев В.Г. Агрохимия: Учебник. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Изд-во МГУ, Изд-во «Колос». 720 с. 2004

2. Технология применения удобрений/ Зооинженерного факультета МСХА им. К.А. Тимирязева: [Электронный ресурс] // URL http://www.activestudy.info/texnologiya-primeneniya-udobrenij-2/

3. Дягилева А.Б., Смирнова А.И., Присмакова А.Е Перспективы использования лигногуминовых веществ в системе управления качеством окружающей среды // Актуальная биотехнология № 3 (26) с. 270 272.

4. Информационно-технический справочник по наилучшим доступным технологиям ИСТ 1–2015 Производство целлюлозы, древесной массы, бумаги, картона // Росстандарт 15.12.2015.

5. Байбородин А.М., Воронцов К.Б., Богданович Н.И. Разработка системы локальной очистки сильнозагрязненных сточных вод целлюлозно-бумажных предприятий // Вода: химия и экология. 2011. № 8. с. 16–21.

6. Демидова Н.А. Использование компостов на основе древесной коры в качестве удобрения при выращивании саженцев черной смородины/ Н.А. Демидова, Б.А. Молчанова, М.Л. Бунтина // Научные ведомости серия естественные науки. 2013. № 7. с. 43–49.

7. Дейнеко И.П. Исследование химического состава коры сосны/ И.П. Дейнеко, И.В. Дейнеко, Л.П. Белов // Химия растительного сырья. Барнаул 2007. № 1. с. 19–24.

8. Гаврилов Т.А., Паталайнен Л.С., Колесников Г.Н. О ресурсосберегающих технологиях экологически безопасной утилизации древесной коры // Современные научные исследования и инновации. 2014. № 7 [Электронный ресурс]. URL: http://web.snauka.ru/issues / 2014/07/36627

9. Медведев С.С., Физиология растений: учебник / С.С. Медведев; БХВ. Петербург, 2012. 512 с.

10. ГОСТ 12038–84 1986–07–01 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести // Электронный фонд правовой и нормативно-технической документации (сайт). 2003. URL: http://docs.cntd.ru/document / 1200023365

11. Приказ Росприроднадзора от 22.05.2017 № 242 (ред. от 02.11.2018) "Об утверждении Федерального классификационного каталога отходов" (Зарегистрировано в Минюсте России 08.06.2017 № 47008) // Consultant.ru (сайт). 2007. URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_218071 /

12. ГОСТ 33566–2015 Молоко и молочная продукция. Определение дрожжей и плесневых грибов. // Электронный фонд правовой и нормативно-технической документации (сайт). 2003. URL: http://docs.cntd.ru/document / 1200127751

УДК 628.3

НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫЕ РЕАГЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ В ПРОЦЕССАХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД

Й.В. Кобелева, Н.Н. Шургалина, Л.М. Газизулина, О.О. Гурьянова, А.С. Сироткин, Т.В. Вдовина

Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, Россия

Утилизация и обезвреживание сточных вод составляет одну из самых важных экологических проблем настоящего времени и в этом направлении наработано множество разнообразных технологических приемов, в основе которых лежат биологические и физико-хтимические процессы деградации вредных компонентов сточных вод.

Соединения фосфора и азота являются постоянными загрязняющими компонентами коммунально-бытовых стоков, трудноудаляемых в традиционных технологиях биологической очистки. Присутствие этих биогенных элементов в сточных водах свыше ПДК обуславливает процесс эвтрофирования водоемов, приводящий к нарушению водных экосистем и выводящий их из равновесия.

Поскольку традиционная биологическая очистка сточных вод часто не обеспечивает требуемой глубины удаления биогенных элементов, в настоящее время чаще применяется и физико-химическая обработка сточных вод коагулянтами или флокулянтами.

В практике физико-химической обработки сточных вод применяются различные схемы, сочетающие в себе биологический процесс и реагентное осаждение. Совмещение этих процессов позволяет добиться более высокого качества очищенной воды, чем при применении каждого из них в отдельности. По мере того как совершенствуется процесс совместной биологической и физико-химической очистки, расширяется спектр применяемых реагентных препаратов. Схемы совместной биологической и физико-химической очистки воды различаются местом введения реагента. В последнее время все чаще встречаются технологические схемы с дозированием реагентов непосредственно в биологическую систему. Однако используемые химические реагенты не являются биологически доступными соединениями и многие из них содержат высокотоксичные вещества. В связи с этим актуальными являются исследования влияния применения реагентных препаратов на комплекс свойств активного ила.

Традиционно в водоочистке применяют реагенты на основе солей алюминия и железа, такие как $FeCl_3$, $Al_2(SO_4)_3$ и другие. Однако эффективность их применения не достаточная, в связи с этим продолжаются поиски и разработка новых реагентных препаратов. Одним из перспективных направлений является разработка иннновационных реагентов на основе наночастиц.

В последнее время особый интерес представляет исследование применения раствора металлических наночастиц железа в процессах очистки сточных вод от биогенных элементов самостоятельно. Исследователи отмечают стимулирование микробной активности при их применении, что способствует повышению эффективности очистки сточных вод. Однако, большинство исследований описывают применение раствора металлических наночастиц лишь для очистки грунтовых вод. Таким образом, интерес представляет выделение и исследование эффективности их применения в комплексном процессе биологической очистки сточных вод в сравнении с готовыми реагентными препаратами.

В работе был проведен сравнительный анализ эффективности процессов комплексной биологической и реагентной очистки сточных вод с оценкой состояния активного ила.

В качестве реагентных препаратов выступали – раствор ферромагнитных металлических наночастиц железа, инновационные реагентные препараты VTA Polymax 277 и VTA Biokat P500. Реагентные препараты фирмы VTA являются комплексными коагулянтами-флокулянтами на основе солей железа и алюминия. Согласно паспортным данным применение данных регаентов обеспечивает безопасное и быстрое осаждение фосфатов, улучшает свойства ила, а именно: показателя илового индекса, структуру хлопьев. При этом следует отметить, что реагент VTA Biokat P500 рекомендован в первую очередь для очистки коммунально-бытовых сточных вод, когда как реагент VTA Polymax 277 рекомендован также и для промышленных сточных вод с высоким содержанием органических веществ в поступающем стоке.

Экспериментальные исследования проводились в лабораторных условиях. Активный ил вносили в модельный раствор коммунально-бытовых сточных вод в количестве, советующем 2 г/л по СВ.

Периодическое культивирование активного ила проводилось в течение 4-х часов при нормальных условиях при непрерывной аэрации. В работе исследовалось микробное сообщество активного ила очистных сооружений г. Зеленодольск. Для реагентов VTA Polymax 277 и VTA Biokat P500 дозировка составила 50 мкл/дм^3, для раствора ферромагнитных металлических наночастиц железа – 1000 мкл/дм^3. Анализ эффективности биологической очистки сточных вод и состояния активного ила осуществлялся на основании данных об изменении азотсодержащих веществ, органических веществ, содержания фосфора, оценки ферментативной активности микроорганизмов, а также по скорости осаждения активного ила.

Полученные результаты показали, что при применении реагентов улучшается основной технологический параметр – седиментация, в среднем на 33 % для VTA Biokat P500, на 38 % для VTA Polymax 277 и на 25 % для раствора металлических наночастиц ферромагнетита. Выявлено, что удаление органических веществ при выбранных дозировках эффективнее протекает с применением раствора МНЖ, в среднем на 10 % по сравнению с VTA Polymax 277. Максимально эффективно удаление фосфатов идет с реагентом VTA Biokat P500 по сравнению с остальными, что может быть связано с неоптимально подобранной дозировкой для других реагентов. По изменению содержания соединений азота можно судить о протекации процессов обеих фаз нитрификации во всех средах с реагентами.

Анализ состояния микробного сообщества по ферментативной активности активного ила показал, что при применении выбранных реагентных препаратов не происходит ингибирования биомассы. С целью получения более подробных результатов о влиянии указанных реагентных препаратов на микробное сообщество активного ила и возможность их применения для очистки промышленных сточных вод, будут проводиться дальнейшие исследования.

УДК 628

БИОСУРФАКТАНТЫ, СИНТЕЗИРУЕМЫЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ-НЕФТЕДЕСТРУКТОРАМИ: СОСТАВ, СВОЙСТВА И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Л.А. Беловежец[1], М.С. Третьякова[2], Б.А. Маркова[2], Л.П. Ознобихина[1]

[1] – Иркутский институт химии СО РАН, Иркутск, Россия
[2] – СИФИБР СО РАН, Иркутск, Россия

Проблема охраны окружающей среды приобретает особую важность в связи с загрязнением водоемов и почв нефтью и нефтепродуктами. Наиболее ощутимо эти воздействия проявляются при добыче нефти, ее переработке, транспортировке, из-за технологических и аварийных выбросов продукции в окружающую среду. При этом наибольший вред наносится почве вследствие того, что она аккумулирует загрязнения в больших количествах. Это приводит к изменению многих характеристик почвы: агрохимических, физических и микробиологических.

В связи с тем, что на естественное восстановление нефтезагрязнённой почвы уходит очень много времени, необходимо разрабатывать эффективные технологии очистки её от нефти.

Во всём мире ведутся интенсивные исследования по изучению действия углеводородных загрязнений на экосистему и разработке эффективных и безопасных методов по ликвидации нефтяных загрязнений. В последнее время приоритетным становится биологический метод очистки углеводородных загрязнений, основанный на применении микроорганизмов – деструкторов нефти и нефтепродуктов. Он характеризуется как наиболее экономичный, эффективный и безвредный способ очистки. Одним из важнейших механизмов биологического метода утилизации компонентов нефти, которые слабо- или нерастворимы в воде, является образование микроорганизмами поверхностно-активных соединений (биоПАВ или биосурфактантов). Они способствуют солюбилизации углеводородов, образованию мелкодисперсной эмульсии, в результате чего облегчается контакт микробных клеток с гидрофобным субстратом и поступление его внутрь клетки. В настоящее время биоПАВ являются объектами пристального изучения.

Цель работы – определение состава и свойств биосурфактантов, выделенных из культуральной жидкости микроорганизмов-нефтедеструкторов.

Первичная оценка способности микроорганизмов выделять поверхностно-активные вещества оценивалась по индексу эмульгирования. Выяснилось, что все штаммы способны образовывать стойкую эмульсию, но с разной интенсивностью (индекс эмульгирования от 13 до 73 %) и образовывать чистую зону при добавлении на поверхность нефти супернатанта (табл.).

Таблица. Показатели способности бактерий – нефтедеструкторов выделять поверхностно-активные вещества

Штамм	Диаметр образовавшихся чистых зон, см	Эмульгирующая активность жидких культур	Индекс эмульгирования, % гексадекан	H%, количество клеточно-связанных сурфактантов, %	Содержание биосурфактантов, г/л питательной среды
Rhodococcus 108	4.0 ± 0.2	++	73	37	0,166
Acinetobacter 112	3.2 ± 0.4	+	57	31,5	0,177
Acinetobacter 114	1.5 ± 0.2	+	13	31,2	1,523

Для увеличения количества синтезируемых биосурфактантов все микроорганизмы выращивались на питательной среде с гексадеканом в качестве единственного источника углерода. Количество клеточно-связанных биосурфактантов было примерно одинаково для всех штаммов, тогда как Rhodococcus 108 образовывал существенно больше внеклеточных форм. По содержанию свободных биосурфактантов на 1 л питательной среды Rhodococcus 108 можно отнести к суперпродуцентам данных веществ. Проведенные качественные реакции выявили в составе биосурфактантов углеводный и липидный компоненты. На ТСХ-хроматограмме проэкстрагированных сурфактантов Rhodococcus 108 детектируется одно компактное пятно с R_f 0.78. Это свидетельствует о наличии лишь одного биосурфактанта, либо нескольких очень близких по структуре, что не позволяет разделить их методом ТСХ.

Для Rhodococcus 108 и Acinetobacter 114 были сняты ИК-спектры в тонкой пленке. Анализ пиков ИК-спектра биосурфактанта, продуцируемого штаммом Rhodococcus 108 позволил отнести пик в области частот 3742–3190 $см^{-1}$ к ОН-группам, связанным водородной связью. Характерные интенсивные пики, наблюдаемые в области частот 2921–2855 $см^{-1}$ соответствуют валентному колебанию CH_2-группы. Высокий по интесивности пик с частотой 1461 $см^{-1}$ и средний по интенсивности пик с частотой 722 $см^{-1}$, очевидно, принадлежат деформационным колебаниям CH_2-группы. Также в спектре наблюдаются сигналы, характерные для смещенных колебаний сложноэфирных групп, вследствие наличия водородных связей (1652 $см^{-1}$) и для фрагментов С-О, СН-О-СН и $CH_2 – O – CH_2$ (1165–1018 $см^{-1}$). Следовательно, анализируемая проба представляет собой соединение, содержащее длинноцепочечные алифатические углеводороды, сложноэфирные связи, карбонильные и ОН-группы. Судя по количеству пиков в спектре и по диапазону частот, при которых мы наблюдаем эти сигналы, соединение обладает сложной структурой. Вероятно, исследованное соединение представляет собой сложный эфир трегалозы и миколовых кислот.

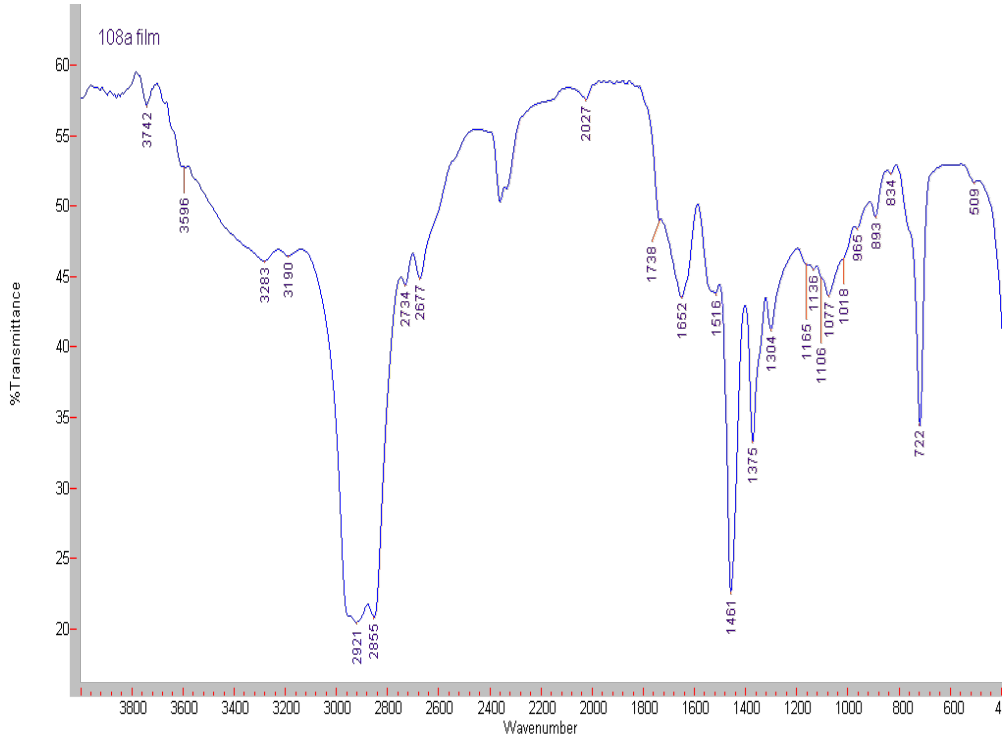


Рис. 1 ИК – спектр биосурфактанта, продуцируемого штаммом Rhodococcus 108

При анализе ИК-спектра биосурфактанта, продуцируемого штаммом Acinetobacter 114, были получены следующие данные: характерные пики в области частот 3745–3392 $см^{-1}$, которые могут соответствовать как валентным колебаниям свободных групп ОН (ν_{O-H}), внутри- и межмолекулярным водородным связям в димерах и полимерах, так и колебаниям аминогруппы. Интенсивный раздвоенный пик в диапазоне частот 2923–2856 $см^{-1}$, а также пики в области частот 1460 $см^{-1}$ и 722 $см^{-1}$ являются типичными для CH_2 группы (валентные и деформационные колебания соответственно). Наряду с этим, сигналы малой интенсивности с частотой 1650 $см^{-1}$ и 1078 $см^{-1}$ соответствуют смещенным колебаниям сложноэфирных групп, вследствие наличия водородных связей, и валентным колебаниям альдегидной группы соответственно. Ряд среднеинтенсивных полос в диапазоне частот 1375–1297 $см^{-1}$ свидетельствуют о возможном наличии у соединения разветвлённых или деформированных $C(CH_3)_2$ групп. Наличие в элементном составе небольшого количества азота позволяет предположить, что данный биосурфактант представляет собой липополисахарид, состоящий из трисахаридной основы (D-галактозамин+D-галактозаминуроновая кислота + диоксиаминогексоза), к которой присоединены остатки жирных кислот (C_{10} – C_{22}) через сложноэфирную и амидную связь.

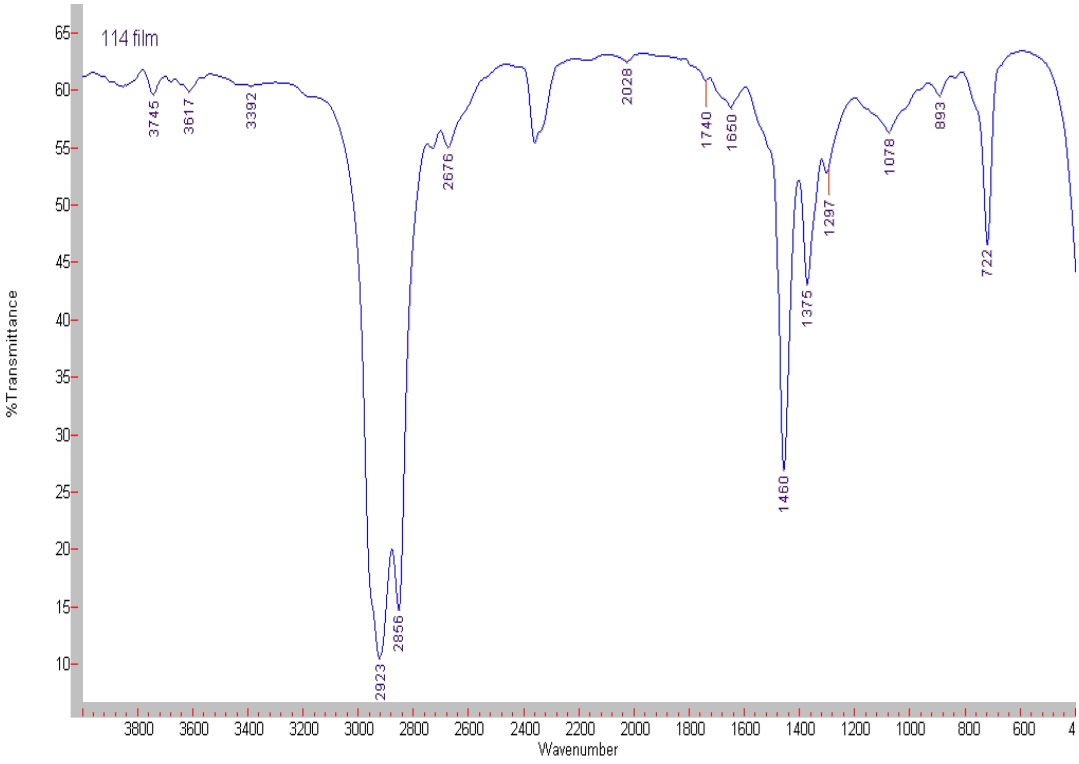


Рис. 2 ИК-спектр биосурфактанта, продуцируемого штаммом Acinetobacter 114

Проведенные нами исследования позволили выявить наличие как внеклеточных, так и клеточно-связанных биосурфактантов во всех исследованных микроорганизмах. Был проведен ряд качественных реакций для предварительного определения состава синтезированных биосурфактантов с последующим анализом с помощью методов ТСХ и ИК-спектроскопии. Перечисленные методы позволили установить вероятный состав полученных биосурфактантов (Rhodococcus sp. 108 – трегалолипид в состав которого входит трегалоза, и Acinetobacter sp. – эмульсан, липополисахарид). Однако, вследствие сложности химической структуры этих соединений, а также их вариативности в зависимости от условий культивирования и состава питательной среды, невозможно однозначно определить точный химический состав выделенных веществ.

Исследование поддержано грантом РФФИ и Правительства Иркутской области, проект № 17–45–388078 р_а.

УДК 579.6

БИОЛОГИЧЕСКИЙ СПОСОБ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПЛОДОРОДИЯ ДЕГРАДИРОВАННЫХ ПОЧВ

А.К. Саданов, И.Э. Смирнова, Э.Р. Файзулина, Л.Г. Татаркина

Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

В настоящее время, во всем мире наблюдается устойчивая тенденция к деградации сельскохозяйственных почв и ежегодно утрачивается до 12 млн. га сельхозугодий. Это связано как с усилением антропогенной нагрузки на почвы, так и с природными причинами, основными из которых являются эрозия и засоление [1]. Интенсивное земледелие без учета агроэкологического потенциала почв и несоблюдение научно-обоснованных систем ведения сельского хозяйства приводят к истощению плодородия и деградации почв. В этой связи, основной проблемой современного земледелия, является борьба с деградацией почв. Поэтому, на первый план выходят задачи восстановления и повышения плодородия сельскохозяйственных почв.

Существуют разные приемы мелиорации или восстановления деградированных почв, но на сегодняшний день наиболее перспективным решением этой проблемы является использование биологического или органического земледелия, при котором решающим фактором становится поддержание почвы в биологически активном состоянии, способствующем ее самовосстановлению. [2]. Биологическое земледелия исключает применение пестицидов, гербицидов, химических удобрений и различных регуляторов роста растений, что позволяет получать экологически чистую продукцию, не нанося вред окружающей среде, и повышать плодородие почв [3].

Одним из направлений биологического земледелия является применение биопрепаратов для восстановления плодородия почв [4]. Наиболее перспективным является применение ассоциаций агрономически-ценных или эффективных микроорганизмов (ЭМ-ассоциации), обладающих комплексным стимулирующим действием на развитие растений, почвенное плодородие и способствующих поддержанию экологического равновесия в агроценозах. Как правило, в состав ЭМ-ассоциации входят почвенные микроорганизмы, такие как азотфиксирующие, фосфатмобилизующие, целлюлолитические и силикатные бактерии, которые составляют основу микробиоценоза здоровой плодородной почвы [5, 6]. При внесении ЭМ-ассоциаций в истощенную почву происходит повышение активности почвенных процессов, значительно усиливается деструкция и мобилизация питательных соединений, повышается доступность биогенных веществ почвы для аборигенных микроорганизмов [7]. Под влиянием ЭМ-ассоциаций структура микробных комплексов в почве меняется в положительную сторону: увеличивается численность микроорганизмов, их биологическая активность, усиливаются процессы их жизнедеятельности, все это способствует нормализации микрофлоры и восстановлению почвенного плодородия [8].

Одним из основных показателей экологического состояния почв и индикатором ее плодородия является численность и состав почвенной микрофлоры. Для оценки состояния микробоценоза почв применимы экологические подходы, среди которых ведущее место занимают характеристика таксономического и функционального разнообразия микроорганизмов почвы [9, 10].

С этой точки зрения, крайне важно иметь представление о качественном и количественном составе микроорганизмов, входящих в состав почвенной микрофлоры, так как это позволит не только оценить состояние почвы, но разработать способы ее о нормализации. Другим не менее важным индикаторов биологической активности почв являются почвенные ферменты, которые отражают интенсивность основных биохимических процессов мобилизации соединений азота, фосфора, углерода почвы протекающих с помощью микроорганизмов и определяющих ее плодородие [11].

Цель работы – изучение возможности повышения плодородия деградированных почв путем интродукции ЭМ-ассоциации, влияющей на ее биологическую активность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служила ранее созданная нами ЭМ-ассоциация, в состав которой входят азотфиксирующие, фосфатмобилизующие и целлюлолитические бактерии (соотношение партнеров ассоциации – 1:1:1). Бактерии, входящие в состав ЭМ-ассоциации, были выделены в 2017–2018 годах из ризосферной почвы здоровых растений сахарной свеклы в Жамбылской области Казахстана – основном регионе производства сахарной свеклы в республике. Культивирование бактерий ЭМ-ассоциации проводили на жидких питательных средах: целлюлолитические бактерии на среде Гетчинсона, фосфатмобилизующие – на среде Муромцева и азотфиксирующие – на среде Эшби.

Для изучения влияния ЭМ-ассоциации на биологическую активность почв были проведены модельные опыты в лабораторных условиях. В опытах использовали деградированную почву, собранную в Жамбылской области Казахстана. По своему типу почва была отнесена к серозему обыкновенному. Почву собрали с поля, где сахарную свеклу выращивали без ротации культур и внесения минеральных удобрений в течение 7 лет. По четырех бальной шкале деградации сельскохозяйственных почв, эта почва была отнесена к почвам с третей степенью деградации (снижение продуктивности основных агрокультур на 50–75 %, снижение качества получаемой продукции в 3–10 раз, ограничение сельскохозяйственного использования почв) [12]. В сосуды почвой (3000 г.) емкостью на 5000 мл вносили 150 мл клеточной суспензии с титром 10^8кл/мл. В качестве контроля использовали почву без внесения ЭМ-ассоциации. Длительность опытов составляла 30 суток. Изучение микрофлоры почв проводили по общепринятым методикам: определяли общее микробное число (ОМЧ) и численность основных таксономических групп: бактерий, актиномицетов, дрожжей и грибов [13].

Активность микробных ферментов почвы (каталаза, дегидрогеназа, уреаза), а также интенсивность почвенного дыхания исследовали в динамике, проводя отбор проб через 10, 20 и 30 суток после внесения ЭМ-ассоциации.

Для определения дегидрогеназной активности 1 г почвы помещали в пробирку, добавляли 0,1 г $CaCO_3$, 1 мл 0,1 М раствора глюкозы и 1 мл 1 % раствора трифенилтетразолия хлористого (ТТХ). Образовавшийся формазан экстрагировали 50 мл этанола и фильтровали. Дегидрогеназную активность выражали в единицах оптической плотности. Оптическую плотность определяли на цифровом фотоэлектроколориметре АР-101 («Apel», Япония) при длине волны 460 нм [14].

Активность уреазы определяли методом определения аммиака, образуемого при распаде мочевины, и выражали в мг NH_2 в грамме почвы за сутки [15].

Для определения каталазной активности измельченную почву (1 г) вносили в сосуд емкостью 100 мл, добавляли 0,5 г $CaCO_3$. Осторожно помещали на дно маленький стаканчик с 5 мл 3 % раствора перекиси водорода. Склянку плотно закрывали пробкой с трубкой, соединенной с бюреткой и сообщающейся с грушей. Бюретку и грушу заполняли водой. Сосуд с перекисью опрокидывали и взбалтывали в течение 1 минуты. Каталазную активность выражали в мл O_2, выделившегося за одну минуту на грамм почвы [15].

Дыхательную активность почвы определяли весовым методом Изермейера и выражали в г поглощенного CO_2 [11].

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенной работы было установлено, что в деградированной почве общее количество микроорганизмов (по ОМЧ) было невысоким и составляло всего 10^5 КОЕ/г почвы. Этот показатель численности микроорганизмов является очень низким для данного типа почвы (серозем обыкновенный) [17]. Численность бактерий в деградированной почве составляла 10^3 КОЕ/г почвы, актиномицетов – 10^2 КОЕ/г почвы, мицелиальных грибов – $2{,}1\times10^5$ КОЕ/г почвы. Дрожжевые организмы присутствовали в незначительном количестве, и были представлены единичными колониями (рисунок).

Полученные показатели численности микроорганизмов свидетельствуют о существенном обеднении почвенной микрофлоры, а низкая численность бактерий на фоне высокой численности мицелиальных грибов указывает на крайне не благополучное экологическое состояние почвы.

Внесение ЭМ-ассоциации значительно активизировало микрофлору деградированной почвы. Через 10 суток после внесения ЭМ-ассоциаций отмечали увеличение как общей численности микроорганизмов (по ОМЧ), так и таких таксономических групп микроорганизмов как бактерии, актиномицеты и дрожжи. После 30 суток опыта численность микроорганизмов (по ОМЧ) в почве существенно возросла (на четыре порядка по сравнению с исходным содержанием). Так, если в исходной почве численность микроорганизмов составляла 10^3 КОЕ/г почвы, то через 30 суток после внесения ЭМ-ассоциации она составляла 10^7 КОЕ/г почвы. Содержание бактерий также увеличилось на четыре порядка, численность актиномицетов – на два порядка. Численность дрожжей, которые присутствовали в деградированных почвах в незначительном количестве, возросла до 10^4 КОЕ/г почвы. В то же время, отмечено снижение численности мицелиальных грибов на два порядка, что указывает на нормализацию почвенной микрофлоры (рисунок).

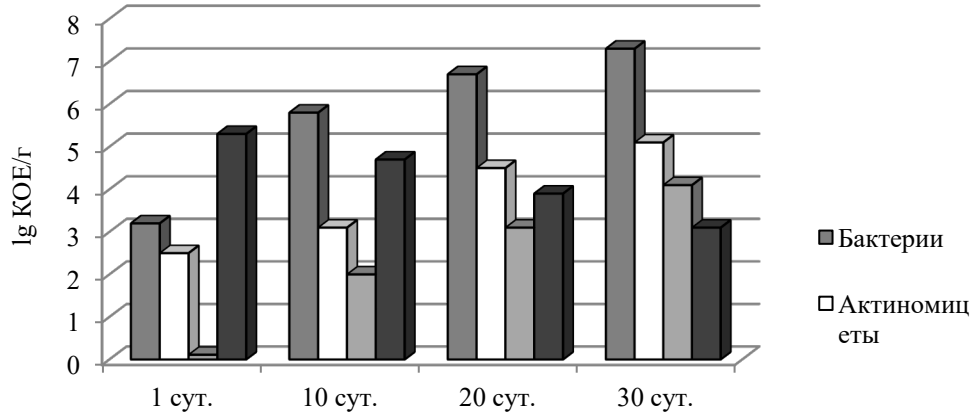


Рисунок – Динамика изменения количественного и качественного состава микрофлоры деградированных почв после внесения ЭМ-ассоциации

В целом, полученные результаты свидетельствуют о положительном влиянии интродукции ЭМ-ассоциации на аборигенную микрофлору деградированных почв, так как происходит существенно повышение ее численность и изменение структуры микробоценоза почвы, которая приближается по соотношению таксономических групп микроорганизмов к структуре «здоровой» микрофлоры почв.

Определение активности почвенных ферментов крайне важно для оценки состояния почвы, так как позволять судить о степени доступности для микробной мобилизации соединений азота, фосфора, серы и других. Можно сказать, что именно ферментативная активность почв определяет интенсивность и направленность биохимических процессов, от которых зависит плодородие почв [17].

Исследование ферментативной активности деградированной почвы показало, что исследуемая почва характеризовалась крайне низкой активностью почвенных ферментов (таблица).

Таблица – Динамика изменения ферментативной активности и почвенного дыхания при внесении ЭМ-ассоциаций в почву

Варианты опыта	Активность почвенных ферментов			Активность дыхания, г $CO_2/м^2/ч$
	Дегидрогеназа, ед. ОП	Каталаза, мл O_2/г/мин	Уреаза, мг NH_2/г/сут.	
1 сутки				
Исходная почва	0,11 ± 0,01	2,1 ± 0,1	0,14 ± 0,02	0,10 ± 0,01
10 суток				
Исходная почва	0,12 ± 0,01	2,3 ± 0,1	0,16 ± 0,02	0,11 ± 0,01
Ассоциация	0,41 ± 0,09	2,8 ± 0,2	0,38 ± 0,2	0,20 ± 0,02
20 суток				
Исходная почва	0,11 ± 0,01	2,0 ± 0,1	0,14 ± 0,01	0,12 ± 0,01
Ассоциация	0,65 ± 0,4	4,9 ± 0,2	0,49 ± 0,1	0,38 ± 0,03
30 суток				
Исходная почва	0,13 ± 0,002	2,2 ± 0,1	0,13 ± 0,02	0,10 ± 0,01
Ассоциация	0,96 ± 0,4	9,1 ± 0,3	0,73 ± 0,2	0,62 ± 0,02

Примечание: $p \leq 0,05$

Внесение в почву ЭМ-ассоциаций значительно активизирует почвенные процессы. Так, через 10 суток после внесения ассоциаций в почву активность дегидрогеназы возросла в 3,4 раза, через 20 суток в 6,0 раз, а через 30 суток в 7,4 раза. Изучение динамики изменения таких почвенных ферментов как каталаза и уреаза показало, что активность каталазы значительно возросла и через 30 суток превышала таковую в исходной почве в 4,0 раза, а уреазы в 5,6 раза. Также, из данных таблицы следует, что при внесении ассоциаций значительно активируется почвенное дыхание, которое через 30 суток возросло в 6,2 раз по сравнению с исходной почвой.

Таким образом, установлено, что внесение ЭМ-ассоциации в деградированную почву положительно влияет на ее микробную активность: значительно повышается общая численность и численность отдельных таксономических групп микрофлоры, происходит нормализация структуры микробоценоза. Кроме того, интродукция ЭМ-ассоциаций оказывает существенное влияние на активацию почвенных ферментов и значительно повышает интенсивность дыхания почв.

В целом, можно сказать, что интродукция ЭМ-ассоциации в деградированную почву приводит к повышению биологической активности почвы, что способствует восстановлению ее плодородия. Применение ЭМ-ассоциации можно рекомендовать как биологический способ восстановления плодородия деградированных почв.

Работа выполнена в рамках грантового проекта МОН РК № AP05131526 «Разработка ЭМ-ассоциаций и использование их в комплексной технологии восстановления плодородия деградированных почв юго-востока Казахстана», 2018–2020 годов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Почвы находятся под угрозой, но деградацию можно остановить http://www.fao.org/news/story/ru/item/357227/icode/ (опубл. 25.07.2018).
2. Хасанов А.Н., Хабиров И.К., Асылбаев И.Г., Рафиков Б.В. Биологические методы восстановления плодородия деградированных почв южной лесостепи Республики Башкортостан // Вестник Оренбургского Гос. Ун-та. 2017. № 11(211). С. 118–124.
3. Oluwasusi J.O. Vegetable farmers' attitude towards organic agriculture practices in selected states of South West Nigeria // J. Agri. Exten. Rural Develop. 2014. Vol. 6(7). P. 223–230.
4. Ye Xiao, Zhigang Huang, Xianguo Lu. Changes of soil labile organic carbon fractions and their relation to soil microbial characteristics in four typical wetlands of Sanjiang Plain, Northeast China // Ecol. Engin. -2015. Vol.82. P. 381–389. DOI: 10.1016/j.ecoleng.2015.05.015.
5. Kravchenko I., Kizilova A., Titova L., Iutinskaya G. Effect of microbial fertilizers on rhizospheric bacterial diversity and yield response of soybean plants //Agr. Sci. Develop. 2013. Vol.2(12). P. 120–125.
6. Маджугина А.А., Горелкина Г.А., Троценко И.А., Кныш А.И. Биотехнологическое восстановление земель сельскохозяйственного назначения // Вестник Алтайского Гос. Агр. Ун-та. 2015. № 12(134). С. 49–51.
7. Dotaniya M.L., Meena V. Rhizosphere effect on nutrient availability in soil and its uptake by plants // Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci. 2015. Vol. 85(1). P. 1–12. DOI 10.1007/s40011–013–0297–0.
8. Смирнова И.Э., Саданов А.К., Нурмуханбетова А.М., Султанова А.Ж. Влияние ассоциации агрономически ценных микроорганизмов на микрофлору деградированных почв // Междун. ж. прикл. фунд. исслед. 2017. № 1. С. 92–96.
9. Хархун Е.В., Полякова А.В., Внуков В.В., Ким Д.А. Состояние микробоценоза почвы после применения биопрепаратов на основе Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens (Pseudomonas aureofaciens) // Фунд. исслед. 2012. № 11(1). С. 56–60.
10. Andrews M., Cripps M.G., Edwards G.R. The potential of beneficial microorganisms in agricultural system // Ann. Appl. Biol. 2012. Vol. 160. P. 1–5.
11. Хазиев Ф.Х. Ферментативная активность почв. М.: Наука, 2005. 134 с.
12. Каштанов А., Щербаков А.П., Черкасов Г.Н. Методическое пособие и нормативные материалы для разработки адаптивно-ландшафтных систем земледелия. Курск: Прогресс, 2001. 259 с.
13. Егоров Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М.: МГУ, 1995. 224 с.
14. Емцев В.Т., Мишустин Е.Н. Микробиология. М.: Дрофа, 2005. 445 с.
15. Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. М.: МГУ, 1991. 304 с.
16. Боровиков В.П. Популярное введение в современный анализ данных в системе STATISTICA. М.: Горячая линия-Телеком, 2013. 288 с.
17. Pershina E.V., Ivanova E.A., Nagieva A.G., Zhiengaliev A.T., Chirak E.L., Andronov E.E., Sergaliev N. Kh. A Comparative analysis of microbiomes in natural and anthropogenically disturbed soils of Northwestern Kazakhstan // J Eurasian Soil Sci. 2016. Vol. 49(6). P. 673–684.
18. Минеев В.Г. Агрохимия. 2004. М.: МГУ. 720 с.

УДК 504.4.054:579.68

МИКРОБИОЦЕНОЗ СТОЧНЫХ ВОД

В.Б. Сбойчаков, О.В. Решетникова, А.А. Ганичева

Ленинградский государственный университет имени А.С. Пушкина, Лужский институт (филиал), г. Луга, Россия

Защита водного бассейна от загрязнений, образующихся в процессе очистки сточных вод, имеет в наше время огромное значение. Загрязнение водоемов, в которые сбрасывают сточные воды, отрицательно сказывается на состоянии его флоры и фауны. Для защиты водоемов от загрязнений определяются условия выпуска сточных вод, при которых качество воды в водных объектах не снижается ниже установленных предельно допустимых концентраций. Нависшая над человечеством угроза загрязнения всех водных бассейнов мира побуждает сосредоточить внимание на биологической очистке сточных вод, в основе которой лежат микробиологические процессы. Среди применяемых методов очистки сточных вод биологическая очистка является наиболее экономически рентабельной и доступной, а на практике она чаще всего оказывается единственно возможной [1, 8, 12, 13, 14].

Под микробиоценозом сточных вод в данном случае следует понимать совокупность популяций разных видов микроорганизмов, обитающих в промышленных сточных водах. В основе методов биологической очистки лежит использование микроорганизмов, разлагающих органические соединения в сточных водах. Чаще всего это аэротенки с активным илом из бактерий. Активный ил является своеобразным сообществом, довольно существенно отличающимся от природных экосистем. Адаптационные свойства организмов активного ила очень высоки. Данная экосистема подвержена постоянной изменчивости. До сих пор остается дискутабельным вопрос – обладают ли бактерии активного ила чувством кворума (quorum sensing), то есть способностью некоторых бактерий общаться и координировать своё поведение за счёт секреции молекулярных сигналов, как это бывает в биопленках [19].

Цель нашей работы состояла в изучении видового состава бактерий, участвующих в процессе очищения промышленных сточных вод Ленинградской области.

Пробы воды отбирали согласно ГОСТ РФ 5.592–2000 [2]. Идентификация выделенных культур осуществлялась на основании изучения тинкториальных свойств, культурально-морфологических и биохимических характеристик в соответствии с описанием, данным в определителе бактерий Bergey's «Manual of Systematic Bacteriology» [17, 21, 22]. Параллельно проводилась идентификация культур с помощью анализа 16S рДНК.

В составе сточных вод выявлены две основных группы поллютантов – консервативные и неконсервативные. Консервативные практически не поддавались биологическому разложению. Это частицы грунта, руды, пустой породы, шлак, неорганические соли тяжёлых металлов, фенолы, пестициды и т. д. В то же время неконсервативные поллютанты (нефтепродукты, органические кислоты и пр.) успешно подвергались процессам самоочищения водоёмов [8,10].

Биологический метод очистки сточных вод основан на способности бактерий использовать растворенные и коллоидные органические поллютанты в качестве источника питания и минерализовать их в процессе своей жизнедеятельности.

В аэробных условиях (аэротенки) при непрерывной подаче воздуха идет наращивание активного ила. По сути, биологическая очистка сточных вод представляет собой результат функционирования системы «активный ил – сточная вода». Биологическую очистку сточных вод проводили с целью удаления из них взвешенных и растворимых органических и неорганических соединений до концентраций, которые не превышают заранее регламентированные. Большинство бактерий, принимающих участие в очистке, являются гетеротрофами, потребляя только органические вещества. Это, как правило, представители водной микробиоты и некоторые обитатели желудочно-кишечного тракта человека и животных, поступающие с фекальными стоками.

Все микроорганизмы, находящиеся в аэротенке, попадали в него из внешних источников: вместе со сточной водой, из почвы и воздуха, заносились насекомыми. В условиях аэротенка происходила селекция микроорганизмов. Наиболее интенсивно развивались те бактерии, которые находят для себя благоприятные условия, в то время как другие виды подавлялись. Факторами, определяющими направление селекции следует считать степень аэрации, состав загрязнений, температуру, скорость роста, и др. [9]. Численность бактерий составляла от 10^9–10^{12} КОЕ/см^3.

При аэробной очистке сточных вод протекают два наиболее важных микробиологических процесса:

– окисление органического углерода;

– процессы нитрификации.

Для оптимальной работы активного ила необходимо присутствие трех основных групп бактерий:

– углеродокисляющих флоккулообразующих, участвующих в образовании хлопьев, для быстрого осаждения в отстойнике с образованием плотного ила;

– углеродокисляющих нитчатых, обеспечивающих формирование «скелета» вокруг которого образуются флоккулы, помимо этого они являются активными окислителями органических веществ;

– нитрификаторов, превращающих аммонийный азот в нитриты и нитраты.

В составе флоккулообразующих бактерии были выявлены микроорганизмы следующих родов: Actinomyces, Alcaligenes, Aeromonas, Arthrobacter, Bacillus, Brevibacterium, Cellulomonas, Cellulovibrio, Corynebacterium, Desulfotomaculum, Flavobacterium, Micrococcus, Mycobacterium, Nocardia, Pseudomonas, Sarcina и другие.

Бактерии рода Brevibacterium окисляют различные компоненты нефти, парафины, нафтены, фенолы, альдегиды, жирные кислоты. Это весьма актуально для очистки именно промышленных стоков. Окисление алифатических углеводородов происходит за счет бактерий рода Bacillus, углеводородов различных групп – Mycobacterium, а целлюлозы – за счет бактерий рода Cellulomonas.

Большая роль в формировании способности активного ила к хлопьеобразованию принадлежит бактериям рода Zoogloea (Z.ramigera), близким к псевдомонадам. Они разлагают широкий спектр загрязнений в сточной воде. В сточной воде Z. ramigera образовывали аморфные массы полисахаридов, в которых и находились колонии бактерии, напоминающие ветвистые деревья. Клетки Z. ramigera обнаруживались как правило в сильно загрязненных водоемах, где наблюдали взвешенные в воде хлопья, слизистые обрастания (зооглеи) на находящихся в воде предметах.

Нитчатые бактерии отвечают за окисление многочисленных органических соединений и образование каркаса, вокруг которого формируются флоккулы [5]. Систематическая принадлежность нитчатых бактерий определялась с помощью различных методов окрашивания. Эти методы основаны на способности микроорганизмов поглощать определенные красители-флюорохромы, в результате люминесценции бактерии приобретали четкие очертания, выявлялись наличие и формы трихом, строение оболочки, присутствие зерен волютина. На основании этого и устанавливалась их родовая принадлежность.

В то же время данные бактерии являются основной причиной плохого осаждения ила в отстойнике и образования так называемого «вспухания». Вспухание активного ила – это реакция биоценоза на неблагоприятные экологические условия [11]. При большом количестве поступающих органических веществ активный ил не способен к их быстрому окислению. Возникает недостаток кислорода в иловой смеси, бактерии-гетеротрофы заменяются более устойчивыми нитчатыми бактериями родов Sphaerotilus, Beggiatoa, Thiotrix и др. При этом нарушаются флоккуляционные свойства, осаждение активного ила. Происходит вынос ила из вторичных отстойников. Все это приводит к ухудшению качества очищенных сточных вод.

Целесообразно различать гелевое вспухание ила в связи с преобладанием полисахаридопродуцирующих бактерий (роды Zoogloea, Pseudomonas, Aeromonas, Acinetobacter, Micrococcus, Paracoccus). Нитчатое же вспухание возникает при чрезмерном развитии и накоплении бактерий с нитчатой структурой (хламидобактерии родов Sphaerotilus, Thiothrix, Beggiatoa, нитчатые сине-зеленые водоросли и сапрофитные грибы).

Денитрификация во вторичных отстойниках приводит к формированию пузырьков азота, что затрудняет устранение ила из сточных вод на выходе. Бактерии-нитрификаторы (представители родов Nitrosomonas, Nitrobacter) выполняют роль окислителей аммонийных ионов и выводят минеральный азот из стоков. Пока в сточной воде присутствуют органические вещества, аммиак потребляется гетеротрофами. После того как органические вещества минерализуются, начинают действовать нитрификаторы.

Нитрификаторы (Nitrosomonas, Nitrosospira, Nitrosolobus) окисляют аммиак до нитритов. Затем другая группа нитрификаторов (Nitrobacter, Nitrospina, Nitrococcus) окисляет нитриты до нитратов. Большинство нитрифицирующих бактерий являются автотрофами, их рост угнетается в присутствии органических веществ. Гетеротрофные бактерии-нитрификаторы растут довольно медленно и не могут конкурировать с остальными гетеротрофами за пищевые субстраты и кислород.

Поскольку в сравнении с гетеротрофными углеродокисляющими бактериями нитрификаторы развиваются гораздо медленнее, то в связи с этим производительность аэротенка может существенно снижаться. Наиболее активно процессы нитрификации протекают после окисления так называемой «органики». Для очищения сточных вод целесообразно использовать бактерии, способные принимать участие в процессе, известном под названием «анаммокс» (анаэробное окисление аммония) [18,20]. Бактерии, осуществляющие анаммокс, относятся к типу планктомицетов. Это представители родов Kuenenia (K. stuttgartiensis), Brocadia (B. anammoxidans, B. fulgida, B. sinica), Anammoxoglobus (A. propionicus), Jettenia (J. asiatica), Scalindua (S. brodae, S. sorokinii, S. wagneri, S. profunda).

В бактериях, осуществляющих анаммокс, содержатся так называемые аннамоксосомы, в которых и происходит процесс анаммокса. Кроме того, их мембраны содержат особые ладдерановые липиды. Эти бактерии отличаются низкой скоростью роста: время удвоения численности составляет несколько недель. Они способны осуществлять превращения субстратов анаммокса (аммоний и нитриты) даже при очень низкой их концентрации. Ферменты этих бактерий, осуществляющие катаболические реакции анаммокса, придают клеткам характерный красный цвет.

Грамотрицательные бактерии кокковой флоры вида Paracoccus denitrificans совместно с Nitrosomonas europaea обладали более высокой способностью восстанавливать нитрит до газообразного азота, что существенно упрощало процесс удаления азота из сточных вод [23].

Нитрифицирующие бактерии целесообразно использовать в качестве индикаторов процесса очистки, поскольку их появление в очищаемой воде свидетельствует о минерализации основной части органических веществ.

При очищении стоков с большим содержанием углеводов и дефицитом азота имело место интенсивное развитие гетероферментативных молочнокислых бактерий рода Leuconostoc, которые образуют мощную декстрановую капсулу, затрудняющую осаждение ила во вторичном отстойнике.

При недостаточном уровне аэрации развивались анаэробные процессы с участием микроорганизмов, осуществляющих маслянокислое брожение, сульфатредукцию, денитрификацию и т. д. В сточных водах с высоким содержанием серы при недостатке кислорода в иловой смеси, при наличии в сточных водах токсичных веществ (медь, цинк и т. д.) в активном иле развивались сульфатредукторы, тионовые и серобактерии (наиболее часто встречались бактерии рода Thiobacillus). Тионовые микроорганизмы развивались при условии содержания в стоках восстановленных соединений серы. Группу серобактерий объединяет свойство откладывать капли серы внутри клеток или на их поверхности. Бесцветные серные бактерии родов Beggiatoa, Thiothrix, Leucothrix и др. способны формировать длинные нити. В качестве окисляемого субстрата эти бактерии используют сероводород, при недостатке сероводорода сера окисляется в серную кислоту.

Сульфатредукцию осуществляли не только сульфатвосстанавливающие бактерии известных родов, но также метанообразующие архебактерии и отдельные гетеротрофы, которые способны растворять оксиды свинца, меди, марганца, кадмия, цинка, урана, с последующим фотохимическим разложением в аэробных условиях.

В составе активного ила довольно часто обнаруживались грибы, развитию которых способствовала кислая реакция среды, хотя их количество было незначительным: Trichosporon, Rhodotorula, Mucor, Rhizopus, Aspergillus, Penicillum, Fusarium и другие.

При высоком содержании соединений железа, характерном для водных источников Северо-Запада России, в активном иле выявляли микроорганизмы рода Ferrobacillus.

Литические микроорганизмы и бактерии-паразиты рода Bdellovibrio, присоединяясь к клеткам других бактерий, проникали в них и размножались, что приводило к лизису. Литические микроорганизмы разрушали клетки других бактерий за счет воздействия выделяемых ими литических ферментов.

В активном иле часто присутствовали фототрофные цианобактерии, переходящие к гетеротрофному питанию. Это приводило к утрате ими пигментов, и клетки цианобактерий становились бесцветными. Во вторичных отстойниках клетки цианобактерий часто приобретали зеленую окраску, а в местах сильного освещения – типичную сине-зеленую. Наиболее часто встречались цианобактерии родов Anabaena, Aphanizomenon, Microcystis, Nostoc, Osillatoria. Цианобактерии устойчивы к воздействию неблагоприятных факторов среды, а также токсикантов, поэтому они могут достигать значительной численности в активном иле аэротенков и также вызывать вспухание. Они способны вызывать и эвтрофикацию водоемов.

Биомасса активного ила, участвующего в анаэробном разложении, состояла из двух основных групп бактерий:

– кислотообразующих;

– метаногенных.

Наиболее многочисленными (до 80 % от численности бактерий активного ила) бактериями являлись микроорганизмы рода Pseudomonas. В принципе, все природные органические и даже синтетические соединения могут разлагаться псевдомонадами. Широкие ферментативные возможности позволяют некоторым видам бактерий рода Pseudomonas разлагать антисептики, дезинфектанты, толуол, бензол, этилбензол, нафталин, каучук, резины, смазочные масла и т. д. [16].

Наиболее часто обнаруживались виды P.stutzeri, P.fluorescens, P. putida, P. rahtonis и др. Различные виды рода Pseudomonas способны вызывать превращение хлорорганических соединений, и в том числе пестицидов, восстанавливать нитрогруппу нитроароматических соединенийдо газообразных продуктов с последующим разрывом бензольного кольца, использовать капролактам в качестве единственного источника углерода и азота. Некоторые виды рода Pseudomonas способны разрушать серусодержащие соединения, в частности поверхностно-активные вещества (ПАВ) – соли сложных эфиров серной кислоты и алкилсульфонаты. Ацетат при утилизации его псевдомонадами разлагается на CO_2 и H_2O.

К активным деструкторам, часто встречающимся на очистных сооружениях, относятся представители рода Bacillus. Бактерии этого рода имеют палочковидную форму, образуют споры, большинство видов подвижны, некоторые из них способны к хлопьеобразованию. B. subtilis и B. mesentericus относятся к наиболее активным деструкторам капролактама в гексаметилендиамина. Эти же бациллы окисляют алифатические углеводороды.

В активном иле практически всегда присутствовали актиномицеты (родов Gordonia, Rhodococcus). Из-за присутствия актиномицетов активный ил обладал землисто-плесневым запахом за счет летучих продуктов своей жизнедеятельности (2-метилизоборнеол и геосмин).

Благодаря разнообразию видов кислотообразующих микроорганизмов жизнедеятельность биоценоза анаэробного ила довольна устойчива к изменению кислотности окружающей среды. В то же время слишком высокое содержание органических кислот способно подавить стадию ацетогенеза – разложение до уксусной кислоты.

Группа метаногенных бактерий именуется по конечному продукту процессов жизнедеятельности – метану. Эта группа была представлена метановыми археями нескольких видов, которые в качестве питательной среды используют продукты жизнедеятельности кислотообразующих бактерий. Образование метана происходит с использованием двух механизмов. При реакции первого типа микроорганизмы окисляют метиловый спирт и уксусную кислоту, выделяя при этом метан и углекислый газ. Реакции второго типа характерны для бактерий, использующих выделяющийся в реакциях первого типа углекислый газ, а также водород, образующийся при распаде карбоновых кислот и сложных спиртов. Оба процесса протекают одновременно, в результате чего образуется смесь газов, состоящая на 70 % из метана и на 30 % – из диоксида углерода.

В отличие от кислотообразующих, метаногенные бактерии чувствительны к показателям кислотности окружающей среды и реагируют даже на повышение концентрации солей азотной и серной кислоты. Кроме того, уровень комфортной температуры для метаногенных микроорганизмов находится в пределах 35–40^0 С. При большем содержании ионов водорода метаногенные бактерии погибают, в результате чего процесс разложения приостанавливается на стадии накопления жирных кислот, что впоследствии приводит к полному его прекращению [15].

Помимо бактерий в активном иле выявляли и простейших (инфузории, коловратки, тихоходки, водные клещики и т. д.).

Качество очищения сточных вод определялось содержанием в них бактерий группы кишечных палочек (БГКП), колифагов, сульфатредуцирующих клостридий. Обязательным условием являлось отсутствие в воде патогенных микроорганизмов [3, 4, 6, 7].

В результате такой полезной деятельности бактерий сточные воды очищаются настолько, что преобразовываются в техническую прозрачную воду без запаха и цвета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Водный кодекс Российской Федерации (с изменениями на 27 декабря 2018 года; редакция, действующая с 1 июля 2019 года)
2. ГОСТ РФ 5.592–2000 «Вода. Общие требования к отбору проб»
3. СанПиН 2.1.5.980–00 «Гигиенические требования к охране поверхностных вод»
4. СаНПиН 2.1.5.2582–10 «Санитарно-эпидемиологические требования к охране прибрежных вод морей от загрязнения в местах водопользования населения»
5. Методы санитарно-биологического контроля. Методическое руководство по гидробиологическому контролю нитчатых микроорганизмов активного ила (ПНД Ф СБ 14.1.92–96)
6. МУ 2.1.5.800 – 99 «Организация Госсанэпиднадзора за обеззараживанием сточных вод»
7. МУК 4.2.1884–04 «Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов»
8. Голицин, А.Н. Промышленная экология и мониторинг загрязнения природной среды / А.Н. Голицин. – М.: Изд-во «Оникс», 2007. – 331 с.
9. Григорьева, К.И. Проект аэробной очистки сточных вод для водочистительных станций / К.И. Григорьева, Л.П. Сидорова // Фундаментальные и прикладные исследования в области естественных и технических наук: Материалы Межд. науч.-практ. конф. – Белгород, 2018. – С. 60–64.
10. Грушко, Я.М. Вредные органические соединения в промышленных сточных водах / Я.М. Грушко. – Л.: Химия, 1982, – 142 с.
11. Жмур, Н.С. Биологические системы очистки / Н.С. Жмур – М.: Акварос, 2003. – 507 с.
12. Ивчатов, А.Л. Химия воды и микробиология / А.Л. Ивчатов – М.: ИНФРА-М, 2006. – 218 с.
13. Калмыков, А.А. Возможности утилизации отходов на очистных сооружениях / А.А. Калмыков // Экология производства. – 2017. – № 6. – С. 50–56.
14. Новиков, Ю.В. Экология, окружающая среда и человек / Ю.В. Новиков. – М. : ФАИР-ПРЕСС, 2005. -736 с.
15. Троценко, Ю.А. Аэробные метилобактерии / Ю.А. Троценко, Н.В. Доронина, М.Л. Торгонская // Пущино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2010. – 325 с.
16. Убайдуллаева, А.К. Восстановление нитратов культурой P.stutzeri, иммобилизованных на различных носителях // А.К. Убайдуллаева, К.К. Байтурсунов, Г.Н. Асанова, А.А. Мустафаева // Вестник КазНМУ. – 2018. – № 1. – С. 266–268
17. Bergey's manual of determinative bacteriology, 1974 eighth edition, 1268 p.
18. Boumann, H.A. Biophysical properties of membrane lipids of anammox bacteria / H.A. Boumann, M. Longo, P. Stroeve, B. Poolman // Biochimica et biophysica acta. – 2009. – Vol. 1788, № 7. – P. 1444–1451
19. Fuqua, W.C. Quorum Sensing in Bacteria: the LuxR-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulatorst / W.C. Fuqua, S.C. Winans, E.P. Greenberg // J. of Bacteriology. – 1994. – Vol. 176, № 2. – P. 269–275
20. Jetten, M.S. Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria / M.S. Jetten, L. Niftrik, M. Strous, B. Kartal B. // Critical reviews in biochemistry and molecular biology. – 2009. – Vol. 44, №. 2–3. – P. 65–84
21. The Prokaryotes. A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria, 1981, volume 1, 1102 p.
22. The Prokaryotes. A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria, 1981, volume 2, p. 1103–2284.
23. Ter Beek, J. The nitric-oxide reductase from Paracoccus denitrificans uses a single specific proton pathway / J. Ter Beek, N. Krause, J. Reimann, P. Lachmann, P. Ädelroth // J. Biol. Chem. - 2013. – Vol. 288, № 42. – P. 30626–30635

УДК 581.14

ВЫЗВАННАЯ АНТИОКСИДАНТОМ СТИМУЛЯЦИЯ РОСТА РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА МИНЕРАЛЬНОГО ПИТАНИЯ

Н.В. Будаговская

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

В данной статье представлены результаты исследований быстрых (мин) и более медленных (ч) ростовых реакций растений, выращенных в условиях дефицита минерального питания, на действие антиоксиданта амбиола. Ранее нами было показано в длительных (многодневных) экспериментах, что присутствие амбиола в корневой зоне растений вызывает стимуляцию роста как корней, так и надземной части [1]. Однако, характер изменений ростовых процессов в коротких временных интервалах, особенно в начальный период воздействия амбиола, оставался неясным. Использование высокочувствительного метода – лазерной интерференционной ауксанометрии позволило исследовать эти процессы.

Измерение скорости роста листьев растений проводили с помощью лазерного интерференционного ауксанометра ЛИНА–ЭМЗД (Россия). Растения овса сорта “Горизонт” выращивали в промытом песке. За три дня до начала эксперимента растения пересаживали по одному в чашки Петри диаметром 5 см. В процессе выращивания растения поливали водопроводной водой, при проведении эксперимента для контрольного полива использовали дистиллированную воду. Водный раствор амбиола (0,01 мМ) вносили в субстрат в зоне корней. Измерение скорости роста листьев 9–12-дневных растений проводили на ауксанометре до и после добавления амбиола при температуре 25° С и влажности воздуха 64 %.

Растения выращивали в условиях дефицита минерального питания, что приводило к снижению скорости их роста. Показано, что при дефиците минерального питания в растениях усиливается образование активных форм кислорода, увеличивается проницаемость мембран [2, 3]. Поэтому добавление экзогенного антиоксиданта к растениям, испытывающим дефицит минерального питания, может способствовать улучшению состояния мембран и увеличению функциональной активности растений.

На рис. 1 и 2 представлены кривые изменения скорости роста 2-го листа растения овса сорта «Горизонт» при добавлении амбиола в зону корней. После однократного добавления амбиола в корневую зону отмечалась двухфазная ответная реакция листа: быстрая и медленная. Быстрое увеличение скорости роста листа началось с первых минут после внесения антиоксиданта (рис. 1).

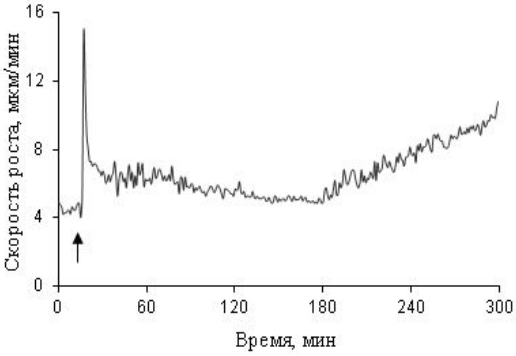


Рис. 1. Влияние амбиола на скорость роста 2-го листа 9-дневного растения овса сорта «Горизонт», ↑ – момент добавления амбиола (1 мл, 0,01 мМ)

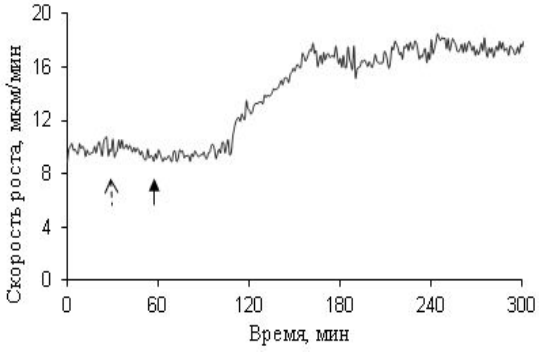


Рис. 2. Влияние амбиола на скорость роста 2-го листа 12-дневного растения овса сорта «Горизонт», ↑ – момент добавления дистиллированной воды (1 мл), ↑ – момент добавления амбиола (1 мл, 0,01 мМ)

Быстрая фаза увеличения линейных размеров листа может быть связана с гидродинамическим эффектом – усилением транспорта воды из корней в листья, вызванным амбиолом и, вследствие этого, повышением тургора тканей и их растяжением. Кроме того, возможно, амбиол может непосредственно влиять на растяжимость тканей. Было показано, что стимуляторы роста, изменяя ориентацию микротрубочек цитоскелета, делают оболочки клеток более растяжимыми [4]. Подобные изменения могут иметь место при действии на растения амбиола, что может приводить к быстрому увеличению линейных размеров листа.

Более медленное увеличение скорости роста листа прослеживалось через 2 ч 50 мин после добавления амбиола (рис. 1). Медленная фаза увеличения скорости роста листа может быть индуцирована метаболическими изменениями, связанными с экспрессией генов и биосинтезами de novo, что может привести к повышению скорости роста листа. Интервал времени около 3-х часов от момента добавления амбиола до начала медленной фазы был необходим для таких изменений.

При однократном добавлении амбиола скорость роста листа в процессе двухфазной ответной реакции увеличилась в 2,4 раза за 4 ч 50 мин. Повышение скорости роста листа было устойчивым, на 4-й день после добавления антиоксиданта скорость роста листа не снизилась. Контрольное добавление воды не привело к изменению скорости роста листа (рис. 2). Через 30 мин после добавления воды был внесен раствор амбиола в корневую зону растения вторично (на 4-й день после первоначального). Динамика скорости роста листа после вторичного добавления амбиола отличалась от динамики скорости роста листа при первичном внесении этого антиоксиданта. После добавления амбиола сразу не последовало быстрой ответной реакции листа, а повышение скорости роста листа (вначале быстрое, затем медленное) началось через 45 мин после добавления амбиола и окончилось быстрее (за 1 ч.), чем в первом случае. При этом скорость роста листа увеличилась почти в два раза. Различия в динамике скорости роста листа после первичного и вторичного добавления амбиола могли быть обусловлены как предшествующим внесению амбиола добавлением воды, так и теми изменениями в растении, которые были вызваны первоначальным добавлением антиоксиданта в первый день эксперимента (влиянием на мембраны, сигнальные системы, экспрессию генов, цитоскелет).

Вызванное внесением амбиола в корневую зону повышение скорости роста листьев было показано также в наших экспериментах с растениями пшеницы и риса, выращенными в условиях дефицита минерального питания [5]. В экспериментах с этими растениями тоже было отмечено наличие двухфазной ответной реакции растений на действие амбиола (быстрой и медленной).

Таким образом, внесение антиоксиданта амбиола в корневую зону растений, выращенных в условиях дефицита минерального питания, приводит к увеличению скорости роста листьев в течение нескольких часов в процессе быстрой и медленной ответной реакции растений на действие антиоксиданта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Будаговская Н.В. Индуцированная антиоксидантами стимуляция роста растений кукурузы в условиях блокирования кальциевых каналов // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования. – М.: РУДН, 2015. – С. 118–124.

2. Cakmak I. and Marschner H. Enhanced superoxide radical production in roots of zinc-deficient plants. // J. Exp. Bot. – 1988a. – 39, – P. 1449–1460.

3. Cakmak I. and Marschner H. Zinc-dependent changes in ESR signals, NADPH oxidase and plasma membrane permeability in cotton roots. // Phys. Plant. – 1988b – 73, – P. 182–186.

4. Васильев А.В. Сравнительная структурно-функциональная характеристика цитоскелета животных и высших растений // Журнал общей биологии. – 1996. – Т. 57, С. 293–325.

5. Budagovskaya N.V. Rapid and slow response reactions of plants on effect of antioxidant ambiol. // Advanced Research on Plant Lipids, N. Murata et al. (eds.), – Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2003. – P. 323–326.

УДК 574.47

ЭКТОМИКОРИЗНЫЕ АССОЦИАЦИИ СОСНЫ СИБИРСКОЙ PINUS SIBIRICA DU TOUR КАК БИОТИЧЕСКИЙ ФАКТОР УСТОЙЧИВОСТИ КЕДРОВЫХ ЛЕСОВ

О.Б. Вайшля, К.С. Карбышева, Н.С. Москвитина, *А.Е. Нурлаби

Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия
**Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина, Астана, Республика Казахстан*

В Российской Федерации покрытые лесом земли составляют 717,7 млн. га. Самые большие площади заняты хвойными лесообразующими породами: 504,3 млн. га, из них насаждения лиственницы составляют 261,4 млн. га; сосны – 115,2; ели – 74,6; кедра – 38,8 и пихты – 14,2 млн. га [4]. Хорошо известна обязательная микотрофность этих видов хвойных [10–11]. Эктомикоризы – это симбиотические органы, образованные мицелием почвенных грибов и корнями высших сосудистых растений. Устойчивость биогеохимических циклов углерода, азота и фосфора в бореальных лесных экосистемах во многом обеспечивается именно микотрофностью деревьев, поскольку посредством данного микробно-растительного симбиоза углерод, получаемый биотрофными грибами в обмен на мобилизованные питательные элементы, перераспределяется в почвенную среду.

Исследование посвящено сосне сибирской кедровой (Pinus sibirica Du Tour), относящейся к растениям-эдификаторам лесных экосистем и являющейся высокомикотрофным растением, которое при отсутствии микоризы не растет и не развивается [1, 4].

У рода Pinus описано несколько типов микотрофных симбиотических ассоциаций: эктотрофные микоризы, эктэндотрофные и псевдомикоризы. В отечественных источниках существует описание эктомикориз кедра, которые подразделяются на войлочно-пушистую, булавовидную, шнуровидную и нитчатую [2]. Продолжая эти исследования микосимбиотрофизма, И.А. Селиванов выделял тип эумицетных хальмофаговых эктомикориз с плектенхиматическим и псевдопаренхиматическим чехлами, а также их подтипы [5]. Согласно Р. Агереру, при исследовании экомикориз необходимо учитывать комплекс морфологических и анатомических признаков – таких, как характер ветвления, цвет окончания, особенности поверхности мантии, наличие и параметры внешнего мицелия [6]. Характеристики внешнего мицелия чехла эктомикориз определяют «трофическую стратегию» – exploration type. Под данным термином подразумевается определенная стратегия зондирования, получения и доставки растению питательных веществ грибным симбионтом. Считается, что exploration type эктомикориз зависит от видовой принадлежности грибного партнера [7–9].

Сосна сибирская – это коренная порода темнохвойной тайги Сибири, в прошлом широко распространенная в европейской части России. Потепление и развитие широколиственных лесов вызвало сокращение ареала этого вида, и к настоящему времени сибирский кедр Pinus sibirica Du Tour, тем не менее, растет на большой территории России от Тиманского кряжа до Монголии и Китая [3]. Алтай является наиболее молодой системой гор Южной Сибири, разделенных эрозионно-денудационными и ледниковыми процессами на отдельные хребты, массивы и межгорные котловины. Это самая высокая часть Алтае-Саянской горной системы на юге Сибири. Как продолжение кедровых лесов Алтая, встречается сосна кедровая и в северо-восточной части Казахстана. Особый интерес в смысле благополучности биотопа представляет изучение микоризного сообщества в припоселковых кедровниках – окультуренных участках леса на плодородных долинных и заболоченных почвах, за которыми бережно ухаживают местные жители, начиная с момента заселения этой территории. В Западной Сибири самые ценные и большие массивы этих уникальных лесных экосистем расположены на севере Кемеровской и юге Томской области, где выполнено данное исследование. На территории Западной Сибири и Казахстана анализ микотрофности P. sibirica ранее не проводился, для этого вида до сих пор полностью не определены все грибные симбионты и применяемые ими "трофические стратегии" [10, 12].

Целью работы являлось изучение разнообразия морфотипов эктомикоризных ассоциаций подроста Pinus sibirica в лесных биотопах Горного Алтая и равнинных лесах южной и средней тайги Западной Сибири, различающихся по степени антропогенной нагрузки.

В течение летнего периода 2009–2018 гг. исследовали восемь лесных биотопов, удаленных на значительном расстоянии друг от друга, отличающихся высотностью над уровнем моря и типом тайги, а также характеризующихся разной антропогенной нагрузкой. В Горном Алтае исследованы эктомикоризы кедра на горном склоне около водопада Эстюба; просека ЛЭП – вырубка трехлетней давности у поселка Кебезень с высокой инсоляцией подроста; перевал Обого, самая высокая точка из всех мест сбора подроста кедра, расположенная на высоте 1270 м над уровнем моря, где сосредоточены самые крупные запасы древесины Горного Алтая (268 м3/га). В Томской области изучен подрост кедра из лесных биотопов южной и средней тайги. Калтайское лесничество считается оптимумом произрастания кедра. Темерчинское лесничество – это сосновый разнотравно-зеленомошный лес с подростом кедра и березы, несет следы последствий былых вырубок, лесных пожаров, вблизи дорог наблюдается вытаптывание подстилки. Почва – подзол альфегумусовый. Припоселковый кедровник деревни Лоскутово – это кедровый разнотравный лес, иногда переходит в пихтово-кедровый. Во многих местах наблюдается деградация травянистого яруса в результате антропогенного воздействия и захламленность. Почвенный покров представлен серыми глубоко оподзоленными почвами. Припоселковый кедрач деревни Зоркальцево – это кедровник мелкотравный, здесь наблюдается сочетание антропогенных факторов: механические повреждения ствола при заготовке кедрового ореха, вытаптывание подстилки, уплотнение поверхностных горизонтов и разрушение структуры почвы; биотических факторов – дереворазрушающих грибов Phaeolus schweinitz и Phellinus pini, гнилевые болезни, переносчиком которых является рыжий сосновый пилильщик Neodiprion sertifer Geoffr. и абиотических факторов – воздействие сильных ветров. Почва темно-серая лесная. Александровское лесничество отличается от других мест сбора образцов по Томской области северной широтностью и представлено биотопами черневой тайги.

Сеянцы кедра извлекали из почвы с максимально ненарушенной корневой системой. Образцы заворачивали в алюминиевую фольгу и хранили в лаборатории при температуре плюс 4 градуса по Цельсию. Корни промывали проточной водой, резали на отрезки 3–5 см, эктомикоризные окончания отделяли под лупой пинцетом и ножницами. Для морфологического и анатомического исследования отбирали живые, функционирующие эктомикоризы. Морфотипирование проводили по системе DEEMY при помощи бинокулярного микроскопа Zeiss Stemi 2000-C с камерой AxioCam ER 5s, на основании характера ветвления, цвета эктомикоризного окончания, особенностей поверхности мантии, наличия или отсутствия внешнего мицелия и ризоморф [6]. В каждом исследуемом лесном биоценозе было собрано и обработано не менее 100 сеянцев сосны сибирской. Результаты измерений длины хвои, стебля, главного корня, количества поглощающих и микоризованных корней по каждому месту произрастания заносили в протоколы, корневую систему этикетировали и помещали в 70 % этанол для изучения морфотипов эктомикориз (EcM) и выделения ДНК. Известно, что ростовые параметры зависят от стадии онтогенеза древесной породы, поэтому для полноты получения данных и удобства проведения статистической обработки весь зафиксированный подрост был разделен на четыре возрастные группы: I возрастная группа (1–3 года); II возрастная группа (4–7 лет); III возрастная группа (8–14 лет); IV возрастная группа (15 лет и более). Возраст сеянцев определяли при помощи прибора «LinTab-6 Tree-ring Station» (Германия), а также при помощи методики ретроспективного анализа по следам мест заложения почек на стебле. В течение года побеги закладываются метамерно: раз в год закладываются на побеге три зоны: зона стерильных катафилов, зона брахибластов и зона ауксибластов. Соответственно, можно узнать возраст сеянца, подсчитав количество метамеров. Первый год отсчитывали от зоны гипокотиля. Обработку данных проводили с помощью программы Excel пакета Microsoft Office.

В течение десяти лет мы описали 42 различных типа эктомикоризных окончаний, образованных грибами-макромицетами, основываясь на данных атласа Р. Агерера (Таблица 1). Некоторые макромицеты удалось выделить из эктомикоризных окончаний и ввести в культуру. На основе многолетних наблюдений – сбора плодовых тел рядом с кедром, их идентификации по микро- и макропризнакам и сравнении с литературными данными, по ITS-идентификации грибных симбионтов из эктомикориз кедра, мы составили список эктомикоризообразующих макромицетов для сосны сибирской, который включает 67 видов [12]. В изученных лесных биоценозах наиболее распространенными во всех биотопах оказались морфотипы № 25, 45, 54, 57, 118.

Некоторые из них приурочены к конкретному местообитанию кедра: например, типы эктомикориз № 47, 48, 112 встретились только на склоне горы около водопада Эстюба. Наиболее экзотические, редко встречающиеся типы эктомикориз были обнаружены нами в тех лесных биоценозах, где по той или иной причине рост кедра лимитирован. Так, на территории Республики Алтай материал был собран на скалистом склоне около водопада Эстюба, где толщина почвенного слоя очень мала. Территория Иогачского лесничества, где происходил основной сбор материала, по количеству выпадающих осадков – это один из наиболее увлажненных районов Горного Алтая. В среднем здесь выпадает за год 700–750 мм осадков, по долинам рек Уймень, Кара-Кокша – до 950, а в отдельные годы – и до 1120 мм. На распределение осадков большое влияние оказывают высота и расположение хребтов. Так на побережье Телецкого озера выпадает осадков: в Артыбаше – 850 мм, в Яйлю -840, в Беля – 500, а в Балыкче – 400 мм, хотя расстояние между этими пунктами не превышает 50 км. Для гор характерным является понижение температуры воздуха в среднем на 0,7 градусов по Цельсию с поднятием на каждые 100 метров, при одновременном увеличении количества осадков. На территории Томской области Зоркальцевский кедрач характеризуется высокой антропогенной нагрузкой вследствие неконтролируемого сбора кедрового ореха местным населением. Максимальное количество редких морфотипов эктомикориз отмечено в Александровском лесничестве в месте произрастания с высокой инсоляцией и повышенным увлажнением. Возможной причиной этого является избыточное увлажнение почвы. Основная роль микориз – это доставка воды с растворенными минеральными элементами. Как правило, эту функцию выполняют, так называемые, «long distance morphotypes» эктомикориз. Александровские варианты собраны на границе леса и болота, где в почве много влаги – по-видимому, в этом случае в симбиотические отношения вступают другие виды грибов и, соответственно, формируют другие типы микоризных окончаний.

Таблица 1 – Встречаемость различных морфотипов эктомикориз сосны сибирской в лесных экосистемах Горного Алтая и Западной Сибири (указана высота над уровнем моря)

Морфотип эктомикоризной ассоциации	Горный Алтай Перевал Обого, 1270 м	Горный Алтай Пос. Кебезень, 410 м	Горный Алтай Водопад Эстюба, 435 м	Томск Зоркальцевский кедровник, 115 м	Томск Калтайское лесничество, 119 м	Томск Лоскутовский кедровник, 127 м	Томск Темерчинское лесничество, 121 м	Томск Александровское лесничество, 47 м
M32								+
M39				+				
M47			+					
M48								+
M55			+					
M68				+				
M72				+				
M91					+			
M95								+
M98								+
M109								+
M112			+					
M113								+
M117								+
M12	+	+		+	+		+	+
M13	+	+		+		+		+
M27		+	+	+	+		+	+
M30		+			+	+	+	+
M31		+	+	+	+			+
M33		+		+		+		+
M35	+			+		+	+	+
M38	+		+	+	+			+
M44		+				+		+
M53			+		+	+	+	
M59		+		+		+		
M67			+			+		+
M74		+		+		+		+
M76	+	+	+	+	+		+	
M78	+	+	+	+	+	+	+	
M81		+						+
M85	+	+		+	+			
M92	+			+		+	+	
M96					+			+
M101	+	+		+	+	+	+	+
M118			+	+	+	+		
M119					+	+	+	+
M124		+			+	+	+	+
M25	+	+	+	+	+	+	+	+
M26	+	+	+	+	+	+	+	+
M45	+	+	+	+	+	+	+	+
M57	+	+	+	+	+	+	+	+
M54	+	+	+	+	+	+	+	+

Примечание. Красным цветом выделены морфотипы, которые встретились только в одном лесном биоценозе; синим цветом – типы эктомикориз, обнаруженные во всех лесных биоценозах

Показано, что для оценки эффекта микотрофности сосны сибирской по индексу микоризации наиболее информативным является морфометрический показатель «длина хвои». Во всех возрастных группах обнаружена обратная зависимость между данным параметром и индексом микоризации, что может быть связано с перераспределением потока углеводов на нужды фотосинтетического аппарата, а не на поддержание симбиотических отношений с грибом-макромицетом.

Максимальные значения индекса микоризации обнаружены у подроста второй возрастной группы 4–7 лет в неблагоприятных условиях произрастания кедра: у поселка Кебезень в Горном Алтае и в Зоркальцевском лесничестве Томской области. В данной возрастной группе хорошо заметны различия длины стебля между Томской областью и Республикой Алтай (Таблица 2).

Максимальная длина зафиксирована в лесном биотопе в районе перевала Обого, а минимальная в Александровском лесничестве. Возможно, это объясняется разностью в высотности места сбора материала: перевал Обого располагается на высоте 1270 м над уровнем моря, пос. Кебезень – на высоте 410 м, Калтайское лесничество – 119 м, Зоркальцевский кедрач – 115 м, Александровское лесничество – 47 м над уровнем моря.

Таблица 2 – Показатели микотрофности сеянцев сосны сибирской II возрастной группы в южной и средней тайге Томской области и лесных биоценозах Алтая

Изученные лесные биоценозы	Средние морфологические показатели		Количество микоризованных корней, %	Значение индекса микоризации
	Длина стебля, мм	Длина хвои, мм		
Перевал Обого	239 ± 39,03	54,0 ± 6,12	28	0,32
Поселок Кебезень	183 ± 12,64	50,3 ± 9,48	38	0,36
Зоркальцевское лесничество	147 ± 22,78	49,6 ± 6,34	44	0,42
Калтайское лесничество	173 ± 26,24	61,8 ± 8,67	39	0,36
Александровское лесничество	111 ± 10,03	45,7 ± 6,61	26	0,32

Установлено, что в третьей возрастной группе 8–14 лет значения показателя «длина стебля» увеличиваются от Алтая до Томской области, а параметр «количество микоризованных корней» уменьшается, что объясняется разными почвенными и климатическими условиями горных и равнинных лесов Западной Сибири. Для первых трех возрастных групп (до 15 лет) показано наибольшое разнообразие эктомикоризных окончаний и, соответственно, их трофических специализаций, что позволяет дереву быстро реагировать на изменения условий его произрастания.

Таким образом, микотрофность сосны сибирской является важнейшим биотическим фактором благополучности лесных биоценозов. Наиболее разнообразные, экзотические типы эктомикориз обнаружены в местах с лимитирующими факторами роста кедра: на территории Республики Алтай – около водопада Эстюба на каменистой почве; в Томской области – в антропогенно измененном Зоркальцевском кедраче. Максимальное количество редких морфотипов эктомикориз отмечено в Александровском лесничестве Томской области в месте произрастания с высокой инсоляцией и повышенным увлажнением.

Исследование выполнено при поддержке «Программы повышения конкурентоспособности Томского государственного университета», по проекту РФФИ № 15–29–02588 «Биота микоризообразующих макромицетов сосняков и кедровников Томской области и их экосистемная роль»; по гранту ФЦП № II-706 "Оценка микотрофности и бактериальной биоты ризосферы хвойных в лесных экосистемах Западной Сибири"; по проекту № ИРН-BR06249252 Целевой программы Республики Казахстан «Микоризные макромицеты основных лесообразующих пород Центрального и Северо-Восточного Казахстана и их использование для искусственной микоризации сеянцев лесных древесных пород.

ЛИТЕРАТУРА

1. Данченко А.М., Бех И.А. Кедровые леса Западной Сибири. Томск: Томский государственный университет, 2010. 424 с.

2. Иванова Р.Н. Кедр сибирский. Иркутское книжное издательство, 1958. С. 40.

3. Киреев Д.М. Лесное ландшафтоведение: текст лекций. СПб: СПбЛТА, 2002, С 109.

4. Парамонов Е.Г. Хвойные на юге Западной Сибири: монография / Е.Г. Парамонов. Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2011. 329 с.

5. Селиванов И.А. Микосимбиотрофизм как форма консортивных связей в растительном покрове Советского Союза. М., 1981. С. 35

6. Agerer R.R. 1998, DEEMY, a DELTA-based system for characterization and Determination of EctoMYcorrhizae.

7. Agerer R. Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizae. Mycological Progress, 2006, Vol. 5, pp. 67–107.
8. Kõljalg U., Nilsson R.H., Abarenkov K. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. Molecular Ecology, 2013. Vol. 22, pp. 5271–5277.
9. Lileskov E.A., Hobbie E.A., Horton T.R. Conservation of ectomycorrhizal fungi: exploring the linkages between functional and taxonomic responses to anthropogenic N deposition. Fungal ecology, 2011. Vol. 4, pp. 174–183.
10. Roman, M.A. revision of the descriptions of ectomycorrhizas published since 1961 / M. Roman, V. Claveria, M. Miguel. Mycology research, 2005. Vol. 109 (10), pp. 1063–1104.
11. Smith S.E., Read D.J. Mycorrhizal symbiosis. 3rd ed. San Diego, Calif. 2008. 800p.
12. Tedersoo L., May T.W., Smith M.E. Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. Mycorrhiza, 2010. Vol. 20, pp. 217–263.
13. Vaishlya O.B., Kudashova N.N., Gashkov S.I., Karbysheva K.S., Bakhtinskaya I.A. First list of macromycetes forming ectomycorrhizas in cedar and pine forests of Tomsk region of West Siberia. International Journal of Environmental Studies, 2017. Vol. 74 (5), pp. 752–770. DOI: 10.1080/00207233.2017.1294422

УДК 579.669.213

БИОГЕОТЕХНОЛОГИЯ ПЕРЕРАБОТКИ ЗАБАЛАНСОВЫХ ЗОЛОТОСУЛЬФИДНЫХ РУД И КОНЦЕНТРАТОВ ГП «НАВОИЙСКИЙ ГОРНО-МЕТАЛЛУРГИЧЕСКИЙ КОМБИНАТ» РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН

[1] М.Г. Сагдиева, [2] Д.Я. Мирталипов, [2] З.Г. Сагдиева, [2] З.В. Калиниченко, [2] Л.М. Гиляметдинова

[1] ГП «Институт минеральных ресурсов» Госкомгеологии и минеральных ресурсов, Ташкент, Республика Узбекистан

[2] Институт микробиологии Академии наук, Ташкент, Республика Узбекистан

В последнее время во всех горнодобывающих странах мира особое внимание уделяется техногенному минеральному сырью (техногенные месторождения твердых полезных ископаемых), которое образуется в процессе добычи и переработки руд, что связано с одной стороны, с высокой ценой благородных и цветных металлов, с другой, с возрастанием интереса к освоению техногенных месторождений, содержащих цветные, благородные и редкие металлы.

Особое внимание уделяется биовыщелачиванию золота из отвальных золотосульфидных руд. В Российской Федерации рядом авторов проводятся лабораторные и укрупненно-лабораторные испытания кучного биовыщелачивания золотосульфидных руд, в США на месторождении Карлин успешно используется биотехнология переработки отвальных золотосодержащих руд на куче производительностью 3 млн тонн руды (1–4).

Проблема переработки отвальных забалансовых руд актуальна и для Государственного предприятия «Навоийский горно-металлургический комбинат» Республики Узбекистан. С 2008 года на Гидрометаллургическом заводе 3 (ГМЗ-3) запущена технология биоокисления флотоконцентратов, полученных из руд месторождений Кокпатас и Даугызтау. На сегодняшний день количество отвальных забалансовых сульфидных руд месторождений Кокпатас и Даугызтау составляет около двадцати миллионов тонн.

Биотехнология переработки забалансовых руд месторождения Кокпатас

В работе использовали технологическую пробу руды КС-15 – забалансовые сульфидные руды месторождения Кокпатас с различным классом крупности руды: -3 + 0 мм; -10 + 0 мм и -25 + 0 мм. В таблице 1 представлены данные химического анализа исходной руды.

Таблица 1 Данные химического анализа исходных проб отвальных руд

№ проб	Содержание, %						
	Au, г/т	As	$Fe_{общ}$	$S_{общ}$	$S_{сульф.}$	$C_{орг}$	CO_2
КС – 15	1,3	0,423	5,82	2,27	1,92	0,16	5,5

Как видно из данных таблицы 1, содержание золота составляет 1,3 г/т, сульфидной серы 1,92 %, углерода органического 0,16 %. По данным рационального анализа цианируемое золото в руде КС-15 составляет 0,34 г./т (26,1 %), золото тонковкрапленное в сульфидах – 0,61 г./т (47 %), а золото тонковкрапленное в породообразующих минералах – 0,25 г./т (19,2 %).

Цианируемое золото в руде КС-15 составляет 0,36 г./т (27,7 %), а золото тонковкрапленное в сульфидах – 0,69 г./т (53,1 %), а тонковкрапленное золото в породообразующих минералах – 0,21 г./т (16,1). Проба руды по химическому и рациональному анализам относится к забалансовым сульфидным рудам. При проведении лабораторных и укрупненно-лабораторных испытаний по биовыщелачиванию отвальных руд при различном классе крупности руды: -3 + 0 мм; -10 + 0 мм и -25 + 0 мм были определены влагоемкость, проницаемость, расход серной кислоты. Показано, что эти параметры зависят от класса крупности руды: чем мельче руда, тем больше влагоемкость и расход серной кислоты и меньше проницаемость. Процесс закисления руды длился 49 суток. На рисунке представлено изменение величины pH растворов в процессе закисления отвальной руды КС-15. В стадии закисления величина pH растворов снижается от 8,2 до 2,5, при этом количество железо- и серуокисляющих бактерий увеличивается от 0 до 6,0 х 10^4кл/мл и 2,5 х 10^2кл/мл соответственно, а численность тиосульфатокисляющих снижается от 2,5 х 10^6кл/мл до 0. После закисления руды для интенсификации процесса биовыщелачивания руду орошали ацидофильной ассоциацией железо-серуокисляющих бактерий 4КП, выделенной из сульфидных руд месторождения Кокпатас, при этом количество железоокисляющих бактерий на предлагаемой нами среде практически не отличается от численности бактерий, выращенных на среде 9К (6).

Результаты лабораторных и укрупненно-лабораторных испытаний, проведенных в течении 10 месяцев и 8 месяцев соответственно, показали, что несмотря на высокую карбонатность отвальных забалансовых руд месторождения Кокпатас, метод кучного биовыщелачивания пригоден для переработки отвальных забалансовых сульфидных руд месторождения Кокпатас. В целом, наблюдается общая тенденция во всех вариантах эксперимента: в твердых пробах численность бактерий выше, чем в растворах, что свидетельствует о прикреплении клеток к поверхности руды и окислении сульфидных минералов. Клетки, находящиеся в растворах, окисляют закисное железо в окисное и восстановленные соединения серы, которые образуются за счет окисления серы сульфидной.

Результаты химического анализа биокеков показали, что содержание золота увеличилось от 1,3 до 1,8 г/т, содержание сульфидной серы уменьшилось от 1,92 % до 0,97–1,08 %, что свидетельствует об активном разрушении в руде сульфидных минералов: арсенопирита и пирита. Результаты рационального анализа биокеков подтверждают данные химического анализа: процент извлечения свободного золота из руды равно 63,3 % (-3 + 0); 60,7 % (-10 + 0); 57,5 % (-25 + 0), что свидетельствует об увеличении процента извлечения свободного (цианируемого) золота на 36,6 % (-3 + 0); 33,0 % (-10 + 0) и 29,8 % (-25 + 0) соответственно. Аналогичные данные были получены при проведении укрупненно-лабораторных испытаний на массе руды 25 кг, которые проводились в течение 8 месяцев. Биокеки укрупненно-лабораторных испытаний подвергались сорбционному цианированию, данные представлены в таблице 2.

Таблица 2 Результаты сорбционного цианирования продуктов после биовыщелачивания проб руды КС-15 с различным классом крупности (масса руды 25 кг)

Класс крупности	Показатели цианирования					Результаты цианирования			
	Время, час		Концентрация NaCN, мг/л		pH	Содержание Au, г/т			Извлечение Au, %
	Предв. цианир	Сорбц. цианир.	Начальная	Конечная		Исх.	После предв. цианир.	В хвостах сорбции	
-25 + 0	6	12	250	240	10,6	1,4	0,98	0,85	39,3
	-	18	250	240	10,5	1,4	–	0,76	45,7
-10 + 0	6	12	250	230	10,5	1,5	0,87	0,69	54
	-	18	250	240	10,5	1,5	-	0,69	54
-3 + 0	6	12	250	230	10,6	1,7	0,57	0,41	75,9
	-	18	250	220	10,5	1,7	–	0,27	84,1

Результаты сорбционного цианирования биокеков исследуемой руды показали, что излечение золота из продуктов после биовыщелачивания руд обратно пропорционально классу крупности, т. е. чем мельче частицы руды, тем выше извлечение золота: -25 + 0 мм – 39,3 и 45,7 %, -10 + 0 мм – 54 и 54 %, -3 + 0 мм – 75,9 и 84,1 %.

Следует отметить, цианирование продуктов после биовыщелачивания руды крупностью -10 + 0 мм и -3 + 0 мм превышает 50 %. Испытания разрабатываемой биотехнологии переработки технологической пробы К-15 на пилотных установках показали, что за 6 месяцев процент окисления сульфидной серы колеблется от 70,8 до 85,1 %, а извлечение золота сорбционным цианированием достигает 76–82 %. На основании проведенных испытаний кучного биовыщелачивания забалансовых руд месторождения Кокпатас разработан технологический регламент для проведения полупромышленных испытаний на массе руды 100 тонн.

Таким образом, результаты рационального анализа и сорбционного цианирования биокеков подтверждают, что забалансовые руды, несмотря на то, что они являются высококарбонатными и упорными, они подвергаются бактериальной обработке, что свидетельствует об их пригодности для переработки методом кучного биовыщелачивания.

Биотехнология переработки золотосульфидных концентратов НГМК

Проблема переработки золотосульфидных руд и концентратов актуальна и для Республики Узбекистан, так как большинство золотосодержащих месторождений республики характеризуются упорными золотосульфидными рудами. За исключением уникального месторождения Мурунтау и некоторых отработанных месторождений (Пирмираб, Гузаксай, Каульды) практически все остальные крупные золотосодержащие месторождения, как Кокпатас, Даугызтау, Зармитан, Маржанбулак, Кочбулак, Амантайтау, Аджибугут, а также мелкие – Сармич, Биран и другие, характеризуются рудами, которые относятся к труднообогатимым золотосульфидным рудам, переработка которых классическими способами нерентабельна (5, 6).

В 2008 году на Гидрометаллургическом заводе № 3 (ГМЗ-3) Навоийского горно-металлургического комбината (НГМК) запущен цех биоокисления флотоконцентратов, полученных при обогащении сульфидных руд месторождений Кокпатас и Даугызтау. С целью выяснения низкой окисляемости сульфидных минералов в цехе биоокисления флотоконцентратов ГМЗ-3 проведен анализ микробиологической активности при биоокислении флотоконцентратов, на основе которого было выявлено следующее:

– Флотоконцентрат, полученный из сульфидных руд месторождения Даугызтау, обладает двойной упорностью, что негативно сказывается на показателях технологического процесса;

– Непостоянство среды обитания для ацидофильной ассоциации железо – серуокислящих бактерий в первичных биореакторах, связанное с разнообразием вещественного состава флотоконцентратов, полученных из руд месторождений Кокпатас и Даугызтау;

– Высокое содержание углистых веществ в рудах месторождений Кокпатас и особенно Даугызтау. Эти соединения оказывают незначительное действие на геохимическую активность ассоциации бактерий, но они оказывают негативное влияние на процесс сорбционного цианирования, так как обладают способностью сорбировать растворенное золото. Кроме того, флотоконцентраты месторождений Кокпатас и Даугызтау содержат в достаточном количестве золото, которое не извлекается в процессе биоокисления, что сказывается на показателях сквозного извлечения основного металла;

– Процесс окисления, т. е. разрушения минералов, приводит к тому, что не перешедшие в раствор элементы претерпевают ряд изменений. Они могут либо войти в состав вновь образованных соединений, не меняя своей валентности (кальций переходит в состав гипсов) или, как в случае серы, увеличивают свою реакционную способность за счет частичного окисления. Таким образом, показатель «сульфидная сера», определяемый как разность между содержанием общей серы и сульфатной, дает только суммарное количество восстановленных соединений серы с валентностью от + 4 до – 2, а не их качественный состав. Наличие таких соединений серы в твердой фазе, на наш взгляд, незначительно сказывается на активности бактериального вскрытия сульфидов, но может негативно влиять на эффективность последующих стадий технологического процесса (7);

– Проводимые нами исследования по биоокислению флотоконцентрата, собственные эксперименты и наблюдения позволяют считать, что оптимальным значением pH пульпы является pH 1,6–1,8;

– Защелачивание пульпы известняком способствует увеличению плотности пульпы за счет образования гипса, который оказывает негативное действие на процесс биоокисления флотоконцентрата, нейтрализуя такой сильный окислитель, как трехвалентное железо, и кроме того, известняк способствует также обильному пенообразованию в биореакторах.

Для решения указанных проблем предлагаются следующие возможные пути:

– Для более полного окисления сульфидной серы на самом участке биоокисления флотоконцентрата необходимо увеличить фронт процесса, за счет увеличения количества биореакторов – четыре первичных и четыре вторичных;

– Использование жидкой фазы пульпы в качестве оборотных растворов с активной ассоциацией железо – серуокислящих бактерий и возвращение ее в первичные биореакторы, что позволит интенсифицировать процесс биоокисления флотоконцентратов;

– Оптимальным pH пульпы в биореакторах следует считать pH 1,6–1,8, что позволит в значительной степени уменьшить количество используемого известняка;

– Целесообразно на первой линии цеха биоокисления перерабатывать флотоконцентрат, полученный из руд месторождения Кокпатас, на второй – месторождения Даугызтау с подбором оптимальных показателей технологического процесса для каждой линии.

Для повышения экономической эффективности работы ГМЗ-3 проведены исследования по замене импортируемых из России компонентов: диаммоний фосфата и сульфата калия на местные реагенты – аммофос и сульфат калия, производимые ОАО "Максам – Чирчик" (8). Замена диаммоний фосфата на аммофос была внедрена в 2011 году на ГМЗ-3 и имеет высокую экономическую эффективность.

Таким образом, проведенные на ГМЗ-3 научно-исследовательские работы по анализу микробиологической активности при биоокислении флотоконцентратов, по подбору питательной среды с использованием местных реагентов и предлагаемые рекомендации позволят интенсифицировать процесс биоокисления флотоконцентратов и повысить экономическую эффективность.

В 2010 году в НГМК был запущен ГМЗ-4, который перерабатывает окисленные золотосодержащие руды месторождения Зармитан. Однако известно, что нижние слои месторождения характеризуются высоким содержанием арсенопирита и пирита.

С целью разработки технологии бактериального вскрытия золота из золотомышьяковистых концентратов месторождения Зармитан были проведены исследования по пригодности флотационного концентрата, полученного из руд месторождения Зармитан, с содержанием мышьяка 16,2 %. В работе были испытаны 5 различных ацидофильных ассоциаций тионовых бактерий с преобладанием Acidithiobacillus ferrooxidans, выделенных из месторождений Зармитан при следующих условиях культивирования: диапазоны соотношений твердой и жидкой фазы от Т: Ж = 1:5 до Т: Ж = 1:50, температуре 28–32°С, pH 1,8–2,2 и при различных условиях аэрации. На основании проведенных исследований было показано, что для бактериального вскрытия золота из флотоконцентрата Зармитан оптимальны: ассоциация At. ferrooxidans В-12, выделенная из руд данного месторождения, температура 28–32°С; pH 1,8–2,2; Т: Ж = 1:5, аэрация 0,2–0,4 л/сек. При бактериальном вскрытии флотоконцентрата в отмеченных выше оптимальных условиях концентрация бактерий через 7 суток составляла 10^7–10^9 кл/мл, концентрация мышьяка 8,2–8,6 г/л, из которой 80 % составляла As^{3+}, концентрация железа в растворе – 18,6 г/л, из них 16,6 г/л оказалось Fe^3+, активность бактерий по железу – 3,5–4,8 г/л час, Eh – 580 мВ. Проведенные лабораторные эксперименты показали, что флотоконцентрат месторождения Зармитан пригоден для бактериального выщелачивания, а эффективность процесса зависит от активности культуры, от вещественного и минералогического состава концентрата и условий выщелачивания. Лабораторные испытания эффективности бактериального вскрытия золота из флотоконцент

рата месторождения Зармитан проводили в совместных исследованиях с Институтом микробиологии РАН и Московским институтом стали и сплавов (МИСиС). Выщелачивание проводили в установке МИСиС (на протоке) и установке «БИЛАФ» Института микробиологии РАН. В работе использовали ассоциацию At. ferrooxidans В-12. Выполненные лабораторные и укрупненно-лабораторные испытания бактериальной технологии показали, что в процессе бактериального вскрытия золота за 100–120 часов выщелачивается более 90 % мышьяка. При этом содержание его в пачуках составляло 6–7 г./л, железа 14–18 г./л, концентрация бактерий варьировала от 10^7 до 10^9 кл/мл, pH 1,5–2,2, Eh среды увеличился от 420 мВ до 620 мВ. После бактериального вскрытия биокеки подвергали цианированию, данные которого отражены в таблице 3.

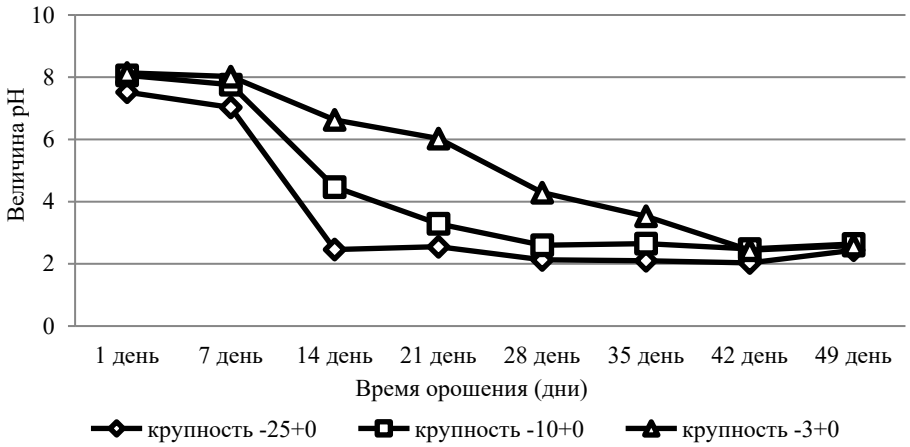


Рис. Изменение величины pH растворов в процессе закисления руды

Результаты экспериментов по извлечению золота методом цианирования флотоконцентрата Зармитан показали, что после бактериальной обработки извлечение его увеличивается от 67,16 % до 89–92 %, а серебра от 39,25 % до 62–66 % (9).

Таблица 3 Извлечение золота методом цианирования биокека после бактериального выщелачивания золотомышьяковистого концентрата месторождения Зармитан

Образец	Содержание As в концентратах, %	Извлечение драгметаллов после цианирования, %	
		Au	Ag
Исходный концентрат	16,20	67,2	39,5
Биокек 1	1,58	89,0	66,7
Биокек 2	1,46	92,3	62,0

На основании проведенных исследований технологии бактериального вскрытия золота из золотомышьяковистого концентрата был разработан лабораторный регламент и рассчитан ожидаемый экономический эффект от внедрения данной технологии, который по предварительным данным составил 25–30 % от прибыли в год.

ЛИТЕРАТУРА

Седельникова Г.В., Крылов Г.С., Королев Н.И. Зеленов В.И. Кучное выщелачивание перспективный способ переработки техногенного золотосодержащего сырья // Руды и металлы 2000, № 5 с. 63–65;

M.E. Clark, J. Batty, C. van Buuren, D. Dew and M. Eamon Biotechnology In Minerals Processing: Technological Breakthroughs Creating Value // Proceedings of 16th International Biohydrometallurgy Symposium, Cape Town, South Africa, 25–29 September 2005, p. XVII-XXIVI.

Адамов Э.В., Панин В.В. Биотехнология металлов // Москва, Изд-во МИСиС, 2008, 152 с.

Rawlings D.E., Dew D., Plessis C. Biomineralization of metal-containing ores and concentrates // TRENDS in Biotechnology. 2003. Vol. 21, № 1. P. 38–44.

Сагдиева М.Г., Борминский С.И. Технология бактериального вскрытия золота из золотомышьяковистого концентрата // Журнал «Горный вестник Узбекистана», 2003, с. 51–54.

Мустакимов О.М., Магбулова Н.А., Мирталипов Д.Я., Цой А.В. Развитие биогидрометаллургии золота в Республике Узбекистан. // Журнал «Горный вестник Узбекистана». № 2, 2014. с. 84–88.

Санакулов К.С., Сагдиева М.Г. Биогидрометаллургия в Республике Узбекистан: состояние, проблемы и перспективы развития // Журнал «Горный вестник Узбекистана». № 1, 2015. с. 3–5.

Мустакимов О.М., Мавжудова А.М., Черкасова Г.В., Сагдиева М.Г. Подбор оптимальных питательных сред для биоокисления флотационного концентрата месторождения Кокпатас / Журнал «Горный вестник Узбекистана» 2012. № 3 с. 58–61.

Сагдиева М.Г., Голобородько В.И., Айропетова Ж.С., Зайнитдинова Л.И. Бактериально-химическое вскрытие золота из Зармитанского золотомышьяковистого концентрата // ДАН РУз, 1995, № 1, с. 45–47.

УДК 631.4

СДВИГИ В ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ СТЕХИОМЕТРИИ ПРИ АБИОТИЧЕСКОМ СТРЕССЕ

Д.М. Дударева, А.К. Квиткина, И.В. Евдокимов

Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, Пущино, Россия

Глобальные изменения климата приводят к существенной трансформации структуры лесных экосистем, емкости и скорости малого биологического круговорота веществ, а также к увеличению частоты и интенсивности экстремальных климатических событий – резких изменений температуры и количества осадков. Такие абиотические стрессы кардинально изменяют круговорот элементов в экосистемах, воздействуя на величины C:N:P в биомассе почвенных микроорганизмов. Сосновые леса, произрастающие в зоне теплового воздействия факелов попутного газа, могут быть использованы в качестве модельных объектов, имитирующих лесные экосистемы, развивающиеся в условиях глобального изменения климата. При сжигании попутного газа в факелах наблюдается повышение температуры воздуха и почвы, уменьшается влагообеспеченность корнеобитаемого слоя на прилегающей территории. В связи с этим целью нашего исследования было определить изменения соотношений C:N:P в почве и микробной биомассе при тепловом влиянии факела попутного газа. Мы предположили, что при абиотическом стрессе нагрева и иссушения происходит сужение соотношений C:N, C:P и N:P вследствие потерь C и N из-за усиления минерализации почвенного органического вещества (ПОВ).

На территории Покачевского лесничества (ХМАО-Югра) в 2000 г. была заложена пробная площадь (ПП) в сосняке лишайниковом в сухих дренированных условиях. ПП была разделена на 7 секций, ширина каждой по 10 м, а длина – 40–60 м. На расстоянии 70 м от фронтальной границы ближайшей к факелу секции I находится действующий факел попутного газа. Объектами исследований были: почва (подзол иллювиально-железистый стратифицированный песчаный), хвоя, древесина ствола сосны и лесная подстилка. Отбор образцов проводили в 5-кратной повторности в секциях I, III и VII, а также на контрольной площадке, находящейся вне зоны действия факела.

При анализе полученных данных по секциям установлено, что содержание C, N и P в почве, водорастворимых формах и микробной биомассе зависит от действия абиотических факторов иссушения и нагрева. На ближайшей к факелу секции I в почве наблюдалось как минимальное содержание биофильных элементов, так и сужение величин C:N, C:P и N:P в почве и микробной биомассе в 1,5–3,0 раза по сравнению с остальными секциями. Это означает, что в условиях воздействия стресса почвенное органическое вещество в целом и наиболее активный пул ПОВ – биомасса почвенных микроорганизмов – в частности, наиболее подвержены минерализации. Для водорастворимых форм была выявлена противоположная тенденция увеличения при усилении эффекта факела. Это соответствует нашему предположению об усилении минерализации в почве вблизи факела: снижение относительного содержания углерода и азота в составе устойчивых пулов ПОВ происходило параллельно с увеличением относительного содержания C в самых лабильных пулах – водорастворимых. Секция I с максимальным тепловым и иссушающим воздействием факела характеризуется более высокими значениями содержания азота и фосфора (2–6 раз, в зависимости от показателя) в хвое и подстилке. Это говорит о том, что при повышенных температурах и иссушении происходит накопление биофильных элементов в надземной биомассе растений сосны. Единственным исключением было содержание азота и фосфора в подстилке, где более высокое значение было при отсутствии или минимальном воздействии факела. Низкое соотношение N:P в подстилке (< 26) указывает на возможный дефицит азота для микроорганизмов, что соответствует данным о высоком соотношении C:N в подстилке и почве (76 – 422 и 18 – 30, соответственно). Выявлена тенденция к увеличению соотношений C:N и C:P в биомассе растений по мере удаления от факела, а для подстилки – обратная тенденция. Показатели экологической стехиометрии в растительном материале обнаружили устойчивость C:P для древесины и вариабельность для хвои. В целом, так же, как и для показателей экологической стехиометрии в почве, секция I с максимальным стрессом иссушения и нагрева проявила резкие изменения в стехиометрии растительной биомассы и подстилки по сравнению с другими вариантами. Значительное сужение соотношения C:N:P в составе хвои вблизи факела послужило дополнительным фактором усиления минерализации органического вещества в почве, выявленного по сужению C:N:P в составе почвы и микробной биомассы.

Таким образом, при тепловом воздействии факела почвенное органическое вещество в целом, и её самый активный пул (биомасса почвенных микроорганизмов) – в частности, подвержены наибольшей минерализации. Для водорастворимых форм была выявлена противоположная тенденция: увеличение стехиометрических соотношений при повышении теплового воздействия факела. Это также соответствует нашему предположению об усилении минерализации в почве вблизи факела: доля C и N в составе устойчивых пулов ПОВ снижалась, а содержание углерода в лабильных (водорастворимых) пулах – увеличивалось.

Итак, полученные нами данные свидетельствуют о том, что рабочая гипотеза о сужении соотношений C:N, C:P и N:P при тепловом и иссушающем воздействии факела подтвердилась для почвы, почвенной микробной биомассы и хвои. Для водорастворимых форм биофильных элементов наблюдалась обратная тенденция. Вероятно, при процессах минерализации и гумификации ПОВ, приводящих к обеднению устойчивого пула почвы по C и N, создаются условия для обогащения низкомолекулярными растворимыми формами углерода в лабильном пуле.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 17–04–01933-а).

УДК 328

ГИДРОТЕРМАЛЬНОЕ СЖИЖЕНИЕ БИОМАССЫ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ И ВОДНОЙ РАСТИТЕЛЬНОСТИ В ПРИСУТСТВИИ КАТАЛИЗАТОРА

М.С. Власкин, М.С. Котелев

РГУ нефти и газа (НИУ) имени И.М. Губкина, Москва, Россия,

Биомасса микроводорослей как сырье для производства биотоплив третьего поколения выгодно отличается от сельскохозяйственного сырья тем, что не требует для своего производства значительных посевных площадей и не может значительно влиять на стоимость пищевых культур на мировом рынке [1, 2]. Также, использование микроводорослей в качестве базового сырья для биоэнергетики более перспективно по сравнению с древесным сырьем, поскольку биомасса микроводорослей может быть воспроизведена в промышленных условиях с высокой эффективностью, а её свойства могут варьироваться в процессе культивирования в зависимости от выбранного назначения [3].

Наиболее дешевым методом переработки биомассы микроводорослей является пиролиз и газификация [4], однако из-за высокой влажности биомассы после стадии культивирования (80–90 %), данные способы не могут быть признаны эффективными.

Задачей настоящей работы было исследовать метод гидротермального сжижения биомассы микроводорослей или т.н. «мокрого пиролиза», а также охарактеризовать состав получаемой на выходе «бионефти» – сложной смеси органических соединений. В отличие от сухого пиролиза гидротемальному сжижению подвергают влажную биомассу, что позволяет значительно снизить энергозатраты.

В качестве сырья была использована биомасса цианобактерий Arthrospira platensis, процесс гидротермального сжижения проводили в реакторе-автоклаве при трех различных температурах: 270, 300 и 330 °C. Продукты переработки извлекали из реактора, отделяли от водной и твердой фазы, а затем анализировали методом термогравиметрии. Также от полученной бионефти отделяли бензиновую фракцию (интервал кипения от н.к. до 220 °C) и анализировали её методом хромато-масс-спектрометрии.

В таблице 1 представлены данные по выходу бионефти и теплоте сгорания получаемых продуктов.

Таблица 1 – Количественные показатели процесса гидротермального сжижения, проводимого при различной температуре

ПОКАЗАТЕЛЬ	270 °C	300 °C	330 °C
Выход сухой бионефти, %	27,3	27,6	32,6
Выход бензиновой фракции, %	11,9	12,1	17,0
Теплота сгорания бионефти, МДж/кг	35,6	36,8	37,7

На рисунке 1 представлены кривые разгонки бионефти, полученные по результатам термогравиметрического анализа. Данные кривые показывают, что получаемая бионефть имеет схожий фракционный состав с ископаемой нефтью, а, следовательно, потенциально может быть переработана с ней совместно в условиях нефтеперерабатывающего завода.

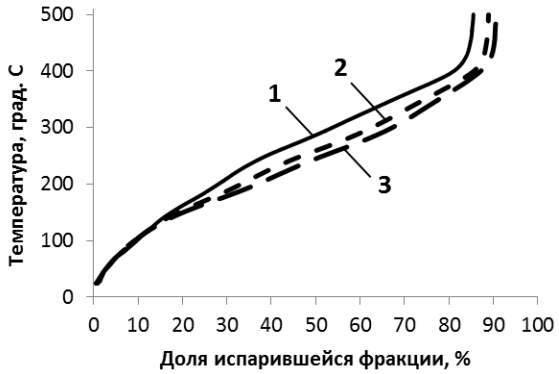


Рисунок 1 – Кривые разгонки бионефти, полученной при различных температурах: 1 – 270 °С, 2 – 300 °С, 3 – 330 °С

При более низкой температуре гидротермального сжижения повышается содержания, снижается содержание легкокипящих компонентов (бензиновой фракции) выход среднедистиллятных фракций при этом увеличивается, что говорит о прохождении процессов легкого крекинга при более высокой температуре. Также при низких температурах выход жидких продуктов в целом снижается на 10–15 процентов снижает выход жидких продуктов в целом. Кроме того, полученные продукты обладают слегка пониженной теплотой сгорания.

По результатам хромато-масс-спектрометрии было установлено групповой состав компонентов бензиновой фракции получаемой бионефти, результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Групповой состав бензиновой фракции бионефти, полученной при различной температуре

КОМПОНЕНТЫ	270 °С	300 °С	330 °С
Ароматические углеводороды	41,6	55,1	67,8
н-Алканы	21,5	7,8	5,8
Фенолы	4,9	2,2	1,9
Циклоалканы	2,6	1,2	1,3
Органические сульфиды	0,5	1,4	0,6
Пиридины	0,2	0,3	0,6

Бензиновая фракция бионефти содержит большой процент ароматических углеводородов, а также алканов нормального и циклического строения, это делает похожим её на прямогонный бензин, получаемый из ископаемой нефти. Высокое содержание толуола, этилбензола и стирола (около 50 %) свидетельствует о высоком значении октанового числа получаемой бензиновой фракции. С другой стороны, значительное количество фенолов, органических сульфидов и азотсодержащих соединений не позволяет рекомендовать данный продукт для использования в качестве добавки к топливу без применения дополнительных процессов облагораживания, таких как гидроочистка и мягкий гидрокрекинг.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение о предоставлении субсидии № 14.574.21.0137, уникальный идентификатор проекта RFMEFI57417 x 0137).

ЛИТЕРАТУРА:

Clarens, A.F., Resurreccion, E.P., White, M.A. and Colosi, L.M., 2010. Environmental life cycle comparison of algae to other bioenergy feedstocks. Environmental science & technology, 44(5), pp.1813–1819.

Adeniyi, O.M., Azimov, U. and Burluka, A., 2018. Algae biofuel: Current status and future applications. Renewable and sustainable energy reviews, 90, pp.316–335.

Kotelev, M.S., Antonov, I.A., Beskorovainyi, A.V. and Vinokurov, V.A., 2013. Photobioreactor operation condition optimization for high-energy cyanobacterial biomass synthesis to produce third-generation biofuels. Chemistry and Technology of Fuels and Oils, 49(1), pp.1–4.

Marcilla, A., Catalá, L., García-Quesada, J.C., Valdés, F.J. and Hernández, M.R., 2013. A review of thermochemical conversion of microalgae. Renewable and sustainable energy reviews, 27, pp.11–19.

УДК 591.531.1

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА БОРЬБЫ С ИНВАЗИОННЫМИ ЗОЛОТАРНИКАМИ

А.Н. Панкрушина, В.М. Шмелёв

Тверской государственный университет, Тверь, Россия

Среди наиболее активных чужеродных видов растений, распространяющихся в настоящее время в Средней России, стоит отметить североамериканские виды рода Solidago: золотарник гигантский (Solidago gigantea Ait.) и золотарник канадский (Solidago canadensis L.). Распространению этих растений способствуют урбанизация, строительство автомобильных дорог и железнодорожных путей и связанное с этим нарушение естественных фитоценозов, а также наличие заброшенных, не контролируемых человеком, полей (1).

Для сдерживания распространения видов рода Solidago предлагаются и используются различные методы борьбы с сорняками, в частности, использование гербицидов или регулярное выкашивание. Однако, эти меры оказываются дорогими, сложными и зачастую кратковременными решениями. Применение пестицидов, к тому же, оказывает негативное воздействие на окружающую среду. В связи с этим, обращает на себя внимание биологический метод, предусматривающий использование насекомых–фитофагов, – естественных врагов сорных растений. Показано, что инвазионный успех вида растений может быть связан, в том числе, и с отсутствием в пределах его вторичного ареала фитофагов и патогенных организмов, характерных для вида в местах естественного произрастания (3).

Для разработки эффективных биологических методов борьбы с инвазионными растениями необходимо изучение их биологии и экологии, в том числе их взаимодействия с местными видами насекомых-фитофагов. Золотарники различных видов начали проявлять инвазионную активность ещё в середине XIX в., однако целенаправленное изучение связанной с ними в пределах вторичного ареала фауны насекомых до настоящего времени не проводилось. Работ, посвящённых этому вопросу, недостаточно, они охватывают только отдельные страны или группы насекомых.

Наше исследование осуществлялось в 2017–2019 гг. в двух точках Средней России – г. Тверь (Тверская обл.) и окрестностях г. Клин (Московская обл.) с целью выявления потенциальных насекомых – фитофагов, способных кормиться на инвазионных золотарниках. За время исследования обнаружено 49 видов таких насекомых, из них 23 вида жесткокрылых и 26 видов клопов.

Основываясь на результатах проведённого нами эксперимента по кормлению на побегах S. gigantean отловленных насекомых, а также на данных литературы, мы составили список из 25 видов насекомых-фитофагов, кормящихся (в условиях эксперимента) и потенциально способных кормиться на S. gigantea в Средней России, включая 4 вида жесткокрылых и 21 – клопов (2).

Из изученных местообитаний потенциальных насекомых-фитофагов наибольшим разнообразием видов характеризуется луг. Однако все насекомые найдены в малых количествах, что приводит к выводу о достаточно случайном характере встречи видов и об отсутствии среди них тесно связанных с S. gigantea. Это говорит о незначительном давлении насекомых-фитофагов на инвазионный золотарник в пределах вторичного ареала в исследованных районах Средней России в настоящее время.

ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградова Ю.К., Майоров С.Р., Хорун Л.В. 2009. Черная книга флоры Средней России (Чужеродные виды растений в экосистемах Средней России). М.: ГЕОС. 494 с.

2. Шмелев В.М., Панкрушина А.Н. 2019. Видовой состав насекомых, питающихся на инвазионном виде Solidago gigantea (Asteraceae) в двух регионах средней россии // Вестник Тверского государственного университета. Серия: Биология и экология. № 2(54). С. 79–86.

3. Keane R.M., Crawley M.J. 2002. Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis // Trends Ecol. Evol. V. 17. P. 164–170.

УДК 328

ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОПРОВОДЯЩИХ МАТЕРИАЛОВ НА СКОРОСТЬ ОБРАЗОВАНИЯ БИОГАЗА И НА СОСТАВ МЕТАНОГЕННОГО МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА В ТЕРМОФИЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

Ю.И. Русскова, Ю.В. Литти, Н.А Чернова, А.Н. Ножевникова

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии, РАН, Москва, Россия

В настоящее время активно изучается недавно открытый процесс межвидового переноса электронов между микроорганизмами. Прямой межвидовой перенос электронов (англ. «Direct Interspecies Electrons Transfer, DIET»), при котором в анаэробном сообществе, включающем синтрофные бактериии и метаногенные археи, электроны переносятся напрямую между клетками этих микроорганизмов без участия переносчиков. При этом существенно увеличивается скорость образования метана из органических субстратов. Открытие DIET в 2010 году положило начало новой научной области – электромикробиологии, изучающей перенос электронов между микроорганизмами в анаэробных условиях (Sasaki et al., 2010; Lovley et al., 2017). Процесс DIET наблюдается при близком контакте клеток микроорганизмов, образующих агрегаты / гранулы, и через электропроводящие клеточные выросты – пили (нанопровода). Было замечено, что отсутствие таких пилей у микроорганизмов может быть компенсировано внесением электропроводящих (кондуктивных) материалов (Rotaru et al., 2012; Liu et al., 2015; Barua, Dhar, 2017). Летучие жирные кислоты (ЛЖК) и спирты, являются основными промежуточными продуктами деградации органических веществ, при анаэробной переработке органических отходов (Ножевникова с соавт., 2016). На последующей ацетогенной стадии происходит разложение ЛЖК синтрофными бактериями с образованием ацетата, водорода и углекислого газа, однако, в случае избыточного накопления ЛЖК может происходить ингибирование образования метана – конечного продукта анаэробной биодеградации. Перспектива эффективного разложения ЛЖК в анаэробных термофильных условиях путем стимулирования процесса DIET кондуктивными материалами для ускорения процесса метаногенеза привлекает внимание биотехнологов и уже находит практическое применение в анаэробных биореакторах за рубежом (Martins et al., 2018).

Лабораторные исследования были направлены на изучение влияния кондуктивных материалов (магнетит (Fe3O4) и уголь (карбоновая ткань и гранулированный)) в концентрациях от 1 до 10 г./л на динамику разложения смеси летучих жирных кислот (ЛЖК), вносимых в среду в концентрациях 20–60 мМоль, в виде солей натрия: ацетата, пропионата и бутирата. В качестве инокулята использовали анаэробный ил Люберецких очистных сооружений. Эксперименты проводили при периодическом культивировании (в стеклянных флаконах объемом 120 мл) в термофильных условиях при 55° С, аналогичных существующим в промышленных метантенках России. Образование H_2, CH_4 и CO_2 в газовой фазе и также концентрацию ЛЖК измеряли на газово-жидкостном хроматографе Хроматэк – Кристалл 5000.2 (Россия). Был проведен анализ состава метаногенного сообщества микроорганизмов молекулярно-генетическими методами анализа 16SРНК в посевном контрольном образце ила Люберецких очистных сооружений и при культивировании в присутствии кондуктивных материалов: магнетита и угольной ткани.

При внесении в среду магнетита получены данные о снижении лаг-фазы на 30 % и двукратном ускорении метаболизма ЛЖК, при этом наблюдалось увеличении доли метана до 77 % в биогазе. Показана линейная зависимость скорости метаболизма ЛЖК от концентрации внесенного магнетита. Самый высокий выход метана на 50 % выше, чем в контроле наблюдался в варианте со средней (4,6 г/л) концентрацией магнетита. Кондуктивные материалы на основе угля были менее эффективны, чем магнетит, и, соответственно, обеспечивали незначительное увеличение на 8–20 % скорости разложения ЛЖК в присутствии активированного угля и угольной ткани (5г/л по содержанию угля) соответственно. Около 20 – 43 % метана образуются в результате разложения пропионата и бутирата синтрофными бактериями и метаногенными археями (Stams et al., 2012), следовательно, эффективная биодеградация этих ЛЖК может служить показателем сбалансированной работы анаэробного биореактора.

Наблюдаемая в экспериментах последовательность разложения смеси ЛЖК в термофильных анаэробных условиях: ацетат, бутират, пропионат – согласуется с литературными данными, согласно которым накопление трудно разлагаемого пропионата в анаэробных биореакторах является показателем нестабильности процесса. Для ускорения разложения пропионата может быть рекомендовано применение кондуктивных материалов: магнетита или угольной ткани.

Состав термофильного микробного сообщества на основании анализа 16SРНК был представлен метаногенными археями и бактериями, и при росте на ЛЖК в присутствии кондуктивных материалов произошли некоторые изменения сообщества микроорганизмов (Табл. 1).

Таблица 1 – Состав микробного сообщества (относительное количество, %) при анаэробном разложении ЛЖК (55° С) по данным молекулярного анализа последовательностей гена 16S рРНК

Домен, Род	Контроль	С магнетитом	С угольной тканью
Археи			
Methanothermobacter	27	27	50
Бактерии			
Coprothermobacter	17	10	7
Defluviitoga	10	-	2
Hydrothermae	7	8	6
Pelotomaculum	5	5	1
Clostridia (Clostridia DTU014)	5	6	3
Tepidanaerobacter	3	7	7
Aminicenantales	2	-	1
Hydrogenospora	2	6	0,7
Ruminiclostridium	2	1	2
Acetivibrio	–	3	–
Другие виды	20	27	20,3

При внесении угольной ткани в метаногенном консорциуме микроорганизмов наблюдалось увеличение доли архей с 27 % (контроль) до 50 %. В сообществе с внесенным магнетитом доля архей осталась неизменной, однако, наблюдалась более разнообразная структура бактериального компонента сообщества. Во всех образцах (контроль, с магнетитом, с угольной тканью) археи представлены родом *Methanothermobacter*, соответственно, в анализируемом термофильном метаногенном сообществе образование метана шло по гидрогенотрофному пути. Основными бактериальными представителями метаногенного консорциума анаэробного ила являлись микроорганизмы родов *Coprothermobacter, Defluviitoga* и *Hydrothermae*. Количество синтрофных бактерий рода *Tepidanaerobacter*, увеличилось в более чем два раза по сравнению с контролем, следовательно, эти бактерии могут играть роль в ускорении синтрофного разложения ЛЖК как в присутствии магнетита, так и угольной ткани. При применении магнетита в метаногенном консорциуме появились представители родов *Hydrogenospora* и *Acetivibrio*, которые не наблюдаются в контроле и в образцах с внесенной угольной тканью.

Магнетит имеет преимущество по сравнению с материалами на основе угля для ускорения процессов анаэробного разложения ЛЖК в термофильных условиях, стимулируя образование биогаза с повышенной долей метана, образуемого гидрогенотрофными археями. В присутствии кондуктивных материалов сформировалось более разнообразное термофильное бактериальное сообщество с основными представителями *Coprothermobacter, Hydrothermae* и синтрофными бактериями рода *Tepidanaerobacter*. Сделано предположение, что ускорение процесса метаногенеза и увеличение выхода метана связано с электропроводящими свойствами магнетита, влияющими на стимулирование процесса DIET у представителей родов *Acetivibrio, Hydrogenospora, Tepidanaerobacter*. Несомненна актуальность данного исследования, направленного на изучение стимулирующего влияния кондуктивных материалов на синтрофное разложение органических веществ термофильным анаэробным консорциумом микроорганизмов за счет стимулирования процесса DIET и улучшения состава продуцируемого в процессе метаногенеза биогаза с повышенным содержанием метана.

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18–38–00275.

ЛИТЕРАТУРА

Ножевникова А.Н., Каллистова А.Ю., Литти Ю.В., Кевбрина М.В. Биотехнология и микробиология анаэробной переработки органических коммунальных отходов // Под ред. А.Н. Ножевниковой. Москва: Университетская книга. 2016. 320 с.

Barua S., Dhar B.R. Advances towards understanding and engineering direct interspecies electron transfer in anaerobic digestion // Bioresource Technology. 2017. V. 244. P. 698–707.

Liu F., Rotaru A.E., Shrestha P.M., Malvankar N.S., Nevin K.P., Lovley D.R. Magnetite Compensates for the Lack of a Pilin-Associated c-Type Cytochrome in Extracellular Electron Exchange // Environ. Microbiol. 2015. V. 17 (3). P. 648–655.

Lovley D.R. Syntrophy Goes Electric: Direct Interspecies Electron Transfer // Annu. Rev. Microbiol. 2017b. V. 71. P. 643–664.

Martins G., Salvador A.F., Pereira L., Alves M. Methane Production and Conductive Materials: A Critical Review // Environ. Sci. Technol. 2018. V 52. P. 10241–10253.

Rotaru A-E., Shrestha P.M., Liu F., Markovaite B., Chen S., Nevin K.P., Lovley D.R. Direct Interspecies Electron Transfer between Geobacter metallireducens and Methanosarcina barkeri // Appl. Environ. Microbiol. 2014a. V.80. № 15. P. 4599–4605.

Sasaki K., Morita M., Hirano S., Sasaki D., Ohmura N., Igarashi Y. Efficient degradation of rice straw in the reactors packed by carbon fiber textiles // Appl Microbiol Biotechnol. 2010. V. 87. P. 1579–1586.

Stams A.J.M., Sousa D.Z., Kleerebezem R., Plugge C.M. Role of syntrophic microbial communities in high-rate methanogenic bioreactors // Water Science and Technology. 2012. V. 66. № 2. P.352–362.

УДК 620.95; 57.022

ТВЕРДОФАЗНАЯ АНАЭРОБНАЯ ПЕРЕРАБОТКА ОРГАНИЧЕСКОЙ ФРАКЦИИ ТВЕРДЫХ БЫТОВЫХ ОТХОДОВ, ПРЕДОБРАБОТАННЫХ В АППАРАТЕ ВИХРЕВОГО СЛОЯ ФЕРРОМАГНИТНЫХ ЧАСТИЦ

Э.Р. Михеева[1], И.В. Катраева[2]

[1] Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия
[2] Нижегородский государственный архитектурно-строительный университет, Нижний Новгород, Россия

Органическая фракция твердых бытовых отходов (ОФ-ТБО) содержит высокую концентрацию биоразлагаемых органических соединений и поэтому является преобладающим возобновляемым ресурсом в общей массе твердых бытовых отходов [1–2]. Благодаря эффективному уменьшению воздействия на окружающую среду, процесс анаэробной переработки выгодно отличается от альтернативных методов утилизации отходов, таких как сжигание, захоронение на полигонах и компостирование [3–5]. Анаэробное сбраживание органических отходов представляет собой комплекс-процесс, включающий гидролиз, ферментативный ацидогенез, ацетогенез и метаногенез. Для оценки пригодности субстратов к анаэробному сбраживанию в мировой практике широко используется тест – «биохимический метановый потенциал». Суть биохимического метанового потенциала сводится к смешиванию образца с микробиологической культурой (инокулят) в определенных условиях, выдерживанию и периодическому измерению объема образующегося биогаза. Наиболее оптимальной для протекания процессов метаногенеза является температура 41^0 С, а выход метана не изменяется при повышении температуры до $48–55^0$ С [6]. Традиционно считается, что анаэробное сбраживание протекает в условиях высокой влажности (содержание сухих веществ в реакторе не более 10 %) и используется чаще всего для переработки жидких отходов, таких как сточные воды, животноводческие стоки и стоки скотобойни. Перспективным для переработки сухих и полусухих отходов, в частности пищевых отходов и органической фракции ТКО, является твердофазная анаэробная ферментация. По сравнению с жидкофазной анаэробной ферментацией, твердофазная имеет ряд преимуществ: для протекания процессов требуется реактор меньшего объема; позволяет увеличить количество отхода, перерабатываемого за один цикл; получаемый биопродукт имеет меньшую влажность, что облегчает его дальнейшую переработку (не требуется обезвоживание), образуется больше биогаза и метана [7].

Отличительной особенностью аппаратов вихревого слоя (АВС) от других способов предобработки отходов является низкая энергоемкость. Принцип функционирования АВС достаточно прост. Измельчение осуществляется ферромагнитыми рабочими телами цилиндрической формы, помещенными в трубу из немагнитного материала, в котором создается вращающееся магнитное поле. Из-за высокой скорости вращения (3600 об/мин) этого поля начинают быстро двигаться и соударяться рабочие тела, под которые попадают частицы обрабатываемого материала. Наряду с ударными воздействиями на измельченные частицы, в АВС действует также и кавитация, поскольку в жидкой среде при быстром движении твердых тел возникают воздушные пузырьки, способные схлопываться. Совокупность этих двух факторов приводит к тому, что интенсивность измельчения в АВС выше. Кроме того в процессе АВС обработки происходит нагревание образца, что с одной стороны способствует его обеззараживанию, с другой, позволяет его подогреть, снижая тем самым температурный шок инокулята при поступлении в анаэробный реактор.

Целью работы было оценить биохимический метановый потенциал образца ОФ-ТБО до и после 1-ой и 2-х минут обработки в АВС.

Для оценки биохимического метанового потенциала образца ОФ-ТБО использовали в качестве инокулята осадок сточных вод, отобранный на Нижегородской станции аэрации и сброженный в метантенке (pH 7,47; СВ 2,11 ± 0,14 %; оСВ 51,75 ± 0,09 %), а также осадок, сброженный в метантенке и обезвоженный на ленточном фильтр-прессе (СВ 20,70 ± 0,53 % и оСВ 48,32 ± 0,28 %), смешанные в соотношении 1:1.

В представленной работе в качестве образца ОФ-ТБО использовали модельный субстрат, имеющий состав, характерный для пищевых отходов крупных городов России (Таблица 1). Предварительно модельный образец ОФ-ТБО был измельчен вручную (нож, ножницы) и гомогенизирован с помощью ручного перемешивания.

Таблица 1 Усредненный состав пищевых отходов в крупных городах России, %

Состав	Сезон года	
	Лето-осень	Зима-весна
Картофель и его очистки	25–38	38–50
Другие овощи	25–38	9–15
Фрукты	20–25	18–24
Мясо и мясные продукты	3–5	3–5
Мясные кости	3–4	3–4
Рыба и рыбные кости	2–3	2–3
Хлеб и хлебопродукты	2	2
Молочные продукты	0,5	0,5
Яичная скорлупа	0,5	0,5
Непищевые примеси, упаковка	5–8	5–15

Предобработку образца ОФ-ТБО проводили в аппарате вихревого слоя (изготовитель ООО «Регионметтранс», г. Нижний Новгород), который работал в периодическом режиме в течение 1 и 2 минут. Для этого в рабочий стакан из немагнитной стали объемом 500 мл помещали ферромагнитные тела (стержни размером 3,5 х 35 мм, 98 шт.) и 150÷180 г. исследуемого образца ОФ-ТБО, затем герметично закрывали стакан завинчивающейся крышкой, вставляли его в рабочую камеру АВС и осуществляли обработку образцов в течение заданного времени (1 минуту или 2 минуты) при U = 180 В, I = 52 А, f = 65 Гц.

Для изучения биохимического потенциала в стеклянные флаконы загружали 80 масс.% инокулята и 20 масс.% образца ОФ-ТБО исходного (образец 1) и обработанного в АВС 1 минуту (образец 2) и 2 минуты (образец 3). Исходные характеристики сбраживаемых образцов были следующие: содержание сухих веществ 23 %, 23,9 %, 26,01 %, зольность образцов 26,85 %, 24,25 %, 22,03 % соответственно для образца 1, образца 2 и образца 3. Анаэробное сбраживание проводили в термофильном режиме (55 ± 1) ° С.

На 9 сутки твердофазного анаэробного сбраживания образца ОФ-ТБО начал выделяться биогаз: в образце 1 – 3 мл, в образце 2 – 8 мл, в образце 3 – 10 мл. Динамика выделения биогаза представлена на рисунке 1. Из графика видно, что образование биогаза для необработанного образца ОФ-ТБО происходит интенсивнее, чем для обработанных в АВС.

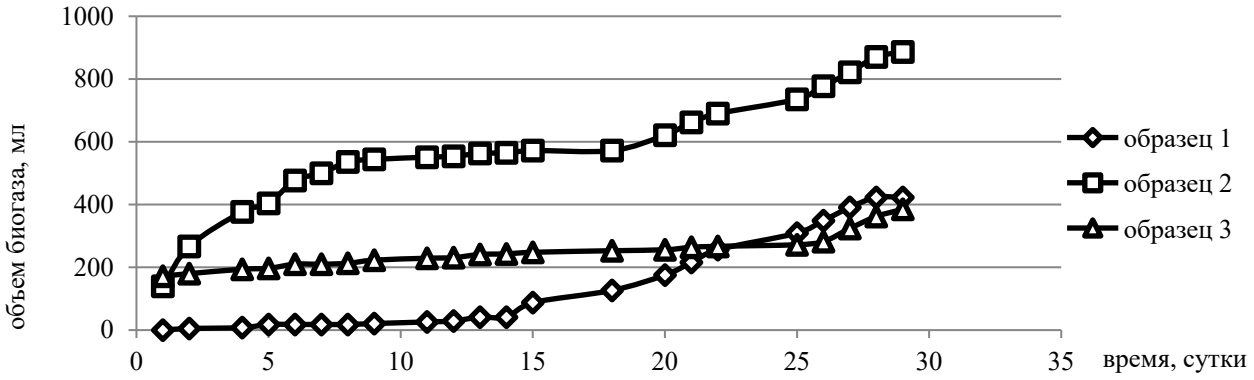


Рисунок 1 – Зависимость суммарного объема выделившегося биогаза от времени нахождения систем в анаэробных условиях: образец 1 – контроль, образец 2 – образец ОФ-ТБО, обработанный в АВС 1 минуту, образец 3 – образец ОФ-ТБО, обработанный в АВС 2 минуты

После остановки эксперимента на 29 сутки измерили pH водной вытяжки (1:5): для образца 2 pH 5,8 ± 0,01 и образца 3 pH 5,66 ± 0,01, тогда как в образце 1 с необработанным образцом ОФ-ТБО pH 6,73 ± 0,01. В результате предобработки наблюдали сильное закисление, которое негативно повлияло на метаногенез. Традиционно считается, что для метаногенеза оптимальным является значение pH 6,8–7,4 [8] Содержание сухих веществ в образце 1 уменьшилось и составило 10,56 ± 0,16 %, в образце 2 – 11,80 ± 0,12 %, в образце 3 – 21,72 ± 1,76 %. Содержание зольности увеличилось в образце 1 на 30 %, тогда как для образцов 2 и образца 3 – на 15 и 5 %. Общее количество биогаза, образовавшегося в результате анаэробного сбраживания составило для образца 1 – 423 мл, для образца 2 – 886 мл и для образца 3 – 385 мл. Forster-Carneir и соавт. (2008) показали, что производство биогаза уменьшалось с увеличением содержания сухих веществ в пищевых отходах от 20 до 30 % при анаэробном сбраживании [7]. Аналогично в работе Amel Abbassi-Guendouz и соавт. было выявлено снижение общего количества биогаза при увеличении содержания сухих веществ от 10 до 25 % в мезофильных условиях [9]. Однако в работе Jing Yi и соавт. (2014) при термофильном анаэробном сбраживании пищевых отходов показано, что чем выше содержание сухих веществ, тем выше объем и скорость образования биогаза [8].

Для эффективного протекания твердофазного процесса анаэробного сбраживания важно соотношение количества инокулята и образца. Так, Sans C. и соавт. рекомендовали вносить не менее 30 % инокулята в сбраживаемую смесь [10], а J-C. Motte и соавт. [11] также утверждают, что в промышленных целях важно соотношение содержания сухих органических веществ в инокуляте (X) к содержанию сухих органических веществ в сбраживаемой смеси (S), которое обычно составляет S / X = 0,3÷0,5. По их мнению, в лабораторном масштабе это соотношение выше и составляет 2÷6. Однако в литературе встречаются успешно проведенные эксперименты, когда соотношение S/X больше 6 [12], однако при этом наблюдали увеличение фазы адаптации системы (более 30 дней) и продолжительность эксперимента (более 250 дней), чтобы успешно прошел процесс анаэробного сбраживания. В нашем эксперименте соотношение S/X составило около 1,9 для необработанного образца ОФ-ТБО и оно меньше, чем предложено J-C. Motte и соавт. [11] для лабораторных целей. Однако следует учесть, что значение соотношения S/X, предложенное J-C. Motte, применимо для жидкофазной анаэробной ферментации. Согласно полученным Никитиной А.А. [13] результатам, для запуска процесса анаэробного сбраживания осадка сточных вод со сниженной влажностью (92–93 %) во флаконах или лабораторных малоемких биореакторах необходимо, чтобы содержание инокулята в смеси составляло не менее 55 % в расчете на суммарное содержание органических веществ смеси.

Таким образом, наибольший суммарный выход биогаза и биохимический метановый потенциал наблюдали в образце ОФ-ТБО, обработанном в течение 1 минуты в АВС. Наблюдаемое быстрое закисление сбраживаемой массы возможно связано с перегрузкой по органическому веществу процесса твердофазного анаэробного сбраживания образца ОФ-ТБО (S / X = 1,9). К тому же учитывая тот факт, что при термофильном режиме анаэробного сбраживания процессы окисления протекают быстро и интенсивно, следует учитывать соотношение S/X и строго его контролировать при анаэробном сбраживании ОФ-ТБО.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18–38–00275.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gunaseelan V.N. Biochemical methane potential of fruits and vegetable solid waste feedstocks. // Biomass Bioenergy. 2004. V. 26(4). pp. 389–399.

2. Wang H T, Nie Y F. Municipal solid waste characteristics and management in China // J Air & Waste Manage Assoc. 2001. V.51. pp. 251–272.

3. Foresti E. Perspective on anaerobic treatment in developing countries // Water Sci Tcchnol. 2001. V. 44. pp. 141–148.

4. McCarty P L. The development of anaerobic treatment and its future // Water Sci Technol. 2001. V.44. pp. 149–156.

5. van Lier J B., A. Ahring, B. Kera New perspectives in anaerobic digestion // Water Sci Technol. 2001. V. 43. pp. 1–18.

6. Экологическая биотехнология: Пер.с англ. / Под. Ред. К.Ф. Форстера, Д.А.Дж. Вейда. Л.: Химия. 1990, 384 с.

7. T. Forster-Carneiro, M. Pérez, L.I. Romero Influence of total solid and inoculums contents on performance of anaerobic reactors treating food waste // Bioresource Technology. 2008 Pages 6994–7002.

8. J. Yi, B. Dong, J. Jin, X. Dai Effect of Increasing Total Solids Contents on Anaerobic Digestion of Food Waste under Mesophilic Conditions: Performance and Microbial Characteristics Analysis // PLoS One. 2014. V. 9(7): e102548. 2014. doi.org / 10.1371/journal.pone.0102548.

9. A. Abbassi-Guendouz, D. Brockmann, E. Trably, C. Dumas, J. P. Delgenès, J. P. Steyer, R. Escudié Total solids content drives high solid anaerobic digestion via mass transfer limitation // Bioresource Technology. 2012. V. 111. pp. 55–61.

10. Sans, C., Mata-Alvarez, J., Cecchi, F., Pavan, P., Bassetti, A. Acidogenic fermentation of organic urban wastes in a plug-flow reactor under thermophilic conductions. // Biores. Technol. 1995. V.54. pp. 105–110.

11. Motte, J. C., Escudié, R., Bernet, N., Delgenes, J. P., Steyer, J. P., & Dumas, C. Dynamic effect of total solid content, low substrate/inoculum ratio and particle size on solid-state anaerobic digestion. // Bioresource Technology. 2013. V.144. pp. 141–148.doi : 10.1016/j.biortech.2013.06.057.

12. Abbassi-Guendouz, A., Brockmann, D., Trably, E., Dumas, C., Delgenès, J. P., Steyer, J. P., Escudié, R. Total solids content drives high solid anaerobic digestion via mass transfer limitation. // Bioresour. Technol. 2012. V.111. pp. 55–61.

13. Никитина Анна Александровна Биотехнологические и микробиологические аспекты термофильной анаэробной переработки коммунальных органических отходов при высокой нагрузке по субстрату. // Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. 2019. Москва. 24 с.

УДК 328

ВИДОВОЙ СОСТАВ ДРЕВО-КУСТАРНИКОВЫХ НАСАЖДЕНИЙ НА ТЕРРИТОРИЯХ ОБЩЕОБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ УЧРЕЖДЕНИЙ Г. РОСТОВА-НА-ДОНУ

Т.В. Денисова, Ю.В. Дзигунова, В.В. Лагутина

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

Основным материалом для зеленого строительства являются деревья и кустарники. Видовой состав, или ассортимент, древесных и кустарниковых растений определяет архитектурные качества насаждений, их санитарно-гигиенические свойства, долговечность и эффективность применения на различных объектах озеленения.

При установлении перечня растений для конкретного объекта необходимо, чтобы он отвечал многим критериям, в том числе целевому назначению и архитектурному решению.

На сегодняшний день отсутствует официальный перечень растений, согласно экологическим требованиям к конкретному региону для озеленения пришкольных участков. Это создает некоторые трудности при подборе видов растений для озеленения общеобразовательных учреждений.

Градостроительный кодекс Российской Федерации в пункте 36 статьи 1 указывает лишь на необходимость обеспечения сбалансированного учета экологических, экономических, социальных и иных факторов при осуществлении градостроительной деятельности. Согласно пункту 3.5. СанПиН 2.4.2.2821–10, при проектировании и строительстве общеобразовательных организаций на территории необходимо предусмотреть зону отдыха для организации подвижных игр и отдыха обучающихся, посещающих группы продленного дня, а также для реализации образовательных программ, предусматривающих проведение мероприятий на свежем воздухе. Очевидно, что законодательством Российской Федерации предполагается наличие достаточного количества зеленых насаждений на территории общеобразовательных школ.

На пришкольных территориях у растений особое значение, они должны обеспечивать весь комплекс своих возможностей:

– очищать и увлажнять воздух;
– создавать защиту от ветра;
– являться пылеуловителями;
– обеспечивать шумозащиту;
– снижать солнечную радиацию, отражая световую энергию;
– ионизировать воздух;
– проявлять фитонцидную функцию;
– благоприятно воздействовать на нервно-психическое состояние человека;
– являться объектами обучающего процесса.

В ходе проведенного исследования был изучен опыт озеленения пришкольных территорий 9-ти школ Кировского района г. Ростова-на-Дону – одного из старейших районов города, находящегося в центре города. В этом районе расположены главные административные органы управления Южного федерального округа, области, города, крупнейшие финансовые и торговые компании, а также культурные и образовательные учреждения. Общеобразовательные школы этого района находятся в различной степени удаленности от дорог, промышленных объектов, офисных и жилых зданий и сооружений, создающих особый микроклимат.

Город Ростов-на-Дону расположен в пределах континентальной Европейской области умеренного климатического пояса. Однако климат в городе зависит не только от общих физико-географических условий, но и от размера городской площади, планировки и густоты застройки, высоты зданий, расположения промышленных объектов. Искусственные покрытия, применяемые в городской среде, здания, имеющие большую поглощающую поверхность, нагреваются быстрей, чем почва за городом, и создают особый микроклимат, отличный от естественного.

В ходе наблюдений была проанализирована степень озеленения школ, ассортимент деревьев и кустарников, использующихся при озеленении пришкольных территорий всех общеобразовательных учреждений Кировского района г. Ростова-на-Дону.

На территориях пришкольных участков школ высажено различное количество деревьев, кустарников, различающихся по видовому составу, возрасту. Необходимо отметить, что у всех 9-ти школ разная общая площадь территорий, зданий и пришкольных участков.

Было установлено, что большинство прилегающих территорий общеобразовательных учреждений имеет стандартное зонирование, поэтому устройство зелёных насаждений и уход за ними является достаточно длительным и сложным процессом.

Анализ видового состава древесных и кустарниковых растений, используемых для озеленения территорий общеобразовательных учреждений (школ) в Кировском районе г. Ростове-на-Дону показал, что в среднем, приходится 16 деревьев на одно общеобразовательное учреждение. При этом, наиболее часто встречающийся вид деревьев, которым озеленены школы – тополь пирамидальный и ясень обыкновенный, кустарник – бирючина обыкновенная, туя западная. Наиболее озеленены школы № 80 и № 53. Практически не озеленены школа № 49 и гимназия № 45. В меньшем количестве встречались такие виды деревьев как ель обыкновенная, береза повислая, сосна обыкновенная, клен обыкновенный, вяз гладкий, туя западная, робиния обыкнове́нная, кустарник – сире́нь обыкнове́нная. В целом, школы Кировского района города Ростова-на-Дону имеют недостаточное озеленение, малый видовой состав.

Мы рекомендуем использовать и другие виды деревьев и кустарников, такие как Можжевельник виргинский, Можжевельник скальный, Ель колючая, Сосна крымская, Клен остролистный, Конский каштано быкновенный, Ольха серая, Тополь белый, серебристый, Тополь дельтовидный, канадский, Дуб северный, Робиния лжеакация, белаяакация, Ива белая, Липа кавказская, Вяз граболистный, берест, карагач; кустарники: Кизильник многоцветковый, Гибискус сирийский Робиния новомексиканская, Ива сердцевидная, Рябинник алтайский, Спирея Вангутта, Тамарикс (гребенщик) четырехтычинковый, Калина обыкновенная, Калина Саржента, Калина трехлопастная, Ксант оцерасрябинолистный, чекалкин орех.

ЛИТЕРАТУРА

Градостроительный кодекс Российской Федерации" от 29.12.2004 № 190-ФЗ в ред. от 25.12.2018.

Ильченко И.А. Влияние основных экологических факторов городской экосистемы на здоровье горожан // Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. 2008. № 5.

Ильченко И.А. Система зеленых насаждений города как средообразующий фактор городского микроклимата // Вестник Таганрогского института управления и экономики. 2014. № 1. С. 37–42.

Козловский Б.Л., Огородникова Т.К., КуропятниковМ.В., ФедориноваО.И.: Ассортимент древесных растений для зеленого строительства в Ростовской области: монография – Ростов н/ Д : Изд-во ЮФУ, 2009. – 416 с.

Лагутина В.В., Денисова Т.В., Дзигунова Ю.В. Мониторинг озеленения территорий общеобразовательных учреждений Кировского района г. Ростова-на-Дону // XV Ежегодная научная конференция молодых ученых «Вклад молодых ученых Южного макрорегиона в реализацию Стратегии развития Российской Федерации: цели, задачи, результаты». 2019. С. 25.

Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 29.12.2010 № 189 в ред. от 24.11.2015 "Об утверждении СанПиН 2.4.2.2821–10 "Санитарно-эпидемиологические требования к условиям и организации обучения в общеобразовательных учреждениях".

Чумичева Р.М., Лагутина В.В. Вызовы экосистемы и экологическое образование дошкольников и младших школьников // Известия Южного федерального университета. Педагогические науки, № 12. 2017. С. 67–74.

УДК 504.064.47

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОНСОРЦИУМА НЕСПОРООБРАЗУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ РЕМЕДИАЦИИ ПОЧВ, ЗАГРЯЗНЁННЫХ ПОЛИАРОМАТИЧЕСКИМИ УГЛЕВОДОРОДАМИ

А.С. Нартов[1], А.И. Сидякин[2,3], Э.О. Байрамалиева[2]

[1] НИЦ «Курчатовский институт – ИРЕА, Москва, Россия
[2] ООО «НПО Биотехсоюз, Москва, Россия
[3] Таврическая академия Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского, Симферополь, Россия

Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) относятся к числу стойких органических загрязнителей, которые в большом количестве образуются в техногенных процессах. Главным источником их поступления в окружающую среду является автомобильный транспорт. Также значительный вклад в эмиссию этих соединений вносят выбросы промышленных предприятий. К их числу прежде всего относятся теплоэнергетические станции, работающие на угле и нефтепродуктах, мусоросжигательные заводы, предприятия, использующие в производстве нефтепродукты и др. [1].

В силу своих физико-химических свойств полиароматические углеводороды склонны к накоплению в почвах. Из вышесказанного очевидно, что наиболее заметно процесс их аккумуляции наблюдается на промышленно-урбанизированных территориях с высокой антропогенной и техногенной нагрузкой. При этом такие территории, как правило, характеризуются высокой плотностью населения. Таким образом, ПАУ, оказывающие канцерогенное, мутагенное и тератогенное воздействие на живые организмы, представляют серьёзную угрозу для здоровья городского населения. Особенно выражен этот эффект у наиболее токсичного из них – бенз(а)пирена – углеводорода, состоящего из пяти конденсированных ароматических колец. Другие соединения из числа ПАУ менее токсичны, но при совместном воздействии на организм проявляют эффект синергизма [2]. Очевидно, что задача снижения концентрации данных экотоксикантов в окружающей среде крайне актуальна.

Однако, среди физико-химических воздействий, приводящих к разрушению структуры полиароматических углеводородов, на сегодняшний день известны лишь те, что подразумевают жёсткое воздействие (УФ-облучение, окисление токсичными или едкими окислителями). Но такие способы непригодны для ремедиации почв, поскольку в результате их применения вместе с содержащимися в ней загрязнителями разрушится и естественная микрофлора. Таким образом, наиболее перспективной группой методов очистки техногенно-загрязнённых земель на сегодняшний день является их микробиологическая обработка [3].

К настоящему времени известны микроорганизмы, способные разлагать самые разнообразные поллютанты, в том числе ароматические нефтепродукты, используя содержащийся в их составе углерод в своем метаболизме [4 и др.].

ООО «НПО Биотехсоюз» на основе консорциума неспорообразующих микроорганизмов родов Candida, Pseudomonas, Rhodococcus, выделенных из техногенно-загрязненных почв, разработан комплексный биопрепарат, предназначенный для деструкции нефтепродуктов. В связи с вышесказанным целью работы является изучение возможности использования такого препарата для очистки почв от ПАУ.

Исследование проводилось на образцах почвы, отобранных по четырём направлениям в радиусе 5 км от НПО «Луч» (г. Подольск, Московская область) и мусоросжигательного завода № 3 (г. Москва) – всего 64 образца. Методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии было изучено изменение концентрации двенадцати ПАУ в исходных образцах почвы и в образцах, подвергшихся воздействию 1 %-ного раствора препарата в течение 100 часов.

В результате проведения исследований установлено, что происходит снижение концентраций всех полиароматических углеводородов в 1,5 – 2,4 раза (в зависимости от структуры и молекулярной массы). При этом были выявлены следующие особенности:

1. Во всех образцах почвы наблюдалось снижение суммарной концентрации полиароматических углеводородов в 1,7 – 2,2 раза.

2. В большинстве случаев по прошествии 100 часов значения концентраций одного и того же компонента в различных образцах становились близкими, практически независимо от исходного уровня загрязнения. То есть, в почвах, загрязнённых сильнее, процесс переработки ПАУ проходил интенсивнее.

3. Степень снижения концентрации различных полиароматических углеводородов хорошо коррелирует с их строением: а.) Максимальное снижение наблюдалось для четырёхчленных ПАУ и примерно на 30–50 % меньшее – для 3- и 5-членных.

б.) Возможность переработки ПАУ разработанным препаратом, вероятно, также зависит от способа расположения ароматических колец в молекуле. Так, хризен, имеющий ангулярное строение, подвергался переработке в среднем на 10 % лучше, чем пирен, также имеющий 4 ароматических кольца в структуре, но расположенных кластером. То же можно сказать и про большинство 5-членных ПАУ. Наименее интенсивно подвергался переработке бенз(а)пирен, имеющий кластерное строение. Примерно на 20 % лучше перерабатывались бензофлуорантены и перилен, у которых линейные или ангулярные ароматические фрагменты разделены неароматическим кольцом. Исключение составил лишь бенз(е)пирен, который имеет кластерное строение, но снижение концентрации которого в среднем оказалось сопоставимо с этим показателем для 4-хчленных ПАУ. Ангулярные и линейные структуры перерабатываются микроорганизмами препарата примерно в равной степени. В частности, содержание фенантрена и антрацена в подавляющем большинстве образцов снижалось на близкие величины, в основном в пределах 35–40 %.

Таким образом, в ходе проведённых исследований было показано, что микробиологический препарат, содержащий консорциум неспорообразующих микроорганизмов указанных родов, может быть использован не только для ликвидации нефтяных загрязнений, но и для улучшения экологического состояния почв промышленно-урбанизированных территорий, в верхнем слое которых адсорбировано значительное количество техногенных полиароматических углеводородов. Определение наиболее оптимальных условий применения препарата является предметом дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Геннадиев А.Н., Пиковский Ю.И., Цибарт А.С., Смирнова М.А. Углеводороды в почвах: происхождение, состав, поведение (обзор) // Почвоведение, 2015, № 10, с. 1195–1209.

2. Staal YC, Hebels DG, van Herwijnen MH, Gottschalk RW, van Schooten FJ, van Delft JH Binary PAH mixtures cause additive or antagonistic effects on gene expression but synergistic effects on DNA adduct formation // Carcinogenesis. 2007 Dec; 28(12) : 2632–40. Epub 2007 Aug 8.

3. Крылов В.А., Мосягин П.В., Крылов А.В., Бочкарёва Л.В., Маткивская Ю.О. Влияние света люминесцентных ламп на стабильность образцов, содержащих полициклические ароматические углеводороды // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского, 2010, № 4 (1), с. 79–85.

4. Плешакова Е.В., Голубев С.Н., Турковская О.В. Биодеградация нефтяных углеводородов штаммом Dietzia maris, её генетические особенности // Известия Саратовского университета, 2007, т. 7, сер. Химия. Биология. Экология, вып. 1.

УДК 628.35

ИНТЕНСИФИКАЦИИ ПРОЦЕССОВ НИТРИФИКАЦИИ В БИОФИЛЬТРАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ БИОАУГМЕНТАЦИИ

Т.В. Вдовина, А.С. Дмитриев, А.А. Хасанова, Н.И. Кириллова, Й.В. Кобелева, А.С. Сироткин

Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, РФ

Одним из распространенных и эффективных методов очистки сточных вод является их биофильтрация, сочетающая процессы механического и физико-химического фильтрования, а также биологического окисления примесей с участием микроорганизмов биопленки, формирующейся на поверхности загрузочного материала. Комплексное удаление органических веществ и аммонийного азота может сопровождаться ингибированием процесса нитрификации подавлением автотрофных нитрифицирующих бактерий гетеротрофными микроорганизмами. При этом нахождение медленно растущих и чувствительных к негативным воздействиям окружающей среды нитрифицирующих бактерий в составе микробных биопленок предоставляет им ряд преимуществ перед суспендированными клетками и обеспечивает их относительно высокую концентрацию в системе водоочистки [1].

В настоящее время актуальным направлением экспериментальных исследований в области биологической очистки сточных вод является формирование высокоэффективного микробиоценоза очистных сооружений, в том числе путем применения технологии биоаугментации [2,3].

Цель работы заключалась в оценке возможности и эффективности биоаугментации нитрифицирующих бактерий в микробиоценоз биопленки биофильтрационной системы для повышения качества очистки сточных вод.

Оценка эффективности биоаугментации нитрифицирующих бактерий в микробиоценоз биопленки осуществлялась в процессе 30-ти суточной непрерывной биофильтрации модельного раствора коммунально-бытовых сточных вод. Эффективность протекания нитрификации после биаугментации нитрификаторов оценивалась также в процессе 60-ти суточной биофильтрации с периодической вынужденной промывкой загрузочного материала.

Лабораторная установка состояла из двух параллельно работающих биофильтров, заполненных керамзитом и оснащенных системой аэрации [4]. В один из биофильтров после пускового периода осуществляли интродукцию нитрифицирующих бактерий. В качестве последних использовали ранее выделенные из активного ила, используемого, в том числе, для первоначальной инокуляции биофильтрационной системы, аммонийокисляющие (АОМ) и нитритокисляющие (НОМ) бактерии [5]. Второй биофильтр выступал в качестве контрольной системы.

Биоаугментация АОМ в микробиоценоз биофильтрационной системы привела к увеличению эффективности удаления аммонийного азота в среднем в 1,6 раза относительно контрольного биофильтра. Последующая биоаугментация в этот биофильтр НОМ обусловила увеличение количества нитратов в очищенной воде в среднем в 2 раза относительно контрольного биофильтра. Выявлено, что биоаугментация нитрифицирующих бактерий в микробиоценоз биопленки приводит к сокращению времени выхода системы биофильтрации на режим достижения нормативных значений очистки по аммонийному азоту в 2,4 раза относительно контроля. Количественная и качественная идентификация микроорганизмов методом флуоресцентной in situ гибридизации [6] выявила увеличение количества нитрифицирующих микроорганизмов в составе биопленки опытного биофильтра, что свидетельствует об эффективности интродукции микроорганизмов и коррелирует с результатами биотрансформации соединений азота.

Результаты оценки эффективности нитрификации после промывки загрузочного материала и интродукции нитрифицирующих бактерий в опытный биофильтр свидетельствуют о повышении эффективности удаления аммонийного азота уже на 4 сутки после промывки на 48 % в сравнении с контрольным биофильтром. В целом, биоаугментация нитрификаторов в биофильтр после промывки загрузочного материала способствует сокращению времени достижений значений стационарного режима, обеспечивающего нормативные значения очистки по аммонийному азоту, в среднем на 10 суток.

Таким образом, биоаугментация нитрифицирующих микроорганизмов в микробиоценоз биопленки является эффективным инструментом для повышения качества очистки сточных вод в процессе длительной непрерывной биофильтрации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сироткин А.С., Кирилина Т.В., Семенова Е.Н., Халилова А.А. Биофильтрация сточных вод. Учебное пособие. Казань: Изд-во КНИТУ, 2014. 172 с.
2. Stenström F., la Cour Jansen J. Impact on nitrifiers of full-scale bioaugmentation // Water science and technology. 2017. Vol.76. № 11. P. 3079–3085.
3. Zhu X., Chen M., He X., Xiao Z., Zhou H., Tan Z. Bioaugmentation treatment of PV wafer manufacturing wastewater by microbial culture // Water science and technology. 2015. Vol.72. № 2. P. 754–761.
4. Кирилина Т.В. Биоконверсия соединений азота и фосфора в процессе биофильтрации сточных вод и их доочистки погруженными макрофитами: дис… канд. техн. наук. Казань, 2011. С. 51–55.
5. Кирилина Т.В., Рахманкулова З.Ш., Сироткин А.С. Оценка способности нитрифицирующих микроорганизмов к образованию биопленок // Вестник технологического университета. 2016. Т.19, В.16. С. 152–154.
6. Nielsen P.H., Daims H., Lemmer H. FISH Handbook for Biological Wastewater Treatment. Identification and quantification of microorganisms in activated sludge and biofilms by FISH. London: IWA Publishing, 2009. 123 p.

УДК 57.049

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ПЕРЕРАБОТКИ ОТХОДОВ

И.Д. Бельский[1], Е.В. Верёвочкина[2], О.В. Ягольницер[1]

Московский государственный технологический университет «СТАНКИН, Москва, Россия
Московский политехнический университет, Москва, Россия

В настоящее время одной из острых проблем является охраны окружающей среды. Из-за деятельности человека (в промышленности, сельском хозяйстве, в быту) происходит изменение химических, физических и биологических свойств окружающей среды, что в свою очередь неблагоприятно сказывается в том числе и на здоровье человека. Без сомнений, биотехнология будет оказывать возрастающее влияние на контроль за окружающей средой и поддержание её в оптимальном виде. Внедрение новых, более совершенных, биотехнологических методов переработки отходов в дальнейшем может сыграть ведущую роль в экологии всей планеты и поможет решить часть проблем переработки отходов промышленности и сельского хозяйства. На сегодняшний день можно отметить быстрое развитие отраслей промышленности, в которых используются различные процессы жизнедеятельности микроорганизмов. Ярким примером является контроль за загрязнением сточных вод.

Биотехнологические методы по переработке отходов можно использовать в следующих отраслях:

– Сельское хозяйство. Применение в животноводстве интенсивных технологий привело к образованию большого количества разнообразных отходов, для использования которых может требоваться большая земельная площадь.

– Химическая промышленность. Использование специфических микроорганизмов для расщепления ксенобиотиков и химических веществ при переработке отходов.

– Нефтяная промышленность. Многократная активизация и ускорение процессов биодеградации углеводородов нефти в воде и почве с помощью микроорганизмов.

На данный момент последствия антропогенной деятельности могут привести к необратимым изменениям в биосфере в целом. Это может привести к тому, что биосфера станет непригодной для обитания. Внедрение биотехнологических методов переработки отходов может заменить часть уже существующих (например, сжигание отходов). С помощью приемов и методов биотехнологии, вторичное сырье и органические отходы можно использовать для приготовления различных белковых добавок, основ питательных сред и производства биологически активных препаратов.

В Российской Федерации накоплено около 7 млрд тонн отходов, из которых 1 млрд. тонн являются опасными отходами. В среднем на каждого жителя Российской Федерации вырабатывается до 15 тонн различных твердых отходов в год.

Сегодня огромные площади земли выделяются под свалки и для полигонов под захоронение мусора. И одновременно в Российской Федерации функционируют сотни не санкционированных свалок, производятся незаконные выбросы вредных веществ в воду и воздух, загрязняются почвы, в результате чего гибнет животный и растительный мир.

ЛИТЕРАТУРА

Бирюков В.В. Основы промышленной биотехнологии. М.: КолосС, 2004. 296 с.: ил. (Учебники и учебные пособия для студентов высш. учеб. заведений).

Денисенко А.Н., Максимюк Н.Н. Использование методов биотехнологии при переработке органических отходов // Молодой ученый. 2014. № 9. С. 81–84.

Мубаракшина Ф.Д., Гусева А.А. Современные проблемы и технологии переработки мусора в России и за рубежом // Известия Казанского государственного архитектурно-строительного университета. 2011. №. 4 (18).

УДК 326

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИГОДНОСТИ РУД ЧЕРНОСЛАНЦЕВОГО ТИПА К ПЕРЕРАБОТКЕ МЕТОДОМ БАКТЕРИАЛЬНО-ХИМИЧЕСКОГО ВЫЩЕЛАЧИВАНИЯ

Р.С. Алимов, М.Г. Сагдиева, С.А. Соатов, У.А Сомова, А.В. Баранова

Государственное предприятие «Институт минеральных ресурсов» Госкомгеологии и минеральных ресурсов Республики Узбекистан

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время проблема истощения разрабатываемых природных месторождений требует вовлечения в переработку новых видов сырья. По мнению многих исследователей, в ближайшее время таким источником могут стать месторождения нетрадиционного типа. Примером таких месторождений могут служить крупно-объёмные залежи черных сланцев, пригодных для открытой отработки. Черносланцевые руды характеризуются широким спектром разнообразных цветных, редких металлов и редкоземельных элементов (РЗЭ). Однако содержание ценных металлов в черносланцевых рудах незначительное [1–3]. С точки зрения геохимии черные сланцы – это удивительные образования с мощными геохимическими аномалиями P, U, Mo, V, Re, Se, Zn, Cu, Hg и ряда других редких элементов. Наиболее характерные для черных сланцев элементы – Mo, U, V, Re и, возможно, Ag и Au. Обогащение такой руды с применением известных технологий и режимов приводит к значительным потерям ценных компонентов. Сложность переработки таких руд заключается в необходимости глубокого селективного извлечения урана, цветных и редких металлов и других ценных элементов. В связи с этим, актуальной проблемой является разработка новых технологий для обеспечения эффективного, комплексного использования руд черносланцевого типа (4–6). Данная проблема актуальна и своевременна и для Республики Узбекистан, так как на территории республики имеется несколько месторождений черносланцевых руд, которые по химическому и минералогическому составам относятся к забалансовым рудам и не вовлечены в производство из-за отсутствия приемлемой экономически эффективной технологии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследований является технологическая проба руды, отобранная из месторождения Фазылман. Проведен анализ ICP MS содержания ценных металлов в пробе черносланцевой руды месторождения Фазылман. Для выделения ацидофильной ассоциации железо – серуокисляющих бактерий исследуемую черносланцевую руду измельчали до класса крупности -3+0 мм и добавляли питательную среду 9К в соотношении твердой фазы и жидкой фазы 1:10. В полученную пульпу добавляли серную кислоту до достижения величины pH, равной 2,5 и помещали в термостатированную качалку при температуре 32^0 С. Ежедневно определяли концентрацию различных форм железа в растворе и через каждые 3 дня – численность железоокисляющих и серуокисляющих бактерий методом предельных разведений. Затем для повышения окислительной активности выделенную ассоциацию железо – серуокисляющих бактерий Ф-12 адаптировали к исследуемой руде путем культивирования в пульпе с постепенным увеличением соотношения Т:Ж: 1:7, 1:5 и 1:3. Лабораторные исследования по определению пригодности черносланцевой руды к переработке методом бактериально-химического выщелачивания проводили в 9 биореакторах с массой руды по 1,5 кг с классом крупности -5+0 мм, -15+0 мм и -25+0 мм. После смачивания руды определяли влагоемкость и проницаемость. Для интенсификации процессов выщелачивания ежемесячно в растворы орошения добавляли соли аммония $(NH_4)_2SO_4$ из расчета 1,0 г/л и соли фосфора K_2 HPO_4 – 0,25 г./л. Первую стадию – закисление руды проводили орошением разбавленной серной кислотой объемом 500 мл 3 раза в неделю. Перед орошением руды в биореакторах определяли pH продуктивных растворов, концентрацию различных форм железа и численность железоокисляющих (*Acidithiobacillus ferrooxidans*) и серуокисляющих (*Acidithiobacillus thiooxidans*) бактерий. После достижения величины pH выходящих растворов 1,8–2,2, проводили интродукцию материала руды суспензией ацидофильной ассоциацией железо – серуокисляющих бактерий, адаптированной к черносланцевой руде. Стадия закисления длилась 4 месяца, стадия биовыщелачивания – 3–5 месяцев.

Для сравнения с бактериальным выщелачиванием черносланцевой руды проведены лабораторные исследования по сернокислотному выщелачиванию черносланцевой руды классом крупности -3+0 мм в 2 колонках по 1 кг руды в каждой. Орошение проводили раствором в три стадии: 1) 5 % серной кислотой, 2) 10 % и 3) 15 % серной кислотой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице 1 представлены данные ICP MS анализа по содержанию ценных металлов в пробе черносланцевой руды месторождения Фазылман с различным классом крупности. Как видно из данных таблицы, наибольший выход металлов – 21,77 % наблюдается в руде класса крупности -2,5+1,5 мм и -1+0,5 мм, а максимальное содержание практически всех ценных металлов – при классе крупности – 0,044 мм, за исключением железа, алюминия и цинка. В целом, по химическому составу исследуемую черносланцевую руду при содержании, г/т: ванадия – 6 760, урана – 1 386,9, молибдена – 577,9, никеля – 772,0, меди – 2 212,9 и цинка – 2 400 можно отнести к полиметаллическим забалансовым рудам. По данным полного химического анализа количество сульфидной серы в руде черных сланцев составляет 1,26 %. Минералогический анализ показал, что в руде обнаружены пирит, халькопирит, сфалерит и другие сульфидные минералы.

Таблица 1. Содержание ценных металлов в технологической пробе черносланцевой руды месторождения Фазылман с различным классом крупности

№	Класс крупности, мм	Выход, %	Содержание металлов, г/т							
			V	U	Mo	Fe	Al	Ni	Cu	Zn
1	-3+2,5	15,19	6400	740	540,0	57000	60000	610,0	1700	1900
2	-2,5+1,5	21,77	6500	840	550,0	61000	68000	710,0	1900	2300
3	-1,5+1	6,33	6800	880	590,0	63000	70000	740,0	2100	2300
4	-1+0,5	21,77	7300	1000	620,0	66000	74000	830,0	2300	2500
5	-0,5+0,315	5,82	6900	1100	590,0	62000	70000	810,0	2300	2500
6	-0,315+0,2	5,82	6800	1700	580,0	62000	80000	830,0	2400	2600
7	-0,2+0,1	8,61	6600	2300	550,0	59000	75000	820,0	2200	2400
8	-0,1+0,063	4,56	6100	2700	510,0	52000	63000	770,0	2800	3000
9	0,063+0,044	6,84	7000	3300	630,0	59000	65000	940,0	2900	3000
10	-0,044	3,29	7000	3300	670,0	61000	72000	970,0	3600	2300
11	Исх. руда	100	6760	1386,9	577,9	61005	69334,2	772,0	2212,9	2400

Проведены лабораторные исследования по определению обогатимости черносланцевой руды. Экспериментально было показано, что ни один из классических методов обогащения: гравитация, флотация, магнитная сепарация не пригодны для обогащения данной технологической пробы черносланцевой руды. При проведении лабораторных исследований по биовыщелачиванию черносланцевой руды были определены влагоемкость, проницаемость и расход серной кислоты в процессе закисления черносланцевой руды с различным классом крупности (таблица 2). Показано, что эти параметры зависят от класса крупности руды: чем мельче руда, тем больше влагоемкость и расход серной кислоты и меньше проницаемость.

Таблица 2. Влагоемкость, проницаемость и расход серной кислоты в процессе закисления черносланцевой руды с различным классом крупности

№ пробы	Класс крупности, мм	Влагоемкость, %	Проницаемость, мл/час	Расход серной кислоты, мл/кг
4	-25+0	12,9–14,8	415–440	21,4
	-15+0	14,5–15,3	360–388	28,5
	-5+0	17,3–18,0	345–360	36,8

В стадии закисления pH растворов снижается от 8,2 до 2,1–2,6, при этом количество железо- и серуокисляющих бактерий увеличивается от 0 до $1{,}3x10^5$кл/мл и $2{,}5x10^3$кл/мл соответственно, а численность тиосульфатокисляющих снижается от $2{,}5x10^5$кл/мл до 0.

Интродукцию проводили ацидофильной ассоциацией железо – серуокисляющих бактерий, численность которых составляет: железоокисляющих бактерий – $2.5x6.0x10^8$кл/мл, а серуокисляющих – $2{,}5x10^5$кл/мл. После интродукции численность *At. ferrooxidans* в твердой фазе руды увеличилась от $2.5x10^4$кл/г до $6.0x10^7$кл/г, в то время как в продуктивных растворах численность железоокисляющих бактерий варьирует в пределах $2.5x10^3$-$6.0x10^5$кл/мл. Количество *At. thiooxidans* в твердой фазе руды увеличилось от $2.5x10^3$кл/г до $6.0x10^5$кл/г, а в продуктивных растворах – от $2.5x10^2$ до $6.0x10^3$ кл/мл.

Приём материалов статей по адресу: actbio@mail.ru

Изменение численности железоокисляющих и серуокисляющих бактерий в процессе биовыщелачивания после интродукции ацидофильной ассоциацией представлено в таблице 3, а данные по переходу металлов в продуктивные растворы при бактериально-химическом и сернокислотном выщелачивании – в таблице 4.

Таблица 3. Изменение численности железо- и серуокисляющих бактерий в процессе биовыщелачивания черносланцевой руды

Дни	Класс крупности руды, мм	Численность железо- и серуокисляющих бактерий, кл/мл, кл/г			
		Acidithiobacillus ferrooxidans		*Acidithiobacillus thiooxidans*	
		Твердая фаза	Жидкая фаза	Твердая фаза	Жидкая фаза
Интродукция ацидофильной ассоциации железо – серуокисляющих бактерий					
135	-25	$6.0x10^4$	$2.5x10^2$	$2.5*10^3$	$1.3x10^2$
	-15	$2.5x10^4$	$6.0x10^2$	$6.0x10^3$	$6.0x10^2$
	-5	$6.0x10^5$	$2.5x10^3$	$2.5x10^3$	$2.5x10^2$
150	-25	$2.5x10^4$	$6.0x10^3$	$2.5x10^3$	$6.0x10^2$
	-15	$2.5x10^5$	$6.0x10^2$	$6.0x10^3$	$2.5x10^3$
	-5	$6.0x10^5$	$2.5x10^3$	$2.5x10^4$	$6.0x10^2$
165	-25	$2.5x10^5$	$6.0x10^3$	$2.5x10^3$	$6.0x10^2$
	-15	$2.5x10^4$	$6.0x10^2$	$6.0x10^3$	$2.5x10^2$
	-5	$6.0x10^5$	$2.5x10^3$	$2.5x10^4$	$6.0x10^3$
180	-25	$2.5x10^4$	$6.0x10^2$	$2.5x10^3$	$6.0x10^2$
	-15	$2.5x10^5$	$6.0x10^3$	$6.0x10^3$	$2.5x10^3$
	-5	$6.0x10^5$	$2.5x10^3$	$2.5x10^4$	$6.0x10^3$
195	-25	$2.5x10^5$	$6.0x10^3$	$2.5x10^4$	$6.0x10^3$
	-15	$2.5x10^6$	$6.0x10^4$	$6.0x10^4$	$2.5x10^3$
	-5	$6.0x10^6$	$2.5x10^4$	$2.5x10^5$	$6.0x10^4$
210	-25	$2.5x10^6$	$6.0x10^4$	$6.0x10^4$	$6.0x10^3$
	-15	$6.0x10^5$	$2.5x10^3$	$2.5x10^4$	$2.5x10^3$
	-5	$2.5x10^6$	$6.0x10^4$	$2.5x10^5$	$6.0x10^4$
225	-25	$2.5x10^5$	$6.0x10^3$	$2.5x10^3$	$6.0x10^2$
	-15	$2.5x10^4$	$6.0x10^4$	$6.0x10^4$	$2.5x10^3$
	-5	$6.0x10^6$	$2.5x10^4$	$2.5x10^4$	$6.0x10^2$
240	-25	$2.5x10^5$	$6.0x10^3$	$6.0x10^3$	$6.0x10^3$
	-15	$6.0x10^6$	$2.5x10^3$	$2.5x10^3$	$2.5x10^2$
	-5	$2.5x10^6$	$6.0x10^4$	$2.5x10^5$	$6.0x10^3$
255	-25	$2.5x10^5$	$6.0x10^4$	$2.5x10^3$	$6.0x10^3$
	-15	$2.5x10^6$	$6.0x10^5$	$6.0x10^4$	$2.5x10^3$
	-5	$6.0x10^7$	$2.5x10^5$	$2.5x10^5$	$6.0x10^4$
270	-25	$2.5x10^6$	$6.0x10^4$	$2.5x10^4$	$6.0x10^2$
	-15	$2.5x10^7$	$6.0x10^5$	$6.0x10^5$	$2.5x10^3$
	-5	$6.0x10^7$	$2.5x10^5$	$2.5x10^5$	$6.0x10^3$

Таблица 4 Переход металлов в продуктивные растворы при бактериально-химическом и сернокислотном выщелачивании черносланцевой руды

№ пробы	Наименование кеков	Переход металлов в продуктивные растворы, %				
		V	U	Ni	Cu	Zn
1	Биокек, класс крупности –25+0 мм	28,54	46,36	67,35	46,53	63,87
2	Биокек, класс крупности –15+0 мм	32,85	64,82	74,02	68,47	71,34
3	Биокек, класс крупности –5+0 мм	51,68	92,14	90,58	73,52	78,98
4	Химический кек, с 5 % H_2SO_4	18,84	78,41	60,18	38,92	55,74
5	Химический кек, с 10 % H_2SO_4	17,67	61,72	63,69	38,55	63,59
6	Химический кек, с 15 % H_2SO_4	28,89	87,81	84,64	44,14	65,24

Как видно из полученных данных, при бактериально-химическом выщелачивании наблюдается прямая корреляция между переходом металлов в продуктивные растворы и классом крупности руды: чем мельче руда, тем больше металлов в продуктивных растворах. Переход в продуктивные растворы ванадия составляет 28, 54, 32,85 и 51,68 %, урана – 46,36, 64, 82 и 92,14 %, никеля – 67,35, 74,02 и 90,58 %, меди – 46,53, 68,47 и 73,52 %, цинка – 63,87, 71,34 и 78,98 %.

В то время как при сернокислотном выщелачивании – чем крепче кислота, тем больше процент перехода металлов в продуктивные растворы. Активный переход металлов в продуктивные растворы при биовыщелачивании руды черных сланцев, по сравнению с сернокислотным выщелачиванием объясняется окислением сульфидных минералов: халькопирита, пирита, сфалерита и других минералов, в результате которого увеличивается процент перехода металлов в продуктивные растворы. Проведены эксперименты по сорбции металлов в статических условиях из продуктивных растворов с различными сорбентами АМП-2, А-560 и А-600. В диапазоне pH 1,5–1,8 продуктивных растворов извлечение металлов на сорбент АМП-2 составило, в %: урана – 86,0, ванадия – 37,5, а извлечение меди цинка и никеля составило 10–14 %. Извлечение на сорбент А-560 составило по урану – 77,0 %, извлечение остальных металлов – 10–12 %. Извлечение на сорбент А-600 составило по урану – 96,0 %, извлечение остальных металлов – 7–9 %.

ВЫВОДЫ

1) На основании ICP MS анализа по химическому составу исследуемую черносланцевую руду месторождения Фазылман при содержании, г/т: ванадия – 6 760, урана – 1 386,9, молибдена – 577,9, никеля – 772,0, меди – 2 212,9 цинка – 2 400, алюминия 69334 и железа – 61005 можно отнести к полиметаллическим забалансовым рудам.

2) Проведены эксперименты по кучному биовыщелачивания исходной руды с различным классом крупности: -5+0 мм, -15+0 мм и -25+0 мм с использованием разбавленной серной кислоты и последующей интродукцией ассоциации железо – серуокисляющих бактерий Ф-12, выделенной из исходной руды и адаптированной к исследуемой руде. После введения адаптированной ассоциации железо – серуокисляющих бактерий Ф-12 и дополнительного подкисления серной кислотой переход в продуктивные растворы ванадия составляет 28, 54, 32,85 и 51,68 %, урана – 46,36, 64, 82 и 92,14 %, никеля -67,35, 74,02 и 90,58 %, меди – 46,53, 68,47 и 73,52 %, цинка – 63,87, 71,34 и 78,98 %.

3) При сернокислотном выщелачивании переход в продуктивные растворы ванадия составляет 28,89 %, урана – 87,81 %, никеля – 84,64 %, меди – 44,14 и никеля – 65,24 %.

4) Проведенные эксперименты по сорбции металлов в статических условиях из продуктивных растворов с различными сорбентами АМП-2, А-560 и А-600 показали извлечение урана 86,0 %, ванадия 37,5 %, меди – в диапазоне pH 1,5–1,8 продуктивных растворов извлечение металлов на сорбент АМП-2 составило, в %: урана – 86,0, ванадия – 37,5, а извлечение меди цинка и никеля составило 10–14 %.

Таким образом можно полагать, что черносланцевые руды являются перспективным сырьем для разработки технологии комплексной переработки и извлечения ряда ценных металлов, что позволит в перспективе, одной стороны, увеличить в значительной степени сырьевую базу республики, а с другой, создать технологический цех получения цветных и редких металлов, а также редкоземельных элементов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Grobelski T, Farbiszewska-Kiczma J, Farbiszewska T. Bioleaching of polish black shale // Physicochemical Problems of Mineral Processing. 2007. 41. P. 259–264.

2. Sadowski Z., Szubert A., Maliszewska I., Jazdzyk E. A view on the organic matter and metalloporphyrins biodegradation as characteristic component of black shale ore // Procee-dings of IBS 2007 Biohydrometallurgy Advanced Materials Research, 2007, 20/21: 95 – 98.

3. Айтметова И.О. Разработка технологии производства метаванадата аммония из черных сланцев месторождения «Баласаускандык» // Промышленность Казахстана, № 10, 2010. с. 74–76.

4. Суркова Т.Ю., Юлусов С.Б., Павлов А.В. Извлечение редкоземельных элементов из растворов кучного выщелачивания урановых руд // Доклады Международной научной конференции «Наука и образование – ведущий фактор стратегии «Казахстан-2030» Караганда, 2010. с. 135–137.

5. Козлов В.А., Суркова Т.Ю., Юлусов С.Б., Квятковская М.Н. О возможности извлечения редкоземельных элементов из урансодержащего сырья // Доклады Национальной Академии наук Республики Казахстана. № 2. 2012. с. 42–47.

6. Ташканбаев О.Н., Сомова У.А., Сагдиева М.Г. Возможность извлечения ценных компонентов из черносланцевой руды // Журнал «Геология и минеральные ресурсы». № 4. 2017. с. 120–122.

УДК 577.212; 577.29; 591.169

БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ИЗОФОРМ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА PITX В ТКАНЯХ ХВОСТАТЫХ АМФИБИЙ: СПЕЦИФИЧНОСТЬ ЭКСПРЕССИИ В РЕГЕНЕРИРУЮЩЕЙ СЕТЧАТКЕ ТРИТОНОВ

В.Н. Симирский, Ю.В. Маркитантова

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

Проведен биоинформационный анализ регуляторных генов семейства Pitx (Pitx1, Pitx2, Pitx3) и их изоформ у хвостатых амфибий, обладающих высокими регенерационными способностями. Эти гены контролируют формирование ряда тканей и органов в эмбриогенезе позвоночных, и, как предполагается, вовлечены в регуляцию процессов регенерации тканей (L'honore et al. 2014). С помощью праймеров, сконструированных к наиболее консервативным участкам гена *Pitx1* позвоночных (*Danio rerio, Xenopus laevis, Gallus gallus*), из сетчатки взрослых тритонов P. waltl выделены два ПЦР-фрагмента длиной 234 и 233 п.о., определена их нуклеотидная последовательность. Оба фрагмента содержат гомеодомен и участок, кодирующий домен OAR. Анализ полученных фрагментов с помощью программы Blast (Pub Med), множественного выравнивания с известными последовательностями мРНК для ряда позвоночных и построения филогенетических деревьев (метод ближайших соседей, Neighbor-Joining) подтвердил гомологию одного из фрагментов с геном *Pitx1*, а другого – с *Pitx2*. Полученные фрагменты были использованы в качестве зондов (Query Sequence) для поиска полноразмерных транскриптов Pitx1 и Pitx2 в базе данных транскриптома туловища тритонов *P. waltl*, любезно предоставленной Dr. Elewa (Elewa et al., 2017). В результате скрининга обнаружены 9 транскриптов, три из которых гомологичны Pitx1, а шесть – Pitx2. Транскрипты Pitx1 тритона наиболее сходны с соответствующими транскриптами шпорцевой лягушки и курицы, а транскрипты Pitx2 – с транскриптами этого гена у человека. Соответствующие белки содержат гомеодомен и домен OAR, характерные для генов семейства Pitx.

Blast search databases information Databases 1-10	
WGS_VDB://GAQK01	Hynobius chinensis
WGS_VDB://GEBK01	Ambystoma mexicanum
WGS_VDB://GESS01	Tylototriton wenxianensis
WGS_VDB://GFBM01	Ambystoma mexicanum
WGS_VDB://GFLD01	Ambystoma 'unisexual hybrid'
WGS_VDB://GFLI01	Ambystoma tigrinum
WGS_VDB://GFLJ01	Ambystoma texanum
WGS_VDB://GFLO01	Ambystoma laterale
WGS_VDB://GFMY01	Ambystoma maculatum
WGS_VDB://GFZP01	Ambystoma mexicanum
WGS_VDB://GHDZ01	Batrachuperus yenyuanensis
WGS_VDB://GHKF01	Taricha granulosa
tsa_nt	Transcriptome Shotgun Assembly (TSA) sequences

Рис. 1. Базы данных транскриптов Urodela, использованные для анализа (Transcriptome Shotgun Assembly, PubMed)

У тритона *Cynops pyrrhogaster* (база данных http://antler.is.utsunomiya-u.ac.jp/imori, Nakamura et al., 2014) выявлены 27 транскриптов, кодирующих Pitx1 и Pitx2, в мозге, сердце, конечностях, хрусталике и глазном бокале. Из них в глазном бокале экспрессируется 22 транскрипта (12 изоформ Pitx1 и 10 – Pitx2), причем экспрессия 17-и транскриптов специфична для глазного бокала. Интересно, что в регенерирующей сетчатке тритона (30 сут) экспрессируются 7 изоформ Pitx1 и Pitx2, которые не обнаружены на других сроках регенерации сетчатки, что может указывать на избирательную транскрипционную активность этих генов. Изоформы Pitx2, экспрессирующиеся на этих стадиях не имели OAR домена. Ранее у тритона вида *Pleurodeles waltl* мы идентифицировали присутствие белка Pitx2 в сетчатке на протяжении всего периода ее регенерации, начиная со стадии нейробластов и до полного формирования (Авдонин и др., 2010).

Расширенный поиск гомологов Pitx в опубликованных базах данных транскриптов хвостатых амфибий (рис. 1) позволил идентифицировать 8 изоформ Pitx1 и 9 изоформ Pitx2 у *Ambystoma mexicanum, Ambystoma maculatum, Hynobius retardatus, Hynobius chinensis и Tylototriton wenxianensis* (рис. 2). Высоко идентичные участки соответствовали области ORF, тогда как области 5' – и 3' – UTR были наиболее вариабельны. Исключение составляет участок длиной около 460 п.о. в области 3' – UTR в транскриптах Pitx2 *Ambystoma maculatum*. Этот участок присутствует также в транскриптах Pitx2 *P. waltl*, и у целого ряда эволюционно удаленных позвоночных (черепахи, крокодил, беркут, летучие мыши, утконос, беркут, дельфин). Высокая эволюционная консервативность последовательности этой области позволяет предполагать ее регуляторную роль. В частности, в 3'-UTR области мРНК, кодирующей Pitx1, могут располагаться сайты связывания с микроРНК, контролирующие трансляцию этих мРНК (Ohira et al., 2015). Нам не удалось выявить транскрипты, гомологичные Pitx3, у изученных видов хвостатых амфибий. Исключение составляют тритоны *Hynobius*, у которых выявлены лишь две изоформы Pitx3 (рис. 2). Кроме того, у этого вида тритонов обнаружен химерный транскрипт, который кодирует последовательности, гомологичные генам Pitx3 и Zmynd8. Видовые различия в экспрессии гена Pitx3 могут обуславливать различный регенерационный потенциал разных видов тритонов. Аналогичная картина наблюдается и в случае других гомеобокс-содержащих генов. В частности, показано, что у аксолотля *Ambystoma mexicanum* отсутствует ген Pax3, функцию которого у того вида выполняет, очевидно, Pax7 (Nowoshilow et al., 2018).

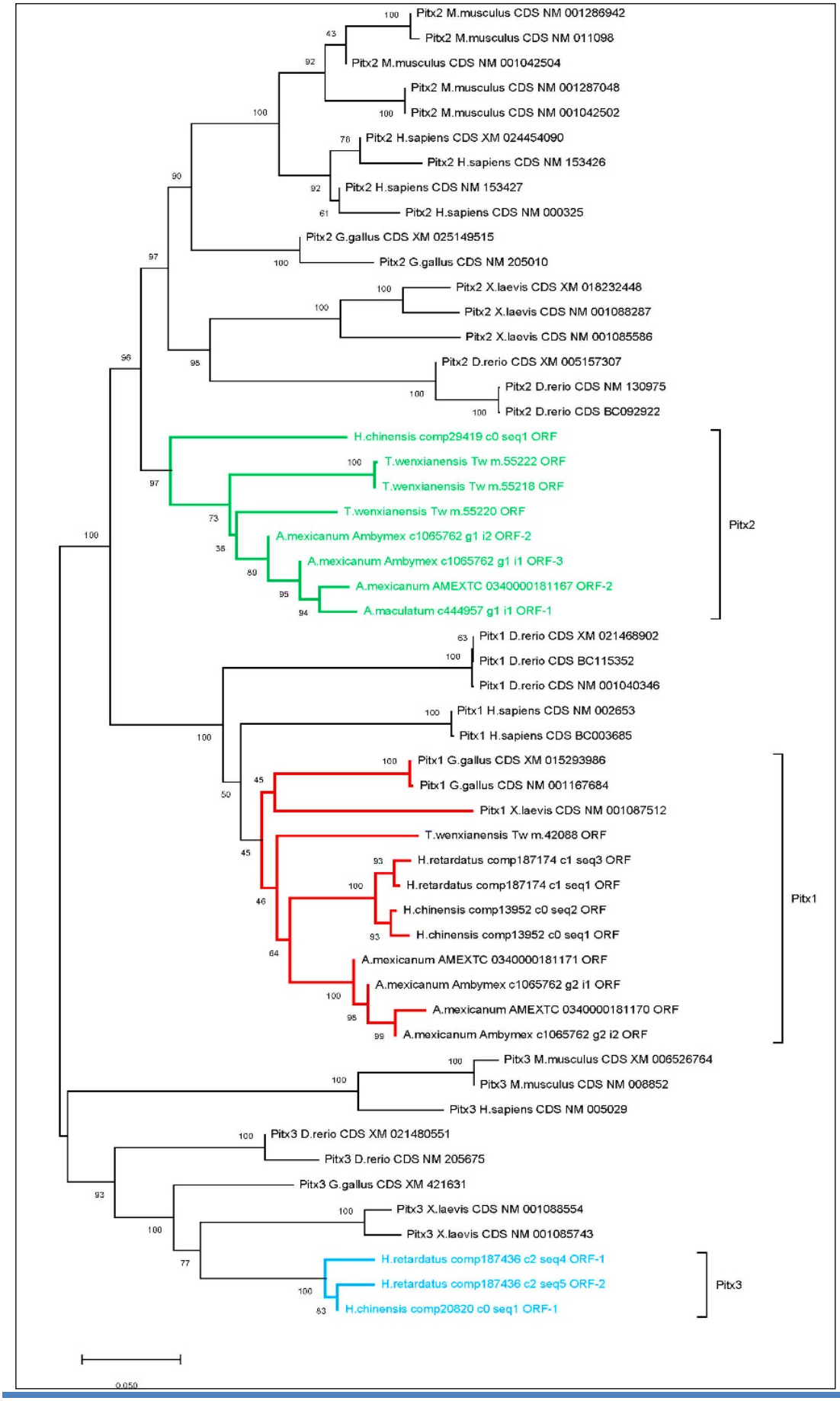


Рис. 2 Филограмма филогенетического дерева, построенная с помощью программы MegaX по методу ближайших соседей (Neighbor-Joining). Статистическую достоверность оценивали с помощью бутстрап-метода (1000 реплик). Соответствующие оценки (%) даны вблизи соответствующих ветвей и / или узлов. Для построения дерева использовали ORF транскриптов, найденных с помощью программы BLAST (Pub Med). Отмечены группы транскриптов, принадлежащие гену Pitx1 (красный), Pitx2 (зеленый) и Pitx3 (синий)

Полученные данные свидетельствуют о видовых различиях в экспрессии генов семейства Pitx и дифференциальной экспрессии их изоформ в процессе регенерации сетчатки у хвостатых амфибий.

Работа выполнена в рамках темы НИР № ИНГЗ 0108–2019–0005.

ЛИТЕРАТУРА

Avdonin P.P., Grigoryan E.N., Markitantova Yu. V. Transcriptional factor Pitx2: Localization during triton retina regeneration // Biology Bulletin. 2010. Т. 37. № 3. С. 231–235.

Elewa A., Wang H., Talavera-López C., Joven A., Brito G., Kumar A., Hameed L.S., Penrad-Mobayed M., Yao Z., Zamani N., Abbas Y., Abdullayev I., Sandberg R., Grabherr M., Andersson B., Simon A. Reading and editing the Pleurodeles waltl genome reveals novel features of tetrapod regeneration // Nat. Commun. 2017. Vol. 8. No. 1. 2286. doi: 10.1038/s41467–017–01964–9.

Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms // Mol. Biol. Evol. 2018. Vol. 35. P. 1547–1549.

L'honore A., Drouin J., Buckingham M., Montarras D. Pitx2 and Pitx3 transcription factors: two key regulators of the redox state in adult skeletal muscle stem cells and muscle regeneration //Free Radic. Biol. Med. 2014. Vol. 75. Suppl 1. S37. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.781.

Nakamura K., Islam M.R., Takayanagi M., Yasumuro H., Inami W., Kunahong A., Casco-Robles R.M., Toyama F., Chiba C. A transcriptome for the study of early processes of retinal regeneration in the adult newt, Cynops pyrrhogaster // PLoS One. 2014. V. 9. No. 10. e109831. doi: 10.1371/journal.pone.0109831.

Nowoshilow S., Schloissnig S., Fei J.F., Dahl A., Pang A.W.C., Pippel M., Winkler S., Hastie A.R., Young G., Roscito J.G., Falcon F., Knapp D., Powell S., Cruz A., Cao H., Habermann B., Hiller M., Tanaka E.M., Myers E.W. The axolotl genome and the evolution of key tissue formation regulators // Nature. 2018. Vol. 554. No. 7690. P. 50–55. doi: 10.1038/nature25458.

Ohira T., Naohiro S., Nakayama Y., Osaki M., Okada F., Oshimura M., Kugoh H. miR-19b regulates hTERT mRNA expression through targeting PITX1 mRNA in melanoma cells // Sci Rep. 2015. Vol. 5. 8201. doi: 10.1038/srep08201.

УДК 577.1 + 577.3

ПОИСК ИНГИБИТОРОВ ПИРИМИДИН НУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗ ИЗ *B. SUBTILIS* МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА И ДИНАМИКИ.

П.А. Эйстрих-Геллер, С.В. Рубинский, А.А. Лашков

ФНИЦ «Кристаллография и фотоника, РАН, Москва, Россия

Нуклеозидфосфорилазы и, в частности, тимидинспецифичная нуклеозидфосфорилаза – белки-ферменты, играющие важную роль в синтезе нуклеозидов и азотистых оснований. Нуклеозидфосфорилазы катализируют фосфоролитическое расщепление пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов [1]. Некоторые белки этого класса обнаружены во многих раковых клетках, что позволяет использовать их в качестве активаторов противоопухолевых препаратов. Актуальной является разработка ингибиторов, специфичных к этим белкам, носящих антиангиогенный характер или препятствующих расщеплению противоопухолевых препаратов этим белком.

Источником изучаемого фермента – пиримидинфосфорилазы – является B. subtilis – бактерия, используемая в биотехнологии [2]. Перспективным является применение пиримидинфосфорилаз из этого источника в качестве каталитического агента при синтезе противоопухолевых препаратов – аналогов пиримидинов.

Структурные формулы лигандов пиримидинфосфорилаз предварительно выбраны на основе работы [3]. Подбор лиганда для пиримидинфосфорилазы осуществлялся с помощью методов молекулярного докинга и динамической симуляции в несколько этапов. На первом этапе, непосредственно методом молекулярного докинга с помощью пакета программ Autodock [4] осуществлялся поиск подходящих конформаций лигандов, с точки зрения их положения в активном центре белка. Для исследования устойчивости связывания лигандов с PyNP проводилось молекулярно-динамическое (МД) моделирование этого комплекса в пакете программ GROMACS (версия 2018.6) [5]. Второй этап заключался в проведении оценки свободной энергии связывания белок-лиганд методом расчета линейной энергии взаимодействия [6]. На этом этапе кроме конформаций, полученных методом молекулярного докинга, выявлены конформации лигандов с минимальным значением оценки свободной энергии связывания по МД-траектории.

На следующем этап методом возмущения свободной энергии [7] были расчитаны значения свободной энергии для конформаций, отобранных на предыдущих этапах. Конформации лигандов со значением свободной энергии больше нуля отбраковывались.

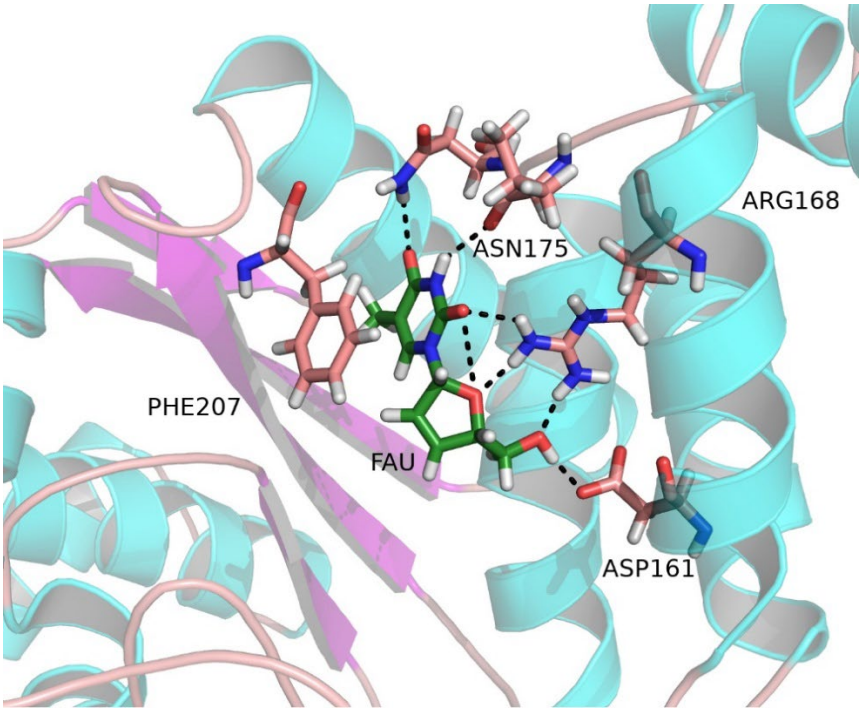


Рис. 1 – Лиганд FAU в активном центре белка пиримидин нуклеозидфосфорилазы

Таким образом в ходе работы был отобран предполагаемый ингибитор для белка пиримидин-нуклеозидфосфорилазы (1-(2'–дезокси-2'–фтор-ß-D-арабино-фуранозил) (FAU)), в одной устойчивой конформации, с большей вероятностью показывающей как именно данный лиганд ингибирует изучаемый белок взаимодействуя с аминокислотными астатками активного центр. а (рис. 1). $\Delta G_{связывания}$ = -33,693 кДж/моль, K_i = 1,4 мкМ при T = 300 К.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН. Для выполнения расчетов был использован гибридный высокопроизводительный вычислительный комплекс ФИЦ ИУ РАН [8]

ЛИТЕРАТУРА

1. T. Utagawa // J. Mol. Catal. 1999, T. B 6 № 3, C 215.
2. Saito Y, Taguchi H, Akamatsu T // DNA taken into Bacillus subtilis competent cells by lysed-protoplast transformation is not ssDNA but dsDNA. Journal of Bioscience and Bioengineering. T. 101 (4). № 9. C. 334.
3. Liekens, S., Bronckaers, A., Balzarini // J. Improvement of purine and pyrimidine antimetabolite-based anticancer treatment by selective suppression of mycoplasma-encoded catabolic enzymes // Lancet Oncol. 2009. T. 10 (6). № 35. C. 628.
4. Morris, G.M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S. and Olson, A.J. // Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexiblity. J. Computational Chemistry 2009. T. 16. № 91. C. 2785.
5. Van Der Spoel D., Lindahl E., Hess B., Groenhof G., Mark A.E., Berendsen H.J.C. // Journal of Computational Chemistry. 2005. T. 26. № 16. C. 1701.
6. Aqvist J., Marelius J. // Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening. 2001. T. 4. № 8. C. 613., Hansson T., Marelius J., Aqvist J. // Journal of Computer-Aided Molecular Design. 1998. T. 12. № 1. C. 27.
7. Aldeghi M., Heifetz A., Bodkin M.J., Knappcd S., Biggin P.C. // Chemical Science. 2016. T. 7. № 1. C. 207.
8. Федеральный исследовательский центр Информатика и управление РАН [Электронный ресурс]: сайт. – Москва: ФИЦ ИУ РАН. – URL: http://hhpcc.frccsc.ru. [Ссылка] Гибридный высокопроизводительный вычислительный комплекс | ФИЦ ИУ РАН http://hhpcc.frccsc.ru.

УДК 004.932

ПРИМЕНЕНИЕ ИНФОРМАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ И ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ЗАДАЧ

Т.Ц. Дамдинова[1], Л.Ю. Прудова[1], Т.Е. Данилова[2]

[1] Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления, Улан-Удэ, Российская Федерация

[2] Байкальский колледж туризма и сервиса, г. Улан-Удэ, Российская Федерация

ВВЕДЕНИЕ

Многие процессы в научно-исследовательских лабораториях, на производстве или в медицине сопровождаются видимыми невооруженным глазом изменениями цвета объектов (сырья, материалов, готовой продукции и т. п.). В то же время выполнить количественную оценку и объективно охарактеризовать результаты этих изменений в отдельных случаях – нелёгкая задача, с которой сталкиваются специалисты.

В современном мире для фиксации изменения исследуемых объектов широко применяются цифровые методы: получение изображений с помощью фото- или видеосъёмки. Интерпретация содержания этих изображений должна иметь достаточно точные и объективные методы. Предлагается множество прикладных программ, которые могли бы помочь в решении данной задачи, однако многие из них не справляются с поставленными вопросами или слишком сложны для пользователя, не являющегося профессионалом в сфере информационных технологий.

Целью данной работы является обзор примеров и обсуждение результатов использования авторской программы «Определение цветов на цифровом изображении» [1] для решения задач производственного и исследовательского характера.

ПРОГРАММА ОБРАБОТКИ ЦВЕТНЫХ ИЗОБРАЖЕНИЙ

Преподавателями кафедры «Инженерная и компьютерная графика» ВСГУТУ разработана программа «Определение цветов на цифровом изображении», позволяющая осуществлять количественную оценку цветов цифрового изображения. Данная программа создана в среде Delphi, имеет удобный пользовательский интерфейс, решает задачи по определению цвета пикселей цифрового изображения, что исключает ошибки визуального сравнения цвета изображений с эталоном или количественной обработки цветов на цифровом изображении.

Работа в программе для пользователя заключается в применении следующих кнопок:

Open – открытие обрабатываемого файла.

Программа обрабатывает графические файлы с расширениями jpeg, bmp.

Colors Cnt – изменение уровня градации RGB-цветов.

В программе реализовано изменение уровней градации RGB-цветов от 2 до 6, что позволяет находить на изображении от 8 до 216 цветов.

Get Colors – определение цветов на изображении.

При нажатии данной кнопки цвета, выявленные на изображении, отображаются в области Colors to show и Colors to count. Эти области предназначены для множественного выбора цветов. Первая позволяет отобразить выбранные цвета в правой части окна программы, вторая – определяет цвета, по которым требуется получить их количественные характеристики для изображения исследуемого объекта (рис. 1). Для пользователя программы имеется возможность выбора требуемых для анализа цветов и их оттенков.

Get Limits – выделение части изображения.

Для некоторых задач требуется анализировать не полностью все изображение, а только его часть, которая может быть выбрана пользователем. Для этой цели обычно выбирают любую активную область при помощи мыши. К примеру, была выбрана средняя часть изображения при интерпретации результатов исследований (рис. 2).

Count Checked – вычисление пикселей выбранных цветов.

При нажатии данной кнопки по цветам, помеченным в области Colors to count, создаются массивы данных, содержащих количество этих цветов по столбцам и строкам. Данные массивов отображаются в столбчатых гистограммах, в которых имеются количественные характеристики по строкам и столбцам (рис. 2).

Save as Excel-file – сохранение данных в формате Excel.

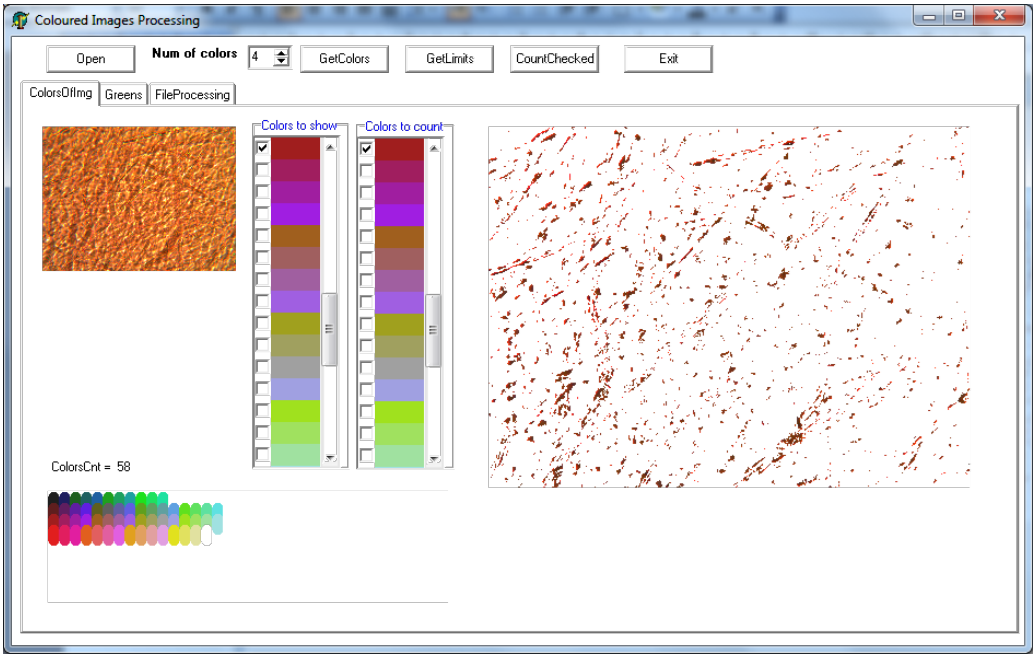


Рис. 1. Интерфейс программы «Определение цветов на цифровом изображении» при загрузке обрабатываемого изображения и выборе цветов

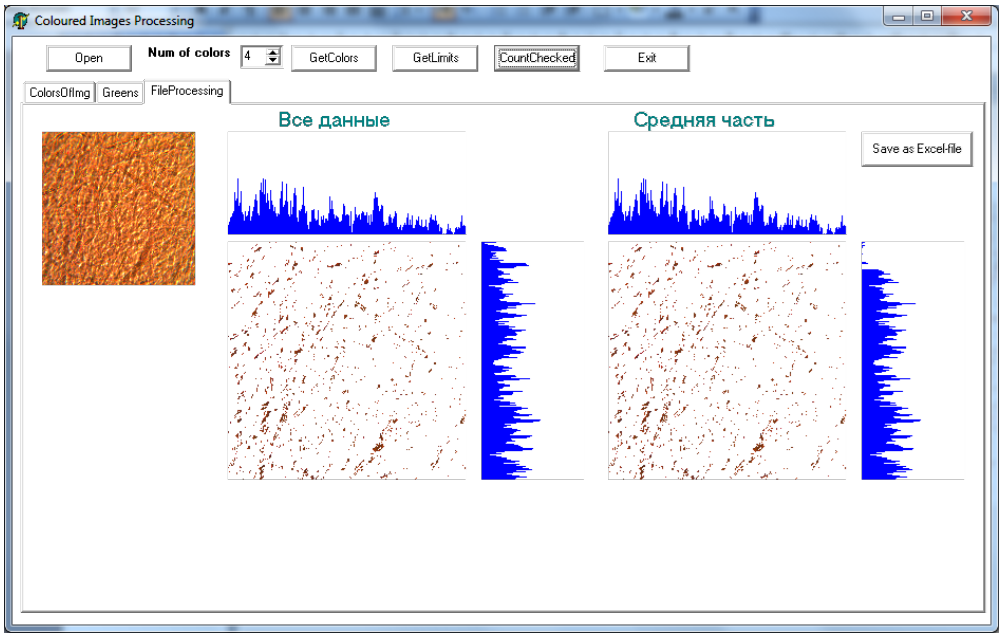


Рис. 2. Результат работы программы при количественной оценке цветов

Имеется возможность экспорта сформированных массивов данных в таблицы Excel. При этом в таблице Excel пользователь получает следующие данные: название обработанного файла, размер изображения в пикселях, минимальные и максимальные данные гистограмм и количество пикселей по столбцам и строкам.

Преимуществом программы является простота ее использования, возможность изменения и подбора интересующих пользователя цветовых оттенков, получение количественных характеристик в виде гистограммы и в форме таблицы Excel для дальнейшей статистической обработки.

ПРИМЕРЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОГРАММЫ «ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦВЕТОВ НА ЦИФРОВОМ ИЗОБРАЖЕНИИ»

Программа была задействована для решения задач в различных отраслях знаний, в данной статье опущены подробности исследований и приводятся ссылки на предыдущие работы.

В первую очередь для корректной работы программы не маловажное значение имеет качество используемых цифровых изображений. Это понятие достаточно широкое и включает в себя множество технических аспектов. В качестве примеров по этому вопросу приводится ряд работ [2, 3], посвященных подбору необходимых режимов фотосъёмки (освещённости, расстояния от камеры до объекта, цвета фона и других параметров). Поиск оптимальных условий съемки был осуществлён в процессе определения концентрации оксида хрома в водном растворе хромового дубителя.

Используя авторскую программу, проводились исследования при выполнении работ по изучению возможности определения скорости и глубины проникания химических материалов в капиллярно-пористые тела при изучении процессов дубления кожи и пропитки древесины. Объектами исследования при этом служили шкуры крупного рогатого скота, подвергавшиеся процессу дубления водным раствором хромового дубителя и образцы дерева липы, обрабатываемые водным раствором красителя. По результатам проведенных лабораторных исследований зарегистрирован патент на изобретение [4] и опубликованы статьи в сборниках конференций [5, 6,7].

Результаты исследований в этом направлении показали, что использование программы позволяет более точно рассчитать количество реагента для проведения процесса дубления кожи или пропитки древесины красителем, определить скорость массопередачи, а также уменьшает трудоёмкость и материалоёмкость исследований по подбору режимов обработки материалов.

Использование авторской программы в других областях знаний также показало положительные результаты.

Программа дважды использовалась для проработки возможности мониторинга качества пищевых продуктов по цифровому изображению. Первым таким примером является изучение процессов окисления свежей и соленой рыбы при её хранении в условиях низких температур (-30^0 С). Исследователями были предприняты попытки оценить степень окисления рыбы с использованием фотосъёмок срезов образцов и последующей обработкой изображений с помощью программы. Параллельно процесс окисления был зафиксирован традиционным спектрофотометрическим методом. Программой были определены количественные показатели оттенков жёлтого цвета на изображении среза образцов хранящейся рыбы. В результате проведенных исследований по определению степени окисления рыбы при хранении установлена взаимосвязь между площадью оттенков желтого цвета мышечной ткани рыбы и значениями тиобарбитуровых чисел, определяемых спектрофотометрическим методом [8]. Таким образом, исследования показали, что имеется возможность определять степень окисления рыбы с помощью авторской программы, экономя при этом реактивы и время проведения лабораторных исследований.

Вторым примером использования программы при исследовании качества пищевых продуктов может служить работа в области определения качественных характеристик варёных и варёно-копчёных колбас [9]. В результате исследований в этом направлении установлено, что цифровой метод определения качества продукта подтверждает данные, полученные в результате экспертной оценки.

В заключение следует привести пример использования программы с целью количественной оценки химического состава плёнкообразных структур, образовавшихся в культуральных жидкостях микробиологического происхождения как побочный продукт при проведении экспериментов по биоутилизации яичной скорлупы [10]. Изучая строение и химический состав плёнкообразных структур, исследователи столкнулись с проблемой количественной оценки того или иного цвета на цифровом изображении образцов, окрашенных гистохимическими методами. В программе были обработаны выполненные ранее цифровые изображения, что позволило объективно оценить и сделать выводы в отношении химического состава исследуемых объектов. Примеры выполнения данных исследований отображены на рис. 1,2.

Более подробно с проведением и результатами исследований, представленными в данной статье можно ознакомиться в работах [2–10].

ВЫВОДЫ

Таким образом, приведённые примеры демонстрируют широкие перспективы использования авторской программы «Определение цветов на цифровом изображении» и её прикладное значение. Программа позволяет качественно выполнить объективную оценку наличия пикселей заданных цветов на цифровом изображении. Авторская программа может быть использована в разных областях, где требуется такая обработка: на пищевых производствах для определения качества продукции, сырья, в медицине при оценке гистохимических исследований, а также в случаях оценки и объективной интерпретации экспериментальных данных и лабораторных исследований, зафиксированных с помощью цифровых изображений.

ЛИТЕРАТУРА

Дамдинова Т.Ц., Жимбуева Л.Д. Определение цветов на цифровом изображении. Свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ № 2014617030, опубл. 09.07.2014 г. (Роспатент)

Дамдинова Т.Ц., Советкин Н.В., Мисюркеева Т.Н., Тармаев Д.В. Условия съемки и качество цифровых изображений в цветометрии. В сб: Материалы III Всероссийской молодежной научной конференции с международным участием «Экологобезопасные и ресурсосберегающие технологии и материалы» Улан-Удэ, Изд-во Бурятский научный центр Сибирского отделения РАН, 2017. с. 264–265.

Раднаева В.Д., Дамдинова Т.Ц., Шимин А.Р., Нимаева Б.Б. Совершенствование метода определения концентрации оксида хрома в водном растворе хромового дубителя. В сб: Материалы III Всероссийской молодежной научн. конф. с межд. участием «Экологобезопасные и ресурсосберегающие технологии и материалы» Улан-Удэ, Изд-во Бурятский научный центр Сибирского отделения РАН, 2017. С. 273–275

Раднаева В.Д., Советкин Н.В., Дамдинова Т.Ц., Емельянов И.Д. Способ определения скорости массопередачи в капиллярно-пористых телах. Патент на изобретение RUS 2567510 17.11.2014

Раднаева В.Д., Советкин Н.В., Дамдинова Т.Ц., Жимбуева Л.Д. Определение глубины проникания дубителя в дерму на основе цифрового изображения. В кн: Материалы X Международной научно-практической конференции «Кожа и мех в XXI веке: технология, качество, экология, образование» – Улан-Удэ, Изд-во ВСГУТУ, 2014. – С. 11–14.

Дамдинова Т.Ц., Раднаева В.Д., Жимбуева Л.Д. Использование методов обработки изображений для исследования процесса пропитки материалов. // Динамика систем, механизмов и машин. Омск, Изд-во: Омский государственный технический университет 2016. № 3. С. 137–141.

Damdinova T., Radnaeva V., Zhimbueva L. Using of image processing to study impregnation process in materials. В сборнике: 2016 Dynamics of Systems, Mechanisms and Machines, Dynamics, 2016.

Никифорова А.П., Дамдинова Т.Ц., Столярова А.С. Изучение органолептических свойств рыбных продуктов с применением методов цифровой обработки изображений. // Вестник ВСГУТУ. 2018. № 4 (71). С. 135–142

Никифорова А.П., Дамдинова Т.Ц. Оценка качества мясных продуктов методом цифровой обработки изображений. // Контроль качества продукции. 2019. № 3. С. 32–38.

Прудова Л.Ю., Данилова Т.Е., Дамдинова Т.Ц. Использования программных средств для изучения цифровых изображений плёнкообразных структур. В сб: Материалы IV Всероссийской научно-практической конференции «Биотехнология в интересах экономики и экологии Сибири и Дальнего Востока» – Улан-Удэ, Изд-во ВСГУТУ, 2016. С. 90–94.

УДК 616–07:004

АНАЛИЗ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ В ХОДЕ ЛЕЧЕНИЯ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТА СРЕДСТВАМИ ПАКЕТА MS EXCEL

К.А. Мороз, А.С. Ткаченко, К.В. Шилеев

Донской государственный технический университет, Ростов-на-Дону, Россия,

В настоящее время существует большое количество заболеваний, а также способов их лечения. В связи с этим на рынке медикаментов и медицинского оборудования можно встретить большое количество наименований. Очень часто большую часть рынка занимают препараты-аналоги, вариации состава которых вызывают различную реакцию организма человека. В связи с этим даже самому опытному специалисту сложно назначить правильное лечение, которое подходило бы конкретному пациенту. Организм каждого человека индивидуален, поэтому реакция на один препарат у двух разных людей может быть различной. В связи с этим появляется необходимость изучения воздействия у конкретного препарата на конкретного пациента. И создания систематизированной картины наблюдения за действием препарата.

В медицинских учреждениях часто используется компьютерное оснащение: использование интернет-технологий, ведение электронных историй болезней, где хранится вся необходимая информация, автоматизированная система взаимодействия между различными медицинскими учреждениями. Для обеспечения полного контроля эффективности применения различных препаратов требуются специализированные программы. Создание централизованной программы, которая могла бы отслеживать воздействие любого препарата при любой болезни невозможно на настоящий момент.

В нашей работе рассматривается возможность выявления наиболее эффективного препарата в ходе лечения гломерулонефрита. Для выполнения работы использовались данные показателей клинического и биохимического анализа крови. Основными показателями, характеризующими заболевание, являются: лейкоциты, эритроциты, гемоглобин, тромбоциты, СОЭ, мочевина, креатинин, общий белок [1, 2]. Своевременный контроль изменения этих показателей помогает ускорить общий процесс выздоровления. Кроме того, врачу необходимо анализировать и другие показатели состояния пациента для выявления полной клинической картины [3].

Исходные данные представляют собой значения общеклинического и биохимического анализа крови пациентов с заболеванием гломеруонефрит. Нами выполнено исследование результатов анализов по следующим параметрам: гематокрит, гемоглобин, средний объем эритроцита, средняя концентрация гемоглобина в эритроците, средний объем тромбоцитов, тромбокрит, относительная ширина распределения тромбоцитов по объему, абсолютное содержание тромбоцитов, абсолютное содержание эритроцитов, ширина распределения эритроцитов, абсолютное содержание лейкоцитов, скорость оседания эритроцитов, абсолютное содержание базофилов, относительное содержание базофилов, абсолютное содержание эозинофилов, относительное содержание эозинофилов, абсолютное содержание гранулоцитов, относительное содержание гранулоцитов, абсолютное содержание лимфоцитов, относительное содержание лимфоцитов, абсолютное содержание моноцитов, относительное содержание моноцитов, абсолютное содержание нейтрофилов, относительное содержание нейтрофилов, аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, билирубин, креатинин, мочевина, общий белок, холестерин. Измерения выполнялись с 2010 по 2018 год каждые три месяца, таким образом общий массив данных по каждому пациенту составил 115 значений по одному исследуемому показателю. За девять лет наблюдения пациентам с гломерулонефритом корректировалась схема лечения, использовались три основных препарата: преднизолон, сандимун, майфортик. Для выявления эффективности воздействия этих препаратов нами был проведен анализ данных с помощью пакета MS Excel.

В данной статье приведены результаты анализа по одному пациенту. На всех диаграммах (рис. 1–4) представлены изменения показателей крови с октября 2010 года по май 2018 года. Для лучшего визуального эффекта на графиках отмечены верхняя и нижняя границы нормы, а также моменты изменения терапии (фиолетовая линия соответствует препарату преднизолон – октябрь 2010, красная линия соответствует препарату сандимун – октябрь 2011, зеленая линия соответствует препарату майфортик – январь 2013).

На рисунке 1 можно увидеть, что результаты показателя абсолютного содержания лейкоцитов после введения в курс лечения преднизолона снизились, но все равно остались выше нормы. После назначения сандимуна в течении 2012 года результаты снижались, в конце 2012 года отмечается резкое возрастание показателей. После назначения майфортика результаты постепенно пришли в норму. На рисунке 2 можно увидеть, что результаты показателя скорости оседания эритроцитов значительно превышают верхнюю границу нормы, после введения майфортика в курс лечения результаты немного снизились, но не достигли границ нормы. На рисунке 3 можно увидеть, что результаты показателя абсолютного содержания лимфоцитов после введения преднизолона находились на верхней границе нормы, после назначения с середины 2012 года результаты резко возросли и превышали норму, затем в конце года результаты пришли в норму и после назначения майфортика значения этого показателя находились в границах нормы. На рисунке 4 можно увидеть, что результаты общего белка после назначения преднизолона были значительно ниже границ нормы. После назначения сандимуна значения колебались в диапазоне 40–70, после назначения майфортика результаты имели значения 50–80, что соответствует нижней границе нормы. Таким образом, можно сделать вывод о достаточно высокой эффективности препарата майфортик в ходе лечения гломерулонефрита для данного пациента.

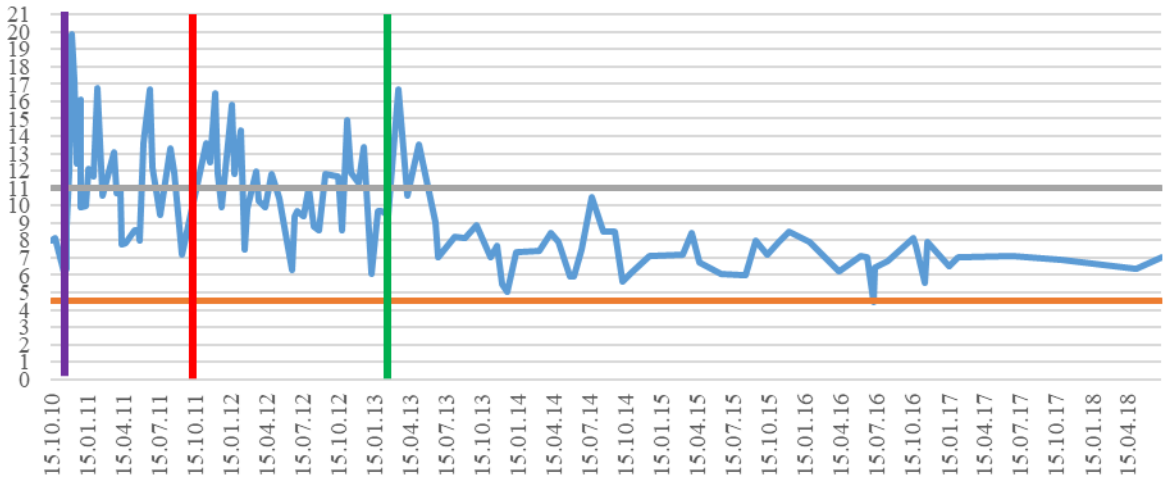


Рис. 1 – Диаграмма изменения абсолютного содержания лейкоцитов

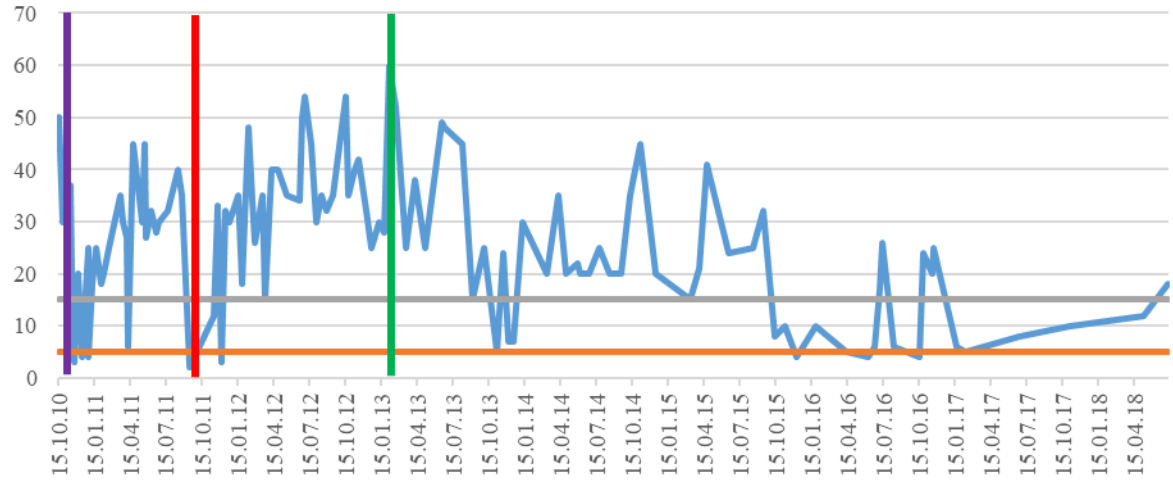


Рис. 2 – Диаграмма изменения скорости оседания эритроцитов

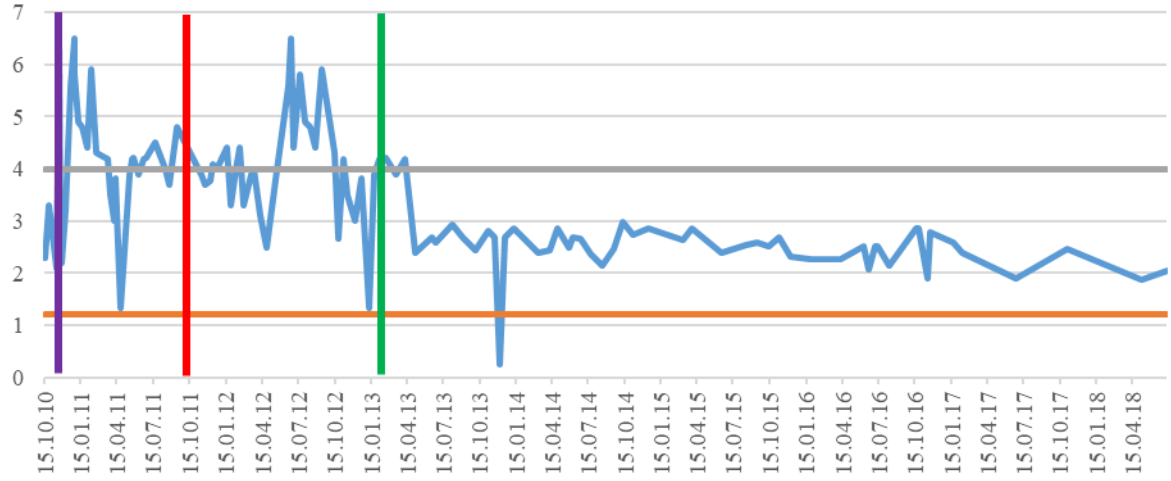


Рис. 3 – Диаграмма изменения абсолютного содержания лимфоцитов

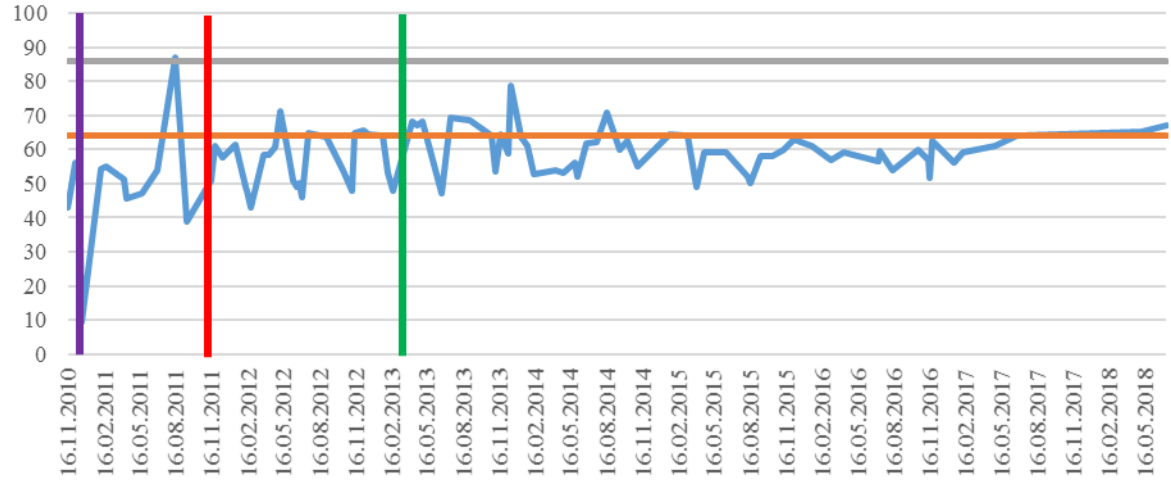


Рис. 4 – Диаграмма изменения общего белка

Пакет MS Excel является наиболее распространенным программным продуктом в современных медицинских учреждениях. Возможно, что использование пакетов MATLAB или STATISTICA дало бы больше результатов и позволило бы выполнить расширенный анализ [4], однако это повлекло бы за собой дополнительные затраты на приобретение вышеназванных программных продуктов. Таким образом, использование MS Excel наиболее актуально и удобно [5]. Кроме того, предложенная нами методика не требует глубоких знаний программирования. Несмотря на достаточно простой анализ, заключающийся в сравнении измеренных показателей с референсными значениями, данное исследование может быть использовано врачами в клинической практике не только для данного заболевания. Такая возможность рассматривалась нами и нашими коллегами ранее [6].

В заключении можно сказать, что применение данной методики в течении некоторого длительного времени позволяет собрать обширную статистику влияния различных препаратов на организм пациентов с гломерулонефритом. Программа позволяет упростить сбор и анализ данных необходимых для качественного лечения. Система результатов, представленная в таком виде создана не только для узких специалистов, но и для врачей общей практики, контролирующих ход течения болезни, что в свою очередь упрощает процесс назначения препаратов и наблюдения за их эффективностью. Данное исследование необходимо производить с определенной периодичностью с целью создания максимально актуальной картины лечения гломерулонефрита.

ЛИТЕРАТУРА

Козинец, Г.И. Анализы крови и мочи. Клиническое значение / Г.И. Козинец. – 2-е изд., доп. и перераб. – Москва: Практическая медицина, 2008. – 152 с.

Дмитриева, М.В. Малоиммунный гломерулонефрит с полулуниями: клинико-морфологический и прогностический анализ / М.В. Дмитриева, Т.А. Летковская, К.А. Чиж, З.Н. Брагина // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2018. – Т. 17, № 6. – С. 64–76.

Автономова, О.И. Корреляционный анализ показателей цитокинового профиля и иммунного статуса у больных гломерулонефритом / О.И. Автономова // Теоретические и практические проблемы современной медицины. Сборник научных трудов по итогам научно-практической конференции, посвященной 55-летию БУ «Центральная городская больница» Минздравсоцразвития Чувашии. – 2015. – С. 14–16.

Мороз, К.А. Применение современных пакетов прикладных программ для анализа биомедицинской информации / К.А. Мороз, Г.Л. Кузнецов, А.А. Трембицкий // Промышленные АСУ и контроллеры. – 2012. – № 3. – С. 18–21.

Рякина, Д.А. Использование пакета MS EXCEL для обработки данных научно-исследовательских работ / Д.А. Рякина, В.В. Линг // Проблемы формирования единого пространства экономического и социального развития стран СНГ (СНГ-2018). Материалы ежегодной Международной научно-практической конференции. – 2018. – С. 417–421.

Мороз, К.А. Разработка программы для интерпретации результатов анализа биологических материалов человека / К.А. Мороз, Ю.Г. Пергунова, Т.Е. Николаенко // Молодой исследователь Дона. – 2019. – № 1 (16). – С. 68–70.

УДК 328

ЭКДИЗОНОВЫЙ РЕЦЕПТОР НАСЕКОМЫХ-ВРЕДИТЕЛЕЙ КАК МИШЕНЬ ДЛЯ ФАРМАКОФОРНОГО ПОИСКА НОВЫХ ИНСЕКТИЦИДОВ

М.С. Кондратьев

Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

Разработка новых, высокоэффективных, и при этом селективных (экологически безопасных) инсектицидов остается актуальной задачей для агрокультуры и биотехнологии. При выборе мишеней для избирательного действия на организмы насекомых-вредителей, таких как белокрылки (*Aleyrodidae*), особо привлекательными выглядят экдизоновые рецепторы членистоногих. Это белки, которые взаимодействуют с экдизоном, стероидным гормоном, отвечающим за линьку и метаморфоз насекомых [1]. Ингибирование этого процесса представляется достаточным для подавления активности вредителей.

Любопытно, что стероидные соединения с активностью экдизона вырабатывается и самими растениями – предполагается, что они синтезируют экдизоны как раз для защиты от насекомых, поскольку в большом количестве эти соединения для членистоногих токсичны [2]. Хотя и считаясь БАДами (экстракт левзеи, *Rhaponticum*), фитоэкдизоны в настоящее время входят в практику, причем недавно было показано, что данные стероиды связаны с процессом старения и могут, отчасти, контролировать различия в продолжительности жизни у насекомых, и вероятно у млекопитающих [3]. Изучение возможных механизмов действия экдизонсодержащих препаратов обуславливает актуальность нашей работы.

Объектами нашего компьютерного (*in silico*) исследования были выбраны стероидные лиганды, которые связывались с экдизоновым рецептором насекомых (*Aleyrodidae*), взятый из банка белковых структур (**1Z5X**). Вещества с тетрациклической системой гонана (стероиды) были выбраны по данным обзора литературы: альфа-экдизон, экдизон, андростендиол, понастерон-А, тестостерон-А и дигидротестостерон. Все расчеты были выполнены в пакете Autodock VINA 1.1.2 на 32-ядерном XEON-сервере с 64 гигабайтами памяти. Предварительная подготовка моделей структур была выполнена в пакете MGLTools 1.5.6.

В расчетах нами было воспроизведено экспериментально показанное связывание понастерона-А в соответствующем кармане экдизонового рецептора, и обнаружено, что там же (полная энергия связывания порядка 10 ккал/моль) связывается андростендиол, тестостерон, дигидротестостерон и, конечно, сам экдизон, тогда как его замещенное производное, альфа-экдизон, связывается в другой части глобулы с гораздо меньшим сродством (порядка 7 ккал / моль). Результаты работы позволяют провести направленную модификацию веществ стероидной природы или провести поиск их низкомолекулярных миметиков для ингибирования экдизонового рецептора насекомых.

ЛИТЕРАТУРА

Ахрем А.А., Левина И.С., Титов Ю.А., Экдизоны – стероидные гормоны насекомых, Минск, 1973
Хефтман Э., Биохимия стероидов, пер. с англ., М., 1972.
Tatar M. The neuroendocrine regulation of Drosophila aging // Experim. Gerontol. 2004. Vol. 39. P. 1745–1750.

УДК 577.2:616–006

АНАЛИЗ МУТАЦИОННОЙ НАГРУЗКИ ПРИ КАРОТИДНЫХ ПАРАГАНГЛИОМАХ

А.В. Снежкина[1], Е.Н. Лукьянова[1], М.С. Федорова[1], А.Ф. Садритдинова[1], Е.А. Пудова[1], Д.В. Калинин[1,2], А.Л. Головюк[1,2], В.С. Павлов[1], Г.С. Краснов[1], А.В. Кудрявцева[1]

[1] Институт молекулярной биологии им. В.А. ЭнгельгардтаРАН, Москва, Россия
[2] Национальный медицинский исследовательский центр хирургии им. А.В. Вишневского Минздрава России, Москва, Россия

Каротидные параганглиомы (КПГ) относятся к наиболее часто встречающимся параганглиомам головы и шеи (60 %). Эти опухоли имеют нейроэндокринное происхождение, высоко васкуляризированы и образуются из каротидного параганглия, располагающегося в области бифуркации сонной артерии. Согласно современной классификации Всемирной Организации Здравоохранения КПГ относят к опухолям с вариабельным потенциалом метастазирования (El-Naggar et al., 2017), что объясняется способностью к малигнизации и агрессивному течению (Tan et al., 1996; Kumari et al., 2017). До 30–40 % параганглиом ассоциированы с наличием герминальных мутаций в одном или нескольких онко-ассоциированных генах.

Большинство наследственных случаев КПГ связаны с мутациями в генах *SDHx*, кодирующих субъединицы сукцинатдегидрогеназы (митохондриальный комплекс II) (Bayley et al., 2010; Hensen & Bayley, 2011; Hensen et al., 2011). В этих генах также обнаружены и соматические мутации (Zhikrivetskaya et al., 2017). Несмотря на имеющиеся данные, молекулярно-генетические особенности КПГ остаются не до конца изученными. Кроме случаев заболевания, ассоциированных с мутациями в генах *SDHx*, часто встречаются опухоли с неясной генетической картиной. При этом любые КПГ склонны к метастазированию, биомаркеры агрессивных форм не найдены.

Нами проведено исследование мутационной нагрузки при КПГ. Следует отметить, что в силу редкости данного заболевания, собрать репрезентативную выборку для проведения молекулярно-генетических исследований представляет большую сложность. Благодаря сотрудничеству с Институтом хирургии им. А.В. Вишневского, в котором наблюдаются и лечатся пациенты с КПГ, нами сформирована уникальная и единственная в России коллекция каротидных параганглиом, которая состоит из архивных образцов опухолей. Однако для этих образцов недоступны парные нормальные ткани, полученные от тех же пациентов. Поэтому при генетическом исследовании этих образцов необходимо проводить корректировку алгоритма анализа данных.

В работе использовались 52 образца каротидных параганглиом – опухолевые ткани, заключенные в парафиновые блоки (FFPE). Выделение ДНК из образцов проводили с использованием High Pure FFPET DNA Isolation Kit (Roche, Швейцария). Далее осуществляли подготовку экзомных библиотек с помощью набора Nextera Rapid Capture Exome Kit фирмы Illumina (США). Высокопроизводительное секвенирование проводили в режиме парных прочтений (76 + 76) на приборе NextSeq 500 System (Illumina) на базе ЦКП «Геном» ИМБ РАН (http://www.eimb.ru/rus/ckp/ccu_genome_c.php). Покрытие для каждого образца составляло не менее 300x. Данные секвенирования доступны в ресурсе NCBI Sequence Read Archive (BioProject PRJNA411769).

Биоинформатический анализ результатов секвенирования выполнен в среде R. С помощью программ FASTQC (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/) и Trimmomatic (Bolger et al., 2014) проведена оценка качества полученных прочтений и их очистка. Удалены последовательности адаптеров и нуклеотиды с качеством ниже Q20. Далее с помощью программного пакета BWA проведено картирование чтений на референсный геном человека GRCh37/hg19 (Li & Durbin, 2010). С помощью набора утилит SAMtools проведен анализ выравниваний (Li et al., 2009; Li, 2011). Идентификация мутаций выполнена с использованием программы freebayes (Garrison & Marth, 2012), фильтрация вариантов – с помощью vcffilter пакета vcflib (https://github.com/vcflib/vcflib#vcflib). Аннотацию мутаций проводили с использованием SnpSift пакета snpEff (Cingolani et al., 2012). В качестве информационных ресурсов использовали следующие базы данных: dbSNP, dbNSFP, ClinVar, MutationTaster, SIFT, PolyPhen-2, LRT, FATHMM, PhastCons, PhyloP, 1000 Genomes Project, ExAC, COSMIC, GO, ConsensusPathDB и OMIM. Мутационную нагрузку рассчитывали, как число соматических потенциально «вредных» мутаций на мегабазу (Mb) кодирующих областей генов. Для удаления потенциальных герминальных вариантов исключали все мутации, встречающиеся в базах данных 1000 Genomes Project и ExAC (наиболее строгий параметр). Кроме того, из анализа исключали все мутации, которые встречались в экзоме нормальных тканей лимфатических узлов и крови, полученных от больных КПГ (данные секвенирования экзома отдельно взятых больных с КПГ 2016–2018 гг., для которых доступны образцы нормальных тканей).

Число потенциальных соматических мутаций после фильтрации по базам данных 1000 Genomes Project и ExAC оказывается явно завышенным. Дальнейшая фильтрация герминальных вариантов с помощью данных экзома нормальных тканей больных КПГ улучшает результат – среднее значение мутационной нагрузки составило 6–8 вариантов на мегабазу кодирующих областей генов (от 2/Mb до 10,5/Mb). Кроме того, экзом нормальных тканей лимфатических узлов также подготавливали из FFPE образцов. Это позволило учесть варианты, связанные с нарушением целостности ДНК в процессе обработки формалином и исключить из анализа исследуемой выборки КПГ. Однако такой подход все же не позволяет исключить все герминальные варианты. Этот подход исключает 96–98 % или более герминальных вариантов, но оставшиеся 2–3 % мутаций могут превосходить по количеству соматические. Для более точного расчета необходимы парные образцы нормальных тканей, полученные от тех же больных КПГ.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17–75–20105).

ЛИТЕРАТУРА

El-Naggar A.K., Chan J.K.C., Grandis J.R., Takata T., Slootweg P.J. (2017) Classification of Head and Neck Tumours. Fourth edition. World Health Organization. 9, 348.

Tan K.L., Mah P.K., Rajasoorya C., Sim C.S., Chia F.K. (1996) Paraganglioma with pulmonary metastases: a case report. ANNALS Academy of Medicine Singapore. 25(4), 592–595.

Kumari K., Jain D., Kumar R., Mohan A., Kumar R. (2017) Metastatic carotid body paraganglioma of lungs and lymph nodes: Unsuspected diagnosis on EBUS-TBNA. Diagnostic Cytopathology. 45(4), 327–332.

Bayley J.P., Kunst H.P., Cascon A., Sampietro M.L., Gaal J., Korpershoek E., Hinojar-Gutierrez A., Timmers H.J., Hoefsloot L.H., Hermsen M.A., Suarez C., Hussain A.K., Vriends A.H., Hes F.J., Jansen J.C., Tops C.M., Corssmit E.P., de Knijff P., Lenders J.W., Cremers C.W., Devilee P., Dinjens W.N., de Krijger R.R., Robledo M. (2010) SDHAF2 mutations in familial and sporadic paraganglioma and phaeochromocytoma. Lancet Oncology. 11, 366–372.

Hensen E.F., Bayley J.P. (2011) Recent advances in the genetics of SDH-related paraganglioma and pheochromocytoma. Familial Cancer. 10, 355–363.

Hensen E.F., Siemers M.D., Jansen J.C., Corssmit E.P., Romijn J.A., Tops C.M., van der Mey A.G., Devilee P., Cornelisse C.J., Bayley J.P., Vriends A.H. (2011) Mutations in SDHD are the major determinants of the clinical characteristics of Dutch head and neck paraganglioma patients. Clinical Endocrinology. 75, 650–655.

Zhikrivetskaya S.O., Snezhkina A.V., Zaretsky A.R., Alekseev B.Y., Pokrovsky A.V., Golovyuk A.L., Melnikova N.V., Stepanov O.A., Kalinin D.V., Moskalev A.A., Krasnov G.S., Dmitriev A.A., Kudryavtseva A.V. (2017) Molecular markers of paragangliomas/pheochromocytomas. Oncotarget. 8, 25756–25782.

Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics. 30, 2114–2120.

Li H., Durbin R. (2010) Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. Bioinformatics. 26, 589–595.

Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R., Genome Project Data Processing S. (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. Bioinformatics. 25, 2078–2079.

Li H. (2011) A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. Bioinformatics. 27, 2987–2993.

Garrison E., Marth G. (2012) Haplotype-based variant detection from short-read sequencing. arXiv. 1207.3907 [q-bio. GN].

Cingolani P., Platts A., Wang le L., Coon M., Nguyen T., Wang L., Land S.J., Lu X., Ruden D.M. (2012) A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of Drosophila melanogaster strain w1118; iso-2; iso-3. Fly (Austin). 6, 80–92.

УДК 328

THE PROPERTIES OF MIRNA INTERACTION WITH 5' AND 3' UTR MRNA GENES HAVING NUCLEOTIDE REPEATS

A.M. Belkozhayev, R.E. Niyazova

Al-Farabi Kazakh National University, Faculty of Biology and Biotechnology, Almaty, Republic of Kazakhstan

Several diseases are caused by above – threshold expansion of certain trinucleotide repeats occurring in a protein-coding or non-coding region [1]. miRNAs are regulators of the expression of genes involved in the development of nucleotide repeat disorders. The expression of many genes is regulated by the binding of their mRNA with miRNA, so it is required to identify which candidate genes of nucleotide repeat disorders and to what extent can interact with miRNA.

In this work we have been studied the characteristics of miRNAs binding sites located in 5' UTR and 3' UTR mRNA genes having nucleotide repeats.

miRNA binding sites were predicted by the MirTarget program, which determines: a) the start of the initiation of miRNA binding to mRNAs; b) the localization of miRNA binding sites in 5' UTRs, CDSs and 3' UTRs of the mRNAs; c) the free energy of interaction miRNA and the mRNA (ΔG, kJ/mole); d) the schemes of nucleotide interactions between miRNAs and mRNAs [2].

The nucleotide sequences of human genes mRNAs have been downloaded from NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Nucleotide sequences of human 2567 miRNAs have been downloaded from the miRBase database (http://mirbase.org).

100 candidate genes with nucleotide repeats have 897 miRNAs binding sites in the 5'UTR and 3'UTR mRNA. The ΔG/ΔGm values equal to 87 % or more. From this results only 19 miRNAs have binding sites in 20 mRNAs of genes with a free interaction energy greater than -120 kJ/mol.

Binding sites of 11 miRNAs have been found in 5'UTR mRNAs of 13 candidate genes: *ABCC1, ADNP, ATP11B, ACADM, ARID3A, ASXL1, ARID1A, ARHGAP17, ASH1L, ASTN2, ARRB1, ANKRD11* and *AMFR*. The mRNAs of *ARL4C, ADARB1, ATXN7L1, ACSL6, AKT2, AGPAT6* and *APBB1IP* genes have ten miRNAs binding sites in 3'UTR.

Only three genes of the 20 candidate genes with a free interaction energy greater than -120 kJ/mol predicted as targets of two or more miRNAs: *APBB1IP* (miR-4763–3p, miR-3960, miR-328–5p); *ASTN2* (miR-4763–3p, miR-4707–5p); *AGPAT6* (miR-1273d, miR-1226–5p). Among miRNAs that bind with high energy to mRNA genes with nucleotide repeats, we choose four miRNAs that have binding sites in mRNAs of two or more genes: miR-619–5p *(ACSL6, AKT2*); miR-6089 (*ACADM, ARID3A, ASXL1*); miR-4787–5p (*AGPAT6, ARHGAP17, ASH1L*); miR-4763–3p (*APBB1IP, ASTN2*).

The mRNAs of *AGPAT6, ARHGAP17* and *ASH1L* genes having nucleotide repeats (GGAGUU**GCCGCCGCCGCC**CCCAC)$_{GCC4}$, (GGG**CCGCCGCCG**CCA**CCGCCG**C)$_{CCG5}$ and (GGAGCU**GCCGCCGCCACCGCC**GC)$_{GCC4}$ in 3’ and 5’ UTRs are a targets of miR-4787–5p. The obtained results of the mRNA of *ASXL1* and *ARID1A* genes indicated that the miR-6089 and miR-6081 bind with (**CCGCCGCCG**CCCCUCCCCCACCGCC)$_{CCG3}$/ (GGCGCCUCG**GCCGCCGCCGCCGCC**U)$_{GCC5}$ repeats in 5’ UTR. miR-3960 and miR-1908–3p bind with mRNA of *APBB1IP* and *ARRB1* genes in sites with (CCC**CCGCCGCCGCCGCCG**CC)$_{CCG5}$ and (**CGGGGGCGGCGGCGGCGG**CCGG)$_{CGG5}$ repeats in 3’ UTR and in 5’UTR, respectively.

mRNAs of non-polyglutamine disorders genes (*ATXN10, AFF2, CNBP, DMPK, FMR1, FXN, JPH3* and *PPP2R2B*) have 202 miRNAs binding sites in 5'UTR and 3'UTR. The ΔG/ΔGm values equal to 87 %. *AFF2* and *FMR1* mRNAs bind with miR-3960 and miR-4258 in regions with nucleotide repeat sequences. miR-3960 and miR-4258 bind with (**GCCGCCGCCGCCGCCGCCGCC GCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCC**)$_{GCC15}$ and (**CGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG CGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG**)$_{CGG19}$ repeats with ΔG/ΔGm values equal or more than 85 % in 5’UTR.

Thus, miRNAs binding sites with mRNA genes of having nucleotide repeats have been predicted. Studying the binding characteristics of miRNA and genes will help identify associations of miRNAs with genes with nucleotide repeats for recommending for the diagnosis of nucleotide repeat expansion disorders.

REFERENCES

Dumitrescu L., Popescu B. MicroRNAs in CAG Trinucleotide Repeat Expansion Disorders // CNS & Neurological Disorders – Drug Targets (Formerly Current Drug Targets – CNS & Neurological Disorders), Volume 14, Number 2, 2015, pp. 176–193(18).

Ivashchenko A., Berillo O., Pyrkova A., Niyazova R. MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes // Bioinformation. – 2014. – Vol.10. – N7. – P. 423–427.

УДК 57.05; 58.01; 581.1

CHARACTERISTICS OF INTERACTION OF MIRNAS WITH MRNA GENES OF HEAT STRESS TRANSCRIPTION FACTORS

A.K. Rakhmetullina, A.T. Ivashchenko

Scientific Research Institute of biology and Biotechnology Problems, Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

Heat stress transcription factors (HSF) play a key role in plants response to several abiotic stresses by controlling the expression of stress-responsive genes, such as heat shock proteins [1, 2]. In recent years, the important role of miRNAs in regulating the expression of many plant genes has been established [3, 4]. However limited studies has been reported for the association of miRNA with the expression of plant HSF genes. In the present work, the task is to determine the characteristics of the interaction of miRNA with the mRNA genes of the HSF family Arabidopsis thaliana, Oryza sativa, Triticum aestivum, Zea mays. The nucleotide mRNA sequences of the HSF family were taken from Plant Transcription Factor Database v4.0 (http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/index.php; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/). miRNAs were borrowed from miRBase v. 22 (http://www.mirbase.org/). The search for miRNA target genes was carried out in the MirTarget program [5, 6]. This program defines the start of miRNA binding sites with mRNA; the localization of miRNA binding sites in the 5’ – untranslated region (5’UTR), the protein-coding region (CDS) and the 3’ – untranslated region (3’UTR) of mRNA; the free energy of hybridization (ΔG, kJ/mole) and schemes of nucleotide interactions between miRNA and mRNA. The miRNA binding sites were selected to have the ΔG/ΔGm ratio of more than 85 %, taking into account the ΔG value and miRNA length.

Table 1 shows the characteristics of the miRNA binding sites in the mRNA of the HSF genes of *A. thaliana, O. sativa, T. aestivum, Z. mays. A. thaliana* is a model plant organism for modern molecular research and we found binding sites between miRNA and mRNA of their target genes. The binding of 428 ath-miRNAs to mRNA of 24 HSF genes of *A. thaliana* was studied. Only 14 genes were targets for 18 miRNAs. miR5021–5p and miR5658–5p had three target genes with a ΔG/ΔGm value from 85 % to 91 %. Two miRNAs of the miR172c, d-3p family, were bound with mRNA of the *AT5G03720.1* gene. The remaining miRNAs had only one target genes. The miRNA binding sites were located in 5'UTR, CDS and 3'UTR mRNA HSF genes of *A. thaliana*.

Table 1 – Characteristics of miRNA binding sites in mRNA of *A. thaliana, O. sativa, T. aestivum, Z. mays* HSF genes

Gene	miRNA	Start of site, nt	Region	ΔG, kJ/mole	ΔG/ΔGm, %	Length, nt
Arabidopsis thaliana						
AT4G11660.1	miR5021–5p	215	5'UTR	-89	91	20
AT4G18880.1	miR415–5p	752	5'UTR	-96	90	21
AT4G17750.1	miR5631–3p	728	CDS	-93	90	21
AT4G18870.1	miR827–3p	877	CDS	-93	90	21
AT1G46264.1	miR834–3p	653	CDS	-100	89	21
AT5G16820.1	miR4245–3p	591	CDS	-87	87	21
AT1G67970.1	miR5021–5p	227÷230	CDS	-85	87	20
AT3G63350.1	miR5021–5p	590	CDS	-85	87	20
AT5G03720.1	miR5658–5p	1067	CDS	-89	87	21
Oryza sativa						
LOC_Os06g35960.1	miR5075–3p	547	CDS	-113	91	21
LOC_Os06g36930.1	miR5077–5p	486	CDS	-96	90	19
LOC_Os10g28340.1	miR529a-3p	47	5'UTR	-96	90	20
LOC_Os08g36700.1	miR5075–3p	974	CDS	-110	90	21
LOC_Os01g53220.1	miR5809–3p	233	CDS	-104	89	20
LOC_Os08g43334.1	miR2907a, b, c, d-3p	987	CDS	-117	89	22
LOC_Os09g28200.1	miR2925–5p	1071	CDS	-100	89	19
LOC_Os02g29340.1	miR164d-5p	76	5'UTR	-102	87	21
LOC_Os09g28354.1	miR169d-5p	1053	CDS	-98	87	21
LOC_Os10g28340.1	miR1862f, g-3p	758	CDS	-87	87	20
LOC_Os05g45410.1	miR2097–3p	896	CDS	-98	87	22
LOC_Os03g12370.1	miR396e-5p	1042	CDS	-96	87	21
LOC_Os03g63750.1	miR530–3p	538	CDS	-100	87	21
LOC_Os01g43590.1	miR2102–5p	616	CDS	-106	88	20
LOC_Os03g53340.1	miR2102–5p	961	CDS	-106	88	20
LOC_Os06g36930.1	miR2102–5p	395	CDS	-106	88	20
LOC_Os09g35790.1	miR2102–5p	937	CDS	-106	88	20
LOC_Os03g53340.1	miR414–5p	1525	CDS	-98	88	21
LOC_Os07g44690.1	miR5075–3p	302	CDS	-108	88	21
LOC_Os08g43334.1	miR5075–3p	1397	CDS	-108	88	21
LOC_Os09g28200.1	miR5075–3p	292	CDS	-108	88	21
LOC_Os09g28354.1	miR5075–3p	199	5'UTR	-108	88	21
LOC_Os09g35790.1	miR5075–3p	1410	CDS	-108	88	21
Triticum aestivum						
TRAES3BF071100100CFD_t1	miR9778–5p	39	CDS	-100	89	21
TRAES3BF021000010CFD_t1	miR9676–5p	41	CDS	-104	87	22
Traes_4BL_B64C157DC.1	miR9657b, c-3p	651	CDS	-102	87	21
Zea mays						
GRMZM2G301485_P01	miR164a-3p	488	CDS	-102	91	21
GRMZM2G118453_P01	miR164a-3p	215	5'UTR	-100	89	21
GRMZM2G089525_P01	miR172c-5p	1181	CDS	-93	88	20
GRMZM2G179802_P01	miR164d-3p	1214	CDS	-96	88	20
GRMZM2G002131_P01	miR169c, r-5p	1102	CDS	-102	87	21
GRMZM2G173090_P01	miR164f-3p	687	CDS	-102	87	21
GRMZM2G173090_P01	miR167d-3p	1473	3'UTR	-110	87	23

The quantitative characteristics of 738 osa-miRNAs binding to mRNA of 25 HSF family genes of *O. sativa* were established. 21 genes were under the control of miRNA. 47 miRNAs were bound to mRNAs HSF, of which the largest number of binding sites had miR5075–3p. It bound to mRNA of nine genes *(LOC_Os04g48030.1, LOC_Os05g45410.1, LOC_Os06g35960.1, LOC_Os07g44690.1, LOC_Os08g36700.1, LOC Os08g43334.1, LOC Os09g28200.1, LOC Os09g28354.1, LOC Os09g35790.1)* with free energy from -106 kJ/mole to -113 kJ/mole and ΔG/ΔGm value from 86 % to 90 %. miR2102–5p had binding sites

in mRNA of six genes with ΔG/ΔGm value from 86 % to 88 %. miR5809–3p interacted with mRNA of three genes (*LOC Os01g53220.1, LOC Os06g35960.1, LOC Os07g44690*) with a ΔG/ΔGm value of 85 %-89 %. Two miRNA of the miR1846a, b-3p family, were bound with mRNA of *LOC_Os04g48030.1, LOC Os08g43334.1, LOC Os09g28200.1, LOC Os09g28354.1* genes. Each miRNA of miR1428e, f, g-5p, miR169b, c, d-5p, miR1862f, g-3p, miR2907a, b, d-3p, c-5p, miR5539a, b-5p, miR814a, b, c-5p had one binding site in the mRNA of *the LOC Os09g35790.1, LOC Os09g28354.1, LOC Os10g28340.1, LOC Os08g43334.1, LOC_Os05g45410.1, LOC_Os03g63750.1* genes, respectively. miR529a-3p, miR530–3p, miR535–5p, miR5819–5p, miR6249a, b-5p had two binding sites in the mRNA of the HSF genes. miR1435–5p, miR164d-5p, miR2091–5p, miR2097–3p, miR2863b-3p, miR2866–5p, miR2870–3p, miR2924–3p, miR2925–5p, miR396e-5p, miR3982–5p, miR414–5p, miR5076–3p, miR5077–5p, miR5338–5p, miR5530–5p, miR5544–3p, miR5820–3p, miR5837.2–5p had only one target gene. The miRNA binding sites were located in 5'UTR and CDS mRNA HSF family genes of *O. sativa*.

To identify miRNAs that are targets genes of the HSF transcription factor family, a search was made for the binding sites of 125 tae-miRNAs with the mRNA of 51 genes of the *T. aestivum* HSF family. As a result of the search, it was found that six genes of the HSF family were targets of eight miRNAs.

miR5384–3p, miR9654b-3p, miR9657a, b, c-3p, miR9670–3p, miR9676–5p, miR9778–5p interacted with the mRNA of these genes. miR9654b-3p had binding sites in the mRNA of *Traes_5AL_16AD8DEEC.1, Traes_5BL_8D23DFA4A.1* genes. Three miRNAs of miR9657a, b, c-3p family, were bound with mRNA of the *Traes_4BL_B64C157DC.1* gene. miR5384–3p and miR9676–5p interacted with mRNA *TRAES3BF021000010CFD_t1* gene. One miRNA was bound with mRNA of *Traes_1AL_A4B5C1474.2* and *TRAES3BF071100100CFD_t1* genes. All discovered miRNA binding sites in mRNA of HSF family genes of *T. aestivum* were located only in the CDS. In the absence of complete complementarity of the interaction of miRNA with mRNA of genes, unpaired nucleotides appear, which leads to decrease of free energy of interaction of miRNA and mRNA.

As a result of studying the binding of 325 zma-miRNAs to mRNA 28 HSF family genes of *Z. mays* it was revealed that only only 13 targets targets for 20 miRNA. With mRNA of target genes miR156j, l-3p, miR156k-5p, miR164a, d, f-3p, miR166k-5p, miR167d, g-3p, miR169a, b, c, p, r-5p, miR172b, c, d-5p, miR444a, b-3p, miR482–3p were interacted. The miR164a, d, f-3p family had the largest number of target genes (four). They bound to the mRNA of *GRMZM2G118453_P01, GRMZM2G301485_P01, GRMZM2G179802_P01, GRMZM2G173090_P01* genes with free energy of -96 kJ/mole to -102 kJ/mole and ΔG/ΔGm value from 87 % to 91 %. miR167d, g-3p interacted with the mRNA of three genes: *GRMZM2G173090_P01, GRMZM2G089525_P01* and *GRMZM2G164909_P01*. In the mRNA of the *GRMZM2G002131_P01* gene, binding sites for miR156j, l-3p and miR169a, b, c, p, r-5p were found. miR482–3p bound with the mRNA of two target genes – *GRMZM2G086880_P01* and *GRMZM2G115456_P01*. miR444a, b-3p, miR172b, c, d-5p, miR166k-5p had one target gene. The miRNA binding sites were located in 5'UTR, CDS and 3'UTR mRNA HSF genes of *Z. mays*.

In the present work using the bioinformatics approach the interactions of miRNA with mRNA of HSF genes *A. thaliana, O. sativa, T. aestivum, Z. mays* were studied. The results of the following research are: a) the miRNA binding sites for the mRNA genes of the HSF family of *A. thaliana, O. sativa, T. aestivum, Z. mays* were established; b) The miRNA binding sites are located in 5'UTR, CDS and 3'UTR mRNA target genes; c) specific miRNAs for different plant species were detected which affect the expression of heat stress transcription factors.

REFERENCES

1. Meng G., Jin-Hong L., Xiao M., De-Xu L., Zhen-Hui G., Ming-Hui L. The Plant Heat Stress Transcription Factors (HSFs): Structure, Regulation, and Function in Response to Abiotic Stresses // Front Plant Sci. 2016. V. 7. P. 1–13. DOI: 10.3389/fpls.2016.00114

2. Kotak S., Port M., Ganguli A., Bicker F., Koskull-Döring P. Characterization of C-terminal domains of Arabidopsis heat stress transcription factors (Hsfs) and identification of a new signature combination of plant class A Hsfs with AHA and NES motifs essential for activator function and intracellular localization. Plant J. 2004. V. 39. P. 98–112. DOI: 10.1111/j. 1365–313X.2004.02111.x

3. Bari A., Sagaidak I., Pinskii I., Orazova S., Ivashchenko A. Binding of miR396 to mRNA of Genes Encoding Growth-Regulating Transcription Factors of Plants // Russian Journal of Plant Physiology. 2014. V. 61. P. 807–810. doi: 10.1134/S1021443714050033

4. Bari A., Orazova A., Ivashchenko A. miR156 – and miR171-binding sites in the protein-coding sequences of several plant genes // BioMed Res. Int. 2013. V.10. P. 1–7. http://dx.doi.org/10.1155/2013/307145

5. Ivashchenko A., Pyrkova A., Niyazova R., Alybayeva A., Baskakov K. Prediction of miRNA binding sites in mRNA // Bioinformation. 2016. V. 12. P. 237–240. DOI: 10.6026/97320630012237

6. Ivashchenko A., Berillo O., Pyrkova A., Niyazova R., Atambayeva S. MiR-3960 binding sites with miRNA of human genes // Bioinformation. 2014. V. 10. P. 423–427. DOI: 10.6026/97320630010423

УДК 577.218

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ MIRNA С CDS MRNA ГЕНОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В РАЗВИТИИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО

О.Ю. Юрикова, Ш.А. Атамбаева, А.Т. Иващенко

НИИ проблем биологии и биотехнологии, КазНУ им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

Рак легкого является наиболее распространенным видом рака во всем мире. Согласно информации базы данных GLOBOCAN в 2018 году зарегистрировано 1,76 миллионов смертей от рака легкого [1]. По гистологическому строению различают два основных типа рака легкого: мелкоклеточный рак легкого и немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ). На НМРЛ приходится 85 % всех случаев рака легкого [2]. В 2015 г. ВОЗ была опубликована классификация рака легкого, в которую были внесены изменения, связанные с молекулярной патологией рака легкого [3]. Актуальным является установление молекулярных механизмов регуляции экспрессии генов при патологии для ранней диагностики и эффективного лечения заболеваний. Изучение роли miRNA в патогенезе НМРЛ имеет большие перспективы. Анализ экспрессии этих miRNA может быть использован для ранней диагностики НМРЛ, прогнозирования эффективности различных стратегий лечения и в персонализированной терапии [4]. Установлено, что miRNA связываются с mRNA в 3'-нетранслируемых областях (3'UTR), 5'-нетранслируемых областях (5'UTR) и белок-кодирующих последовательностях (CDS) [5,6]. Целью данной работы был поиск miRNA, имеющих сайты связывания в CDS mRNA генов, участвующих в развитии НМРЛ. На основе *in silico* анализа предложены эффективные ассоциации miRNA и генов, вовлечённых в НМРЛ.

МЕТОДЫ

Была создана база данных нуклеотидных последовательностей 115 генов, участвующих в НМРЛ. С помощью программы MirTarget в CDS мРНК исследуемых генов были предсказаны сайты связывания (СС) для 2565 miRNA из miRBase и 3701 miRNA из Londin et al. [7]. Программа MirTarget, определяет следующие характеристики: а) начало СС miRNA с mRNA; б) локализация СС miRNA в 5'UTR, CDS и 3'UTR mRNA; в) свободная энергия взаимодействия, которая оценивается для всей нуклеотидной последовательности miRNA (ΔG, кДж/моль); г) схемы взаимодействий нуклеотидов между miRNA и mRNA. Для каждого СС установлено отношение ΔG/ΔGm (%) где ΔGm равна свободной энергии связывания miRNA с ее полностью комплементарной нуклеотидной последовательностью [8]. Из всех предсказанных СС miRNA, были отобраны только СС с величиной ΔG/ΔGm равной 86 % и более.

Сайты связывания одной miRNA и одной mRNA были обнаружены в CDS mRNA нескольких генов. По одному СС было выявлено между mRNA следующих генов и miRNA: *ACLY* и ID00494.5p-miR; *ALDH3B2* и ID01862.5p-miR; *ASNS* и miR-4279; *BAK1* и miR-324–3p; *CASP9* и miR- и 4747–3p; *CAV2* и ID01062.3p-miR; *CD163* и miR-4742–3p; *CDK6* и miR-1238–3p; *DLC1* и miR-34c-3p; *EHD1* и ID02783.5p-miR; *EIF4A2* и miR-5195–3p; *EN1* и ID00857.5p-miR; *GJA1* и ID02369.5p-miR; *IGF1R* и miR-1273a; *LIMK* и ID01216.3p-miR; *MLH1* и miR-6813–5p; *P4HB* и miR-3677–5p; *PIK3CB* и miR-4684–5p; *PLD1* и ID01759.3p-miR; *PRKCA* и ID01588.3p-miR; *PSCA* и ID01047.3p-miR; *PTPRZ1* и miR-6514–3p; *TAGLN* и ID02593.5p-miR; *TRIM22* и ID01052.3p-miR; *USP4* и ID02666.5p-miR. ΔG/ΔGm 16 из 25 выявленных одиночных СС равна 90 % и выше.

Кластеры сайтов связывания miRNA с mRNA генов, участвующих в НМРЛ. Несколько СС miRNA в mRNA некоторых генов расположены с наложением нуклеотидных последовательностей и образуют кластеры. Для кластеров рассчитана степень компактизации, которая равна отношению суммы длин всех СС miRNA в кластере к длине кластера в mRNA. Для гена *ADAM23* выявлен кластер из СС четырех miRNA с 334 по 363 нуклеотидов (нт) со степенью компактизации 2,9. Из данного кластера наивысшая величина энергии взаимодействия между mRNA и ID03064.3p-miR равна -136 кДж/моль и ID02769.5p-miR равна -129 кДж/моль. В mRNA *BRD4* обнаружены 14 СС miRNA, из которых ID01641.3p-miR и ID00296.3p-miR; miR-6872–3p и miR-3615 образуют кластеры с 3082 по 3108 нт и с 3983 по 4015 нт, соответственно. Свободная энергия взаимодействия ID01641.3p-miR и ID00296.3p-miR первого кластера с mRNA *BRD4* равна -132 кДж/моль и -136 кДж/моль. С mRNA *CCND1* связываются пять miRNA, СС четырех из них образуют кластер с 1018 по 1048 нт со степенью компактизации 3,0. Свободная энергия взаимодействия miRNA в кластере менее -120 кДж/моль. В mRNA *CHD4* найдены пять СС двух miRNA – 4 СС для ID00529.5p-miR и один СС для ID00777.3p-miR организованные в кластер с 648 по 677 нт. Наибольшее число СС miRNA в CDS mRNA генов, участвующих в развитии НМРЛ предсказано для генов

E2F3 и *MLL2*. Организация СС в mRNA этих генов различная – в *E2F3* СС расположены в кластерах, тогда как в *MLL2* выявлены СС без наложения нуклеотидных последовательностей. В CDS *E2F3* выявлены СС 42 miRNA, образующих четыре кластера. Взаимодействие одной miRNA из кластера с mRNA *E2F3* ограничивает доступность этого участка для связывания других miRNA этого кластера. Первый кластер из четырех одиночных СС с 371 по 416 нт имеет степень компактизации 2,0. С наибольшей свободной энергией в кластере взаимодействует ID02294.5p-miR. Второй кластер составлен из 75 СС 32 miRNA с 448 по 492 нт со степенью компактизации 37,7. Свободная энергия взаимодействия 13 miRNA с mRNA *E2F3* в этом кластере равна -125 кДж/моль и более. Некоторые miRNA этого кластера имеют больше одного СС. Так, для ID02294.5p-miR обнаружено два СС; для ID01804.3p-miR, ID02229.3p-miR, D01879.5p-miR и ID0206 4.5p-miR – по три СС; для ID00296.3p-miR, ID03151.3p-miR, ID01377.3p-miR и ID03367.5p-miR – четыре СС; для ID01702.3p-miR, ID00457.3p-miR и ID01873.3p-miR – пять, для ID00061.3p-miR – семь СС. Третий и четвертый кластеры содержат по три СС miRNA в положении с 530 по 583 и с 691 по 718 нт, соответственно. В CDS *MLL2* обнаружено 40 СС для 22 miRNA. СС 21 miRNA одиночные, miR-1322 содержит отдельно расположенные полисайты в mRNA *MLL2* с ΔG равной -87 ÷ -89 кДж/моль. Значение свободной энергии взаимодействия одиночных СС выше, чем у полисайтов. Нуклеотидные последовательности всех одиночных СС в mRNA *MLL2* не наложены друг на друга, за исключением miR-4675 и ID01562.3p-miR, которые образуют кластер с 12225 по 12259 нт. В mRNA *EGR1* обнаружен кластер из 14 СС семи miRNA с 455 по 529 нт со степенью компактизации 4,1. С наибольшей энергией с mRNA *EGR1* взаимодействуют *ID02585*.5p-miR (-125 кДж/моль) и ID03387.3p-miR (-127 кДж/моль). Значение ΔG ниже для полисайтов по сравнению с одиночными СС. Так, в кластере выявлены пять и четыре полисайта для ID01310.3p-miR и miR-1322 с ΔG -113 ÷ -117 кДж/моль и -89 ÷ -91 кДж/моль соответственно. Тогда как значение ΔG для одиночных сайтов в mRNA *EGR1* выше -121 кДж/моль. С CDS mRNA *GPC3* связываются 14 miRNA, 13 из них взаимодействуют с образованием кластера СС с 258 по 299 нт. Кластер составлен преимущественно из одиночных СС со степенью компактизации – 7,5. Шесть из 13 miRNA в кластере связываются с mRNA с выскоким значением ΔG: ID01804.3p-miR (-129 кДж/моль), ID01323.3p-miR (-127 кДж/моль), ID01041.5p-miR (-127 кДж/моль), ID00296.3p-miR (-138 кДж/моль), ID01702.3p-miR (-136 кДж/моль), ID01641.3p-miR (-134 кДж/моль). СС ID00564.5p-miR, ID01739.3p-miR и miR-4459 расположены в кластере в mRNA гена *KRT5* с 1896 по 1919 нт. В mRNA *MTA1* находятся 2 кластера из одиночных СС трех miRNA (D01524.3p-miR, ID03238.3p-miR, miR-6716–3p) с 406 по 459 нт. и двух miRNA (ID01702.3p-miR, ID01652.3p-miR) с 2271 по 2300 нт. Наивысшее значение ΔG среди всех miRNA, взаимодействующих с mRNA *MTA1* установлено для ID01702.3p-miR (-134 кДж/моль). В CDS mRNA гена *RXRB* выявлены 11 СС, восемь из которых – одиночные СС и три полисайта ID01310.3p-miR. Шесть из девяти miRNA связываются с mRNA *RXRB* с наложением нуклеотидных последовательностей, образуя кластер с 353 по 389 нт и степенью компактизации 5,1. Найдено десять miRNA, связывающихся с CDS mRNA гена *SHOX2*. СС восьми из десяти miRNA образуют кластер с 304 по 368 нт. За исключением одного одиночного СС для ID03387.3p-miR, кластер составлен из полисатов семи miRNA – ID01282.3p-miR (3 полисайта), ID03332.3p-miR (2 СС), ID03445.3p-miR (5 СС), ID01859.5p-miR (6 СС), ID01310.3p-miR (4 СС), ID00811.3p-miR (5 СС), ID03345.5p-miR (2 СС). Наивысшее значение ΔG равно -129 ÷ -132 кДж/моль у СС ID03332.3p-miR. Следовательно, при равных концентрациях восьми miRNA кластера, наиболее вероятно взаимодействие между mRNA *SHOX2* и ID03332.3p-miR. В CDS mRNA гена *SIAH2* найдено шесть одиночных СС, составляющих два кластера. Первый кластер состоит из СС двух miRNA с 383 по 422 нт, второй кластер из четырех СС с 466 по 495 нт. Из шести СС, три с высокой энергией взаимодействия: ID01106.5p-miR (-129 кДж/моль), ID02251.5p-miR (-125 кДж/моль) и ID02611.3p-miR (-129 кДж/моль). Кластеры, составленные из СС двух miRNA найдены в mRNA генов *B3GNT3* (ID01774.5p-miR и miR-4763–3p – 303 и 308 нт); *BCL3* (ID00107.3p-miR и ID02112.3p-miR); *BRD4* (2 кластера: ID01641.3p-miR и ID00296.3p-miR; miR-6872–3p и miR-3615); *CBLB* (ID01787.3p-miR и miR-4459); *CHD4* (ID00529.5p-miR и ID00777.3p-miR); *RP5* (ID01547.3p-miR и miR-4651); *MCM4* (ID00622.3p-miR и ID00491.5p-miR); *MLL2* (miR-4675 и ID01562.3p-miR); *PTPRN* (miR-6825–5p и miR-920; ID03231.5p-miR и ID00645.5p-miR); *RAF1* (miR-6808–5p и ID03405.3p-miR).

Пары miRNA с СС в нескольких генах. Были выявлены пары miRNA, которые связываются с mRNA нескольких генов. Так, СС для ассоциаций miR-3960, ID00296.3p-miR, ID01702.3p-miR, ID01041.5p-miR, ID03367.5p-miR, ID00522.5p-miR, ID01804.3p-miR, ID02187.5p-miR, ID03151.3p-miR выявлены в mRNA генов *E2F3* и *GPC3*. СС пары ID01641.3p-miR, ID00296.3p-miR также обнаружены в mRNA гена *BRD4*. Пара ID03332.3p-miR и ID01310.3p-miR имеет СС в mRNA генов *E2F3, RXRB* и *SHOX2*. В mRNA *EGR1, SHOX2* найдены СС для ID03445.3p-miR, ID01859.5p-miR, ID03387.3p-miR. ID01106.5p-miR, ID02611.3p-miR связываются с CDS mRNA генов *E2F3* и *SIAH2*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таблица 1 Характеристики сайтов связывания miRNA в mRNA генов, ассоциированных с НМРЛ со значением Δ*G* более -125 кДж/моль

Ген	miRNA	Начало СС (нт)	Δ*G* (кДж/моль)	Δ*G*/Δ*G*m (%)	Длина miRNA (нт)
ADAM23; 0,6	ID03064.3p-miR	334	-136	89	24
	ID02769.5p-miR	337	-129	94	22
	ID02260.5p-miR	383	-125	89	22
ARVCF; 6.5	ID02381.3p-miR	2051	-125	88	24
B3GNT3; 0.3	ID01774.5p-miR	303	-132	91	23
	miR-4763–3p	308	-132	93	24
BRD4; 12.8	ID01641.3p-miR	3082	-132	89	24
	ID00296.3p-miR	3083	-136	86	25
CDH5; 51	ID01428.3p-miR	2034	-127	88	24
E2F3; 3.9	ID02294.5p-miR	391	-129	88	24
	ID01895.5p-miR	448	-132	89	24
	ID01641.3p-miR	450	-129	87	24
	ID00296.3p-miR (4)	450 ÷ 462	-136 ÷ -140	86 ÷ 89	25
	ID01702.3p-miR (5)	450 ÷ 465	-132 ÷ -138	87 ÷ 92	24
	ID01041.5p-miR	452	-127	87	24
	ID00061.3p-miR (7)	452 ÷ 470	-119 ÷ -140	86 ÷ 95	22
	ID02294.5p-miR	452, 461	-127 ÷ -132	87 ÷ 90	24
	ID01804.3p-miR (3)	453 ÷ 462	-129	88	23
	ID01778.3p-miR	460	-129	87	24
	ID01879.5p-miR (3)	460 ÷ 466	-119 ÷ -125	87 ÷ 92	22
	ID02064.5p-miR (3)	460 ÷ 466	-125 ÷ -138	87 ÷ 96	23
	ID01106.5p-miR	465	-132	89	24
	ID02084.3p-miR	466	-132	87	24
	ID02538.3p-miR	468	-129	97	22
	ID01986.5p-miR	468	-125	87	24
	ID01574.5p-miR	553	-127	90	23
	ID01206.3p-miR	560	-125	88	23
	ID03332.3p-miR	691	-136	91	24
	ID02611.3p-miR	696	-134	97	22
EGR1; 148.2	ID02344.3p-miR	414	-125	87	24
	ID03387.3p-miR	467	-127	90	24
	ID02585.5p-miR	470	-125	87	24
GPC3; 79.3	ID01804.3p-miR	264, 268	-129	88	23
	ID01323.3p-miR	267	-127	94	22
	ID01041.5p-miR	271	-127	87	24
	ID00296.3p-miR	274	-138	88	25
	ID01702.3p-miR	274	-136	90	24
	ID01641.3p-miR	274	-134	90	24
MLL2; 8.6	ID01491.3p-miR	3300	-125	91	23
MTA1; 18.1	ID01702.3p-miR	2271	-134	89	24
POLE; 3.6	ID01291.3p-miR	1483	-125	87	24
PTPRN; 0	ID03231.5p-miR	2238	-129	91	24
RXRB; 24.5	ID03332.3p-miR	361	-129	87	24
	ID02761.3p-miR	361	-129	87	24
	ID02692.3p-miR	363	-129	92	23
SHOX2; 0.1	ID03332.3p-miR	310, 332	-129 ÷ -132	87 ÷ 89	24
	ID03345.5p-miR	323, 344	-123 ÷ -127	87 ÷ 90	24
SIAH2; 10	ID01106.5p-miR	398	-129	87	24
	ID02251.5p-miR	471	-125	92	22
	ID02611.3p-miR	473	-129	94	22
TARBP1; 6	ID00098.5p-miR	225	-127	90	23
	ID02908.3p-miR	393	-125	92	22
	ID03163.3p-miR	521	-127	88	24
	ID03387.3p-miR	861	-125	88	24
ZEB2; 12	ID02585.5p-miR	3768	-127	88	24

Помимо перечисленных выше ассоциаций одной miRNA с одним геном в качестве маркеров НМРЛ предлагается использовать ассоциации генов-мишеней, содержащие кластеры СС и соответсвующие miRNA. Из числа одиночных СС и полисайтов наиболее значимыми для дальнейшего использования в диагностике и терапии являются СС с высокими значениями свободной энергии взаимодействия от -125 кДж/моль и выше (Таблица 1). Наличие кластеров сайтов связывания miRNA в mRNA генов позволяет предположить, что miRNA могут конкурировать за связывание с mRNA. Поэтому для прогнозирования вероятности связывания miRNA с участком mRNA, содержащим кластер СС, необходимо оценить концентрации всех miRNA и уровень экспрессии их генов-мишеней. Чем больше степень компактизации кластера, тем выше конкуренция между миРНК за связывание с mRNA.

ЛИТЕРАТУРА

Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Mathers, C.; Parkin, D.M.; Pineros, M.; Znaor, A.; Bray, F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods // Int. J. Cancer 2019; 144: 1941–1953.

Zappa C, Mousa SA: Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances // Transl Lung Cancer Res 2016; 5: 288–300.

Inamura K. Lung cancer: understanding its molecular pathology and the 2015 WHO classification // Front Oncol. 2017; 7: 193.

Florczuk M, Szpechcinski A, Chorostowska-Wynimko J. miRNAs as Biomarkers and Therapeutic Targets in Non-Small Cell Lung Cancer: Current Perspectives // Target Oncol. 2017

Lytle J.R., Yario T.A., Steitz J.A. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5′UTR as in the 3′ UTR // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 2007; 104(23): 9667–9672. DOI:10.1073/pnas.0703820104.

Tay Y., Zhang J., Thomson A.M., Lim B., Rigoutsos I. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation // Nature. 2008; 455: 1124–1128. DOI:10.1038/nature07299

Londin E, Loher P, Telonis AG, Quann K, Clark P, Jing Y, et al. Analysis of 13 cell types reveals evidence for the expression of numerous novel primate – and tissue-specific microRNAs. Proc Natl Acad Sci U S A . 2015; 112(10): E1106–1115

Ivashchenko A., Berillo O., Pyrkova A., Niyazova R., Atambayeva S. MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes // *Bioinformation*. 2014; 10(7): 423–427. doi : 10.6026/97320630010423

УДК 543.068.8

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ КАК СРЕДСТВО ПРОГНОЗИРОВАНИЯ И ОПТИМИЗАЦИИ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Д.В. Сотников, Жердев А.В, Б.Б. Дзантиев

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

Иммунохроматографический анализ (ИХА) основан на движении жидкой пробы вдоль мембран, формирующих тест-полоску, под действием капиллярных сил, которое приводит к последовательному взаимодействию реагентов, нанесенных на разных участках мембран, и формированию специфических комплексов. Благодаря включению в состав рецепторных молекул окрашенного маркера данные комплексы проявляются в виде окрашенных полос.

Возможность определения целевых аналитов за 10–15 минут в одну стадию в пробах сложного состава сделала ИХА наиболее распространенным средством анализа во внелабораторных условиях. Однако теория функционирования таких систем разработана только для немногих частных случаев. Это связано, прежде всего, со сложностью учета влияния множества факторов на результаты анализа. Существующие аналитические модели ограничиваются рассмотрением кинетики протекающих в системе процессов в равновесных условиях, что для такого экспрессного метода анализа в большинстве случаев неправомерно, так как реакции не успевают приблизиться к равновесию. Учет неравновесности условий протекания реакций требует создания более корректных аналитических моделей, в настоящее время отсутствующих.

В нашей работе были созданынечисленные модели иммунохроматографического анализа в неравновесных условиях. Для получения такой модели было предложено использовать приближение необратимой реакции. Поскольку иммунохроматографический анализ является экспрессным методом (продолжительность 10–15 мин), а иммунное взаимодействие высокоаффинно (равновесие сильно

смещено в сторону образования комплекса), то в большинстве случаев за время анализа успевает диссоциировать лишь небольшая доля иммунных комплексов и предложенное приближение выполняется с высокой точностью. Критерий применимости такой модели: кинетическая константа диссоциации иммунного комплекса должна быть меньше 10^{-4} 1/с. Большинство взаимодействий антиген-антитело удовлетворяют данному критерию.

Предложенный подход был применен для создания математических моделей иммунохроматографического анализа в «сэндвич» и конкурентном форматах анализа, а также позволил впервые разработать модель иммунохроматографии в формате серодиагностики (определения специфических антител в крови). Предлагаемые модели могут стать эффективными инструментами для оценки влияния различных факторов на аналитические параметры иммунохроматографического анализа и прогнозирования общих закономерностей функционирования тест-систем.

Сравнение предложенных решений с описанными в литературе равновесными моделями ИХА [1, 2] показывает, что, что предложенные нами неравновесные модели подтверждают некоторые выводы равновесных моделей. В частности, подтверждается линейное повышение сигнала при повышении концентрации рецептора в аналитической зоне, а также вывод о возможности управления чувствительностью анализа за счет изменения концентрации маркера, конъюгированного со специфическими связывающими молекулами. В то же время предложенные нами модели позволяет оценить влияние на характеристики анализа большего набора параметров, например, кинетических констант ассоциации-диссоциации. Помимо этого, оценить влияние временных параметров можно только в неравновесных условиях. Таким образом, предложенные модели обладают более широким функционалом по сравнению с описанными ранее.

Исследования проведены при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 18–33–01048 мол_а).

ЛИТЕРАТУРА

Qian S., Bau H.H., A mathematical model of lateral flow bio-reactions applied to sandwich assays // Anal. Biochem., 2003. 322(1): p. 89–98.

Qian S.Z., Bau H.H., Analysis of lateral flow bio-detectors: competitive format // Anal. Biochem., 2004. 326: p. 211–224.

УДК 577.214

ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЙ МУТАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ПРОМОТОРА Т7: СВЯЗЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ И ФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ДНК

М.А. Орлов, Т.Р. Джелядин, А.А. Сорокин

Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН, Пущино, Россия

Узнавание промотора РНК-полимеразой в процессе транскрипции является фундаментальной проблемой молекулярной генетики. Несмотря на длительный интерес исследователей, эта область продолжает развиваться. С ней напрямую связана задача биоинформатики – предсказание положений промоторных областей [1]. Для исследования данных проблем используются ряд модельных систем, среди которых особую ценность имеет пара РНК-полимераза / нативный промотор бактериофага Т7. Ее привлекательность заключается в сочетании простоты организации и высокой специфичности. При этом несмотря на исключительно близкую последовательность нуклеотидов нативных промоторы генома Т7 распознаются избирательно с переключением транскрипции между различными классами (соответствуют этапам жизненного цикла фага). Таким образом, значительная разница между функциональными свойствами промоторов Т7 не может определяться единичными или даже отсутствующими заменами консенсусной последовательности. Объяснением мо́жет служить участие определяющихе ДНК-белковые взаимодействия физико-химических свойств. Ранее показано, что профили электростатического потенциала (ЭП) имеют паттерны, отличающие временные классы (II и III) промоторов Т7 [2]. Аналогичные результаты получены для SIDD (stress-induced destabilization of the duplex) – уровня дестабилизации ДНК при изменении суперспирализации [3].

В настоящее время методы высокопроизводительного секвенирования нового поколения (NGS) предоставили возможность получить исчерпывающую информацию о связи первичной структуры, физико-химических свойств и промоторной активности ДНК. С этой целью проводят исчерпывающий мутационный анализ, как, например в работе [4].

Используя доступную и быструю методику на основе NGS, авторы получили 7847 вариантов консенсусного промотора T7. Такие промоторные варианты имели от 1 до 10 замен; для для них была оценена промоторная активность (как соотношение уровней транскрипта РНК и ДНК). Полученные объемные данные подтвердили многие представления о значении отдельных положений промоторной последовательности и ее областей, которые ранее были получены трудоемкими исследованиями. В данной работы мы провели дальнейший анализ данных [4], выявив согласованность в изменениях отдельных пар оснований промоторных последовательностей и функциональных областей промотора T7. В частности, выявлена высокая согласованность мутаций (их совместное присутствие в отдельном промоторном варианте) для петли специфичности (specificity loop of binding region). Область инициации транскрипции (в которой происходит открытие дуплекса) характеризуется наименьшим количеством замен, которые при этом редко сочетаются между собой. Таким образом, внесенные замены отчетливо различаются между участками промотора, выполняющими различные роли. Далее при рассмотрении как положения, так и типа замены (учитывает, какой нуклеотид является исходным и на какой нуклеотид он заменен) выявлено, что замена N (любой другой нуклеотид) на A превалируют над другими и предпочтительны на всей длине промотора. Замены N на C предпочтительны только в петле узнавания области связывания (recognition loop of binding region), но не в известных низким содержанием GC-пар других регионах.

Далее полный набор из 7847 вариантов промоторов был разделен на группы в соответствии с тем, какие функциональные области затронуты изменениями. Рассмотрены следующие три группы с мутациями 1) исключительно в области связывания, 2) исключительно в области плавления и 3) одновременно в обеих. Установлено, что группа 2 включает исключительно малое число промоторных вариантов (46 против свыше тысячи и свыше шести тысяч в других). При этом все промоторы группы 2 характеризуются значительной активностью. При рассмотрении последовательностей этой группы выявлена ее неоднородность. Подгруппа 2a включает 14 промоторов и характеризуется консервативностью в большинстве положений, но не по -2 нуклеотиду. Данное положение у группы 2a представляется допускающим любой нуклеотид в названном положении. Активность группы очень велика: все эти 14 вариантов входят в число 75 наиболее активных из всех 7847 полного набора. Группа 2b интересна тем, что при существенной активности она имеет слабую консервативность большинства положений области плавления.

Рассмотрение группы 2a вызывает интерес к промоторным вариантам, имеющим точную консенсусную последовательность и случайный нуклеотид в положении -2. Все 4 таких варианта получены в [4] и высокоактивны. При расчете для таких последовательностей профилей электростатического потенциала [2] и склонностью к изгибам [5] установлены очень существенные изменения при замене в названной позиции. В случае электростатического потенциала замены T на A достаточно, чтобы характерный для промоторов класса II паттерн профилей перешёл в таковой для класса III (описаны ранее [2]). Замена на G, приводящая к изменению локального GC-состава, при этом не изменяет исходный профиль; замена на C даёт переходный случай. Профили склонности к изгибам при замене A на T инвертируется в области, прилегающей к положению -2 и имеют переходную форму в случае C и G в этом положении. Это указывает на возможную роль точечных замен по нуклеотиду -2 в специфическом узнавании промотора T7, что может иметь множество приложений в области синтетической биологии и биоинженерии.

ЛИТЕРАТУРА

Ryasik A., Orlov M., Zykova E., et al. Bacterial promoter prediction: Selection of dynamic and static physical properties of DNA for reliable sequence classification // Journal of Bioinformatics and Computational Biology. 2018. № 1 (16). С. 1840003.

Kamzolova S.G., Beskaravainy P.M., Osypov A.A., et al. Electrostatic map of T7 DNA: comparative analysis of functional and electrostatic properties of T7 RNA polymerase-specific promoters // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. 2013. № 8 (32). С. 1184–1192.

Орлов М.А., Камзолова С.Г., Рясик А.А., и др. Stress-induced duplex destabilization (SIDD) profiles for T7 bacteriophage promoters // Computer Research and Modeling. 2018. № 6 (10). С. 867–878.

Komura R., Aoki W., Motone K., et al. High-throughput evaluation of T7 promoter variants using biased randomization and DNA barcoding // PLOS ONE. 2018. № 5 (13). С. e0196905.

Brukner I., Sánchez R., Suck D., et al. Trinucleotide Models for DNA Bending Propensity: Comparison of Models Based on DNase I Digestion and Nucleosome Packaging Data // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. 1995. № 2 (13). С. 309–317.

УДК 578.5

МЕТОДЫ БИОИНФОРМАТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ВИРУСНЫХ МЕТАГЕНОМОВ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА

Е.В. Старикова, К.М. Климина, А.А. Хурумова, Д.С. Ульянов, Е.Н. Ильина

ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Москва, Россия

Появление методов метагеномного секвенирования сделало возможными анализ и аннотацию некультивируемых микроорганизмов – так называемой “тёмной микробной материи”, а также ранее не известных вирусов. С помощью методов вирусной метагеномики был открыт известный бактериофаг CrAssphage [1], присутствующий в кишечнике большинства людей из различных стран и континентов. Микробиом кишечника человека является одной из наиболее разнообразных по видовому составу микроорганизмов экологических ниш, при этом многие присутствующие в нём виды остаются неизученными.

Классические референсные подходы не позволяют в полной мере оценить видовое разнообразие вирусов, поскольку известные вирусные последовательности составляют, по разным оценкам, от 5 до 20 % секвенируемых вирусных метагеномов. Необходимо расширение используемых биоинформатических инструментов для аннотации новых вирусных последовательностей и лучшего понимания взаимосвязей между вирусами и бактериями в кишечном микробиоме.

Целью нашей работы являлось получение вирусных метагеномов здоровых добровольцев в двух временных точках и биоинформатический анализ полученных вирусных последовательностей.

Из образцов кала здоровых добровольцев, собранных в двух временных точках, была получена фракция вирусоподобных частиц (ВПЧ) путём фильтрации и ультрацентрифугирования в градиенте CsCl и последующей обработкой ДНКазой. Затем было проведено секвенирование тотальной ДНК очищенной фракции вирусоподобных частиц на секвенаторе Illumina HiSeq 2500.

Полученные прочтения подвергались предобработке и фильтрации. Прошедшие фильтрацию прочтения аннотировались программой для таксономической аннотации метагеномов KRAKEN [2], а также картировались на базу известных бактериофагов, а также на базу метагеномных вирусных последовательностей IMG/VR. В результате данного анализа было показано наличие ряда известных фагов бактерий родов *Escherichia, Cronobacter* и *Bacteroides*, а также неаннотированных вирусных последовательностей бактерий родов *Parabacteroides, Bacteroides, Faecalibacterium* и др. Прошедшие фильтрацию прочтения также собирались в контиги *de novo* с помощью метагеномных сборщиков megahit [3] и metaspades [4]. Из собранных контигов отфильтровывались бактериальные контаминанты на основании определения последовательностей 16S.

В результате сборки были получены предположительные вирусные контиги (как линейные, так и циклические) длиной до 109 Кб. Полученные вирусные контиги аннотировались инструментом CAT/BAT. Белковые последовательности, предсказанные для данных контигов, аннотировались с помощью скрытых марковских моделей (HMM) из базы ортологичных вирусных генов pVOG [5], а также с помощью скрытых марковских моделей, сконструированных нами для белков вирусных семейств, не представленных в базе pVOG.

Для выявления предположительных бактерий-хозяев нами было проведено соответствие вирусных контигов спейсерам из CRISPR-систем известных бактерий, в результате чего было установлено полное соответствие ряда последовательностей спейсерам из геномов бактерий родов *Bifidobacterium, Roseburia, Streptococcus, Coprococcus* и *Acinetobacter*.

Дальнейшее изучение вирусных метагеномов кишечника человека и расширение существующих биоинформатических баз (в том числе баз метагеномных вирусных последовательностей, скрытых марковских моделей вирусных белков, баз спейсеров CRISPR-систем) поспособствует лучшему пониманию взаимосвязей между вирусами и бактериями в кишечнике человека.

Работа была проведена при поддержке гранта РФФИ № 19–34–80033

ЛИТЕРАТУРА

Dutilh B.E. et al. A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes //Nature communications. 2014. Т. 5. С. 4498

Wood D.E., Salzberg S.L. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments //Genome biology. 2014. Т. 15. №. 3. С. R46.

Li D. et al. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph // Bioinformatics. 2015. Т. 31. №. 10. С. 1674–1676.

Nurk S. et al. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler //Genome research. 2017. Т. 27. №. 5. С. 824–834.

Grazziotin A.L., Koonin E.V., Kristensen D.M. Prokaryotic virus orthologous groups (pVOGs): a resource for comparative genomics and protein family annotation //Nucleic acids research. 2016. С. gkw975.

Секция 5. Клеточная и генетическая инженерия

УДК 57.084.1, 577.29, 577.2.08, 615.22

РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ И ПОЛУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНО ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ЛИНИЙ ВОЛЬФИИ БЕСКОРНЕВОЙ (WOLFFIA ARRHIZA) СОДЕРЖАЩИХ ГЕНЫ БЕЛКОВ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

П.А. Хватков[1,3], А.Н. Шведова[1], М.А. Чернобровкина[1], А.С. Пушин[1,2], А.П. Фирсов[1,2], Л.А. Шалойко[2], С.В. Долгов[1,2,3]

[1] Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия
[2] Филиал института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Пущино, Россия
[3] Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН, Ялта, Россия

В течение последних 30 лет было разработано много технологий для наработки рекомбинантных белков. Их получают из клеток бактерий, дрожжей, млекопитающих и насекомых. Однако такие системы имеют ряд существенных недостатков. В клетках прокариот не происходят посттрансляционная модификация и правильная укладка полипептидных цепей многих эукариотических белков. Клетки животных лишены подобных недостатков, но их использование в качестве биопродуцентов ограничено высокой себестоимостью получаемых рекомбинантных белков. В клетках высших растений происходят гликозилирование и фолдинг белков, сходные с таковыми у млекопитающих. В отличие от животных, растительные клетки не содержат в своём составе патогенных для человека вирусов и микроорганизмов и могут служить безопасным источником рекомбинантных белков медицинского назначения. При выборе растения-продуцента чужеродных белков важно учитывать исходное содержание белка в растении. Растения семейства Рясковые удваивают биомассу популяции за 1–6 суток, подобно водорослям и грибам, а содержание белка достигает 45 % от сухой массы.

До 2001 г. работы по биотехнологии ряски проводились преимущественно с видом Lemna gibba. С начала 21 века были получены первые трансгенные растения рода Lemna, а с конца первого десятилетия 21 века и первые трансгенные растения рода Spirodela, экспрессирующие рекомбинантные белки фармацевтического и ветеринарного назначения. Однако, несмотря на возросший интерес к растениям семейства Lemnaceae и активные исследования в этом направлении, в настоящий момент нет ни одного сообщения о стабильной трансформации растений рода Wolffia. Wolffia arrhiza – наиболее эволюционно продвинутое вторично примитивно организованное растение из семейства Lemnaceae. W. arrhiza отличается от других рясок отсутствием корневой системы, что позволяет культивировать ее в биореакторах глубинным способом, что в свою очередь способно существенно увеличить рентабельность производства рекомбинантных белков.

Таким образом, целью наших исследований стала разработка протокола стабильной генетической трансформации растений Wolffia arrhiza для последующего использования в качестве экспрессионной платформы для наработки рекомбинантных терапевтических белков.

В ходе исследований использовали асептическую популяцию целых растений вольфии. В качестве эксплантов для трансформации мы использовали кластерные структуры вольфии прошедшие 4-х месячную прекультивацию на среде Шенка-Хильдебрандта (SH), содержащей 1 % маннитола, 1 % сорбитола, 2 % глюкозы в качестве источников углерода и дополненной 5,0 мг/л 2,4–D совместно с 0,5 мг/л BA. В экспериментах по агробактериальной трансформации мы использовали 3 бактериальных штамма: AGL0 содержащий конструкцию pCamGFP (Рис. 1А), AGL0 содержащий конструкцию pVec035 (1В), CBE21 содержащий конструкцию pBINmGFP5ER (Рис. 1Б) и EHA105 содержащий конструкцию pVec035.

Трансформацию проводили методом кокультивации эксплантов с суспензией агробактерии (OD_{600} = 0,4–0,6). Для инокуляции 200 г. растительного материала помещали в колбу с 500 мл инокулюма и выдерживали ее в течение 30 мин на орбитальном шейкере (100 об/мин). Подсушенные в потоке воздуха ламинар-бокса экспланты переносили на бумажные фильтры, помещённые на поверхность среды SH в чашках Петри, и кокультивировали на свету в течение 72 ч. Далее экспланты отмывали жидкой безорганической средой SH с добавлением 300 мг/л тиментина (Tm) и переносили на среды для культивирования эксплантов и элиминации агробактерии (Tm 100 мг/л). Длительность каждого пассажа составляла 2 недели.

В ходе проведения 34 экспериментов по агробактериальной трансформации было установлено, что добавление в среду канамицина способно вызывать витрификацию трансгенной ткани, что в свою очередь приводит к потере пролиферативной активности и снижению эффективность трансформации вольфии. Результативная селекция трансгенных линий происходила в присутствии в среде гигромицина (Hyg) в концентрации 5 мг/л.

В результате проведенных исследований мы пришли к выводу, что для успешной трансформации необходимо на протяжении первых 2 недель культивирования протрансформированных эксплантов присутствие в среде 2,4–D совместно с BA. При более продолжительной культивации эксплантов на средах с добавлением 2,4–D совместно с BA стабильной трансформации вольфии не наблюдалось. В предыдущих исследованиях нами отмечалось, что возможно осуществить преимущественную пролиферацию каллусных клеток путем добавления в среду для культивирования пиклорама (PCL). Однако, основываясь на данных результативных экспериментов, можно отметить, что стабильная трансформация вольфии происходила при использовании на первом пассаже схожих по своему составу сред: 1–SH среда + 2,4–D 2,5 мг/ л + BA 1,0 мг/ л + Hyg 5,0 мг/ л + Tm 100,0 мг/л и 2–SH среда + 2,4–D 1,5 мг/ л + BA 1,5 мг/ л + Hyg 5,0 мг/ л + Tm 100,0 мг/л.

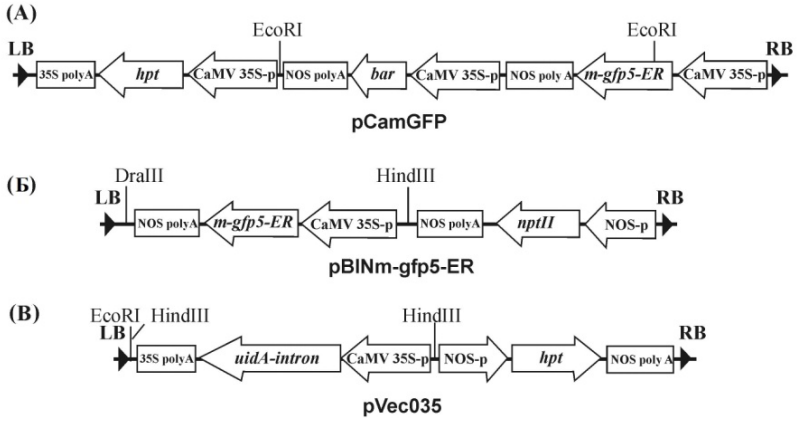


Рис. 1. Структура Т-ДНК конструкций, где: А – pCamGFP, Б – pBINmGFP5ER и В – pVec035.

В результате были получены 4 трансгенные популяции вольфии, которым были присвоены следующие наименования: Sb5/2, Nb5/2, Nb7/2 и Co1/3. Согласно Саузерн-блот анализу все полученные линии (Sb5/2, Nb5/2, Nb7/2и Co1/3) содержали геномную вставку гетерологичной ДНК: линия Sb 5/2 содержала ген hpt (интеграция гена gfp отсутствовала), линии Nb5/2, Nb7/2 и Co1/3 содержали гены uidA и hpt (Рис. 2). Все полученные линии были проанализированы на наличие экспрессии репортерных белков. Экспрессии GFP у линии Sb5/2 отмечено не было. По результатам GUS окрашивания, в котором линия Sb5/2 выступала в качестве контроля, установлено, что все линии с интеграцией Т–ДНК конструкции pVec035 экспрессируют фермент β-глюкуронидазу (Рис. 3А-В). Контаминации окрашивания в эксперименте обнаружено не было (Рис. 3Г и 3Д).

Исходя из полученных данных, было произведено более детальное изучения влияния регуляторов роста на эффективность трансформации вольфии. В данном эксперименте было задействовано 25 вариантов комбинаций регуляторов роста 2,4–D и BA (2,4–D в концентрациях 0,5–2,5 мг/л с шагом 0,5 мг/л совместно с BA в концентрациях 0,5 – 2,5 мг/л с шагом 0,5 мг/л) в трехкратной повторности по 65 чашек Петри (≈ 3250 эксплантов) каждый. Трансформацию проводили с использованием штамма EHA105 с интродукцией векторных конструкций pCamHIR и pCamGCSF, содержащих в себе целевые гены, кодирующие дисульфатогирудин-1 и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (ГКСФ) и селективный ген hpt. Гирудин является высоко специфическим прямым ингибитором тромбина, обнаруженным в слюнных железах медицинской пиявки (Hirudo medicinalis). ГКСФ является гормоном, стимулирующим формирование колоний белых кровяных телец в костном мозге. В результате было установлено, что наиболее высокая эффективность трансформации наблюдалась при культивировании эксплантов в течение первых двух недель на среде с добавлением 2,4–D 2,0–2,5 мг/л совместно с BA 2,0 мг/л. В ходе исследований получена 81 линия W. arrhiza, из них 34 линии с интеграцией гена ГКСФ человека и 47 линий с интеграцией гена дисульфатогирудина-1.

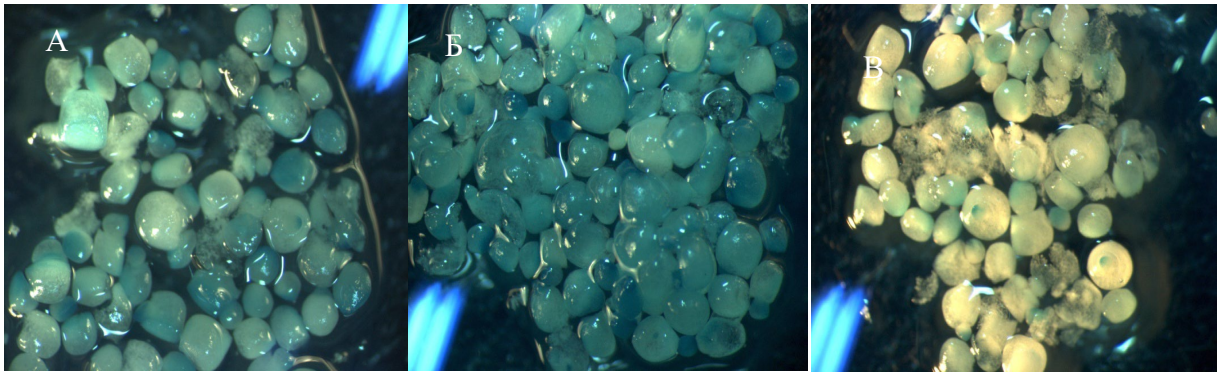


Рис. 2. Саузерн-блот анализ трансгенных растений W. arrhiza, содержащих Т-ДНК конструкций pVec035 и pCamGFP

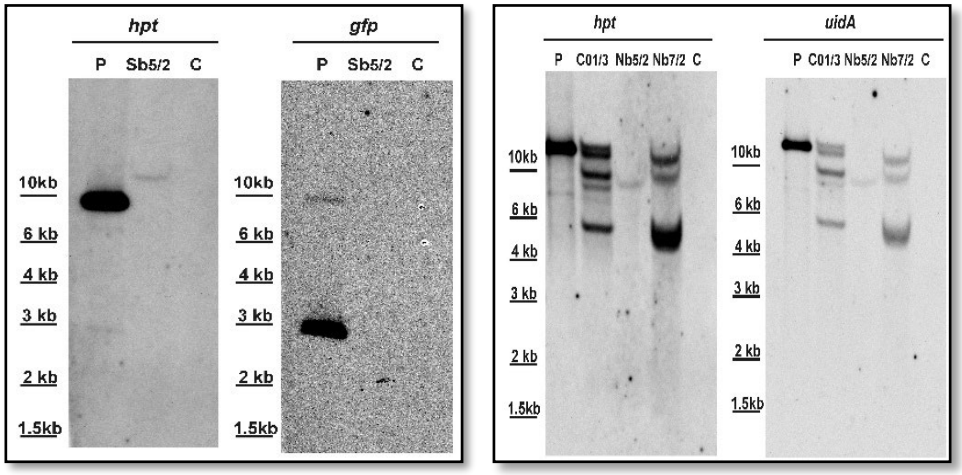


Рис. 3. Результат гистохимического GUS окрашивания, где А – линия Co1/3, Б – линия Nb5/2, В – линия Nb7/2, Г – линия Sb5/2 и Д – не трансгенный контроль.

В результате проведенного вестерн блоттинга и ИФА 34 линий вольфии содержащих в геноме последовательность гена ГКСФ человека были установлены 2 трансгенные линии (WG-04 и WG-32) эксперссирующие рекомбинантный белок ГКСФ на уровне порядка 30 мг/кг сырого веса.

УДК 601.4

ЦИТОМЕГАЛОВИРУС ИНДУЦИРУЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК THP-1 К ХИМИОТЕРАПИИ, ВЛИЯЯ НА МЕТАБОЛИЗМ ПОЛИАМИНОВ

[1] С.С. Емельянова, [2] Я.Ю. Чернорыж, [2] К.И. Юрлов, [3] Н.Ф. Закирова, [1] Г.Р. Виноградская, [1] В.Н. Вербенко

[1] Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, Гатчина, Россия
[2] НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия
[3] Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, РАН, Москва, Россия

Цитомегаловирус (ЦМВ) человека является представителем семейства Herpesviriadae, способного вызывать заболевания у людей. До 90 % взрослого населения инфицированы ЦМВ и имеют антитела к нему. ЦМВ не является общепризнанным онкогенным вирусом, однако исследования последних 15 лет показали высокую частоту выявления его ДНК и антигенов в злокачественных опухолях, [1], причем это не связано с гематогенной инфильтрацией, так как в окружающих тканях вирусные маркеры не обнаруживаются. Имеющиеся данные указывают на влияние ЦМВ-инфекции на метаболизм опухолевой клетки, способствуя онкогенезу. Показано также, что проникая в клетку, ЦМВ способен индуцировать антиапоптозную программу, препятствующую противоопухолевой терапии.

Лечение опухолевых заболеваний с помощью широко распространенного антибиотика доксорубицина (ДОКС) эффективно лишь у 40 % пациентов. Причины резистентности к нему в настоящее время до конца не изучены, не исключена и роль ЦМВ в развитии устойчивости опухолевых клеток к этому препарату. ЦМВ кодирует белки, воздействующие на внешний и внутренний пути активации апоптоза либо через прямое взаимодействие с соответствующими медиаторами, либо через влияние на экспрессию клеточных белков, вовлеченных в проведение сигналов смерти. Важным белком, направляющим клетку по пути гибели или выживания, является транскрипционный фактор семейства p53 – белок p73.

В отличие от широко известного онкосупрессора p53, повреждение которого отмечают в 50 % опухолей человека, мутации в гене p73 встречаются редко (1 % случаев) [2]. Во многих опухолях наблюдается даже суперэкспрессия белка p73. Ген p73 имеет сложную структурную организацию, которая позволяет экспрессироваться как онкосупрессорным, так и онкогенным изоформам. Механизм их образования связан с альтернативным сплайсированием 5’ – и 3’ – концов мРНК и использованием альтернативных промоторов. Показано, что укороченные изоформы p73 могут подавлять транскрипционную активность как TAp73 с полным трансактивирующим доменом, так и его гомолога p53, образуя с ними гетеротетрамеры. Таким образом, судьба клетки зависит от количественного соотношения этих изоформ [3]. Укороченные изоформы, транскрибируемые со второго промотора, не только контролируют активность p73 и p53, но и сами находятся под их контролем. Внутренний промотор (П2) содержит эффективный элемент для связывания p53/p73, что в условиях стресса индуцирует транскрипцию dNp73 и создает петлю обратной связи.

Равновесие между супрессорными и онкогенными изоформами может изменяться при ЦМВ-инфекции по неизвестному в настоящий момент механизму. В связи с этим актуальной проблемой является определение ключевых факторов, индуцируемых вирусом, которые влияют на судьбу опухолевых клеток и их связь с внутриклеточными молекулярными путями, участвующими в ответе опухолевой клетки на терапию.

Стоит отметить, что зависимая от p53/p73 активация П2-промотора противоречила бы проапоптотической роли этих белков в ответ на повреждения ДНК, если бы одновременно не индуцировалась быстрая и селективная деградация dNp73-изоформы. Показано, что медиатор убиквитин-независимой деградации белков антизим (AZ) может специфически связываться с dNp73. Активность AZ контролируется через полиамин-зависимый путь на трансляционном уровне. При генотоксическом стрессе происходит ряд изменений, приводящих к накоплению высших полиаминов (спермидина и спермина), которые переводят AZ в активную форму. Активированный антизим селективно помечает изоформу dNp73 и направляет ее на деградацию, давая тем самым полноразмерной изоформе TAp73 запустить апоптотическую программу [4]. Потенциальное участие ЦМВ в антизим-зависимом пути деградации dNp73 до настоящего момента не исследовано.

Ранее нами был показан защитный эффект ЦМВ в культуре лейкозных клеток THP-1, который возникал благодаря изменению баланса укороченной и полноразмерной изоформ белка p73 [5]. ЦМВ способствовал накоплению укороченной изоформы и блокировке развития апоптоза.

Для более подробного исследования участия полиаминового пути в антиапоптотическом эффекте ЦМВ, мы использовали MDL72.527, ингибирующий SMO и катаболический фермент ацетилполиамин оксидазу (APAO) в микромолярных концентрациях, которые не влияли на другие ферменты метаболизма полиаминов. Клетки THP-1 заражали ЦМВ (5 БОЕ/кл), через 4 часа добавляли ДОКС и / или MDL72.527. После 24 часовой инкубации выделяли мРНК и белки для анализа.

MDL72.527 приводил к гибели приблизительно 20 % клеток независимо от того, были они инфицированы ЦМВ или нет. Незараженные клетки THP-1, обработанные ДОКС, гибли в присутствии MDL72.527, в том же количестве, что и без него (80 %). Гибель инфицированных ЦМВ клеток THP-1 под воздействием ДОКС составляла 32,6 ± 6 %, дополнительная обработка MDL72.527 приводила к увеличению количества погибших клеток в три раза, что полностью отменяло защитный эффект вируса против ДОКС-индуцируемого апоптоза.

Для понимания механизма резистентности, вызываемой ЦМВ, представлялось интересным оценить влияние вируса на экспрессию основных ферментов полиаминового синтеза.

Полиамины – это низкомолекулярные органические соединения, необходимые для клеточного роста и развития у эукариот. При нормальных физиологических условиях их концентрация строго регулируется. В цикле полиаминов аминокислота орнитин превращается в диамин – путресцин с помощью лимитирующего скорость короткоживущего фермента – орнитиндекарбоксилазы (ODC). Путресцин превращается в высшие полиамины спермидин и спермин под действием спермидин / спермин синтаз. Спермин может быть превращен обратно в спермидин, а потом в путресцин с помощью катаболических ферментов спермидин (спермин) – N'ацилтрансферазы (SSAT) и APAO. Активность ODC контролируется с помощью антизима, который синтезируется полиамин-зависимым способом по принципу петли обратной связи. Az транскрипт имеет две перекрывающиеся открытые рамки считывания. В ответ на возрастание клеточного уровня полиаминов во время трансляции мРНК AZ происходит сдвиг рамки считывания на +1. Это приводит к образованию активного полноразмерного белка, который, в свою очередь, связывает ODC, препятствует ее олигомеризации и направляет мономеры на протеолиз, таким образом, препятствуя дальнейшему накоплению высших полиаминов.

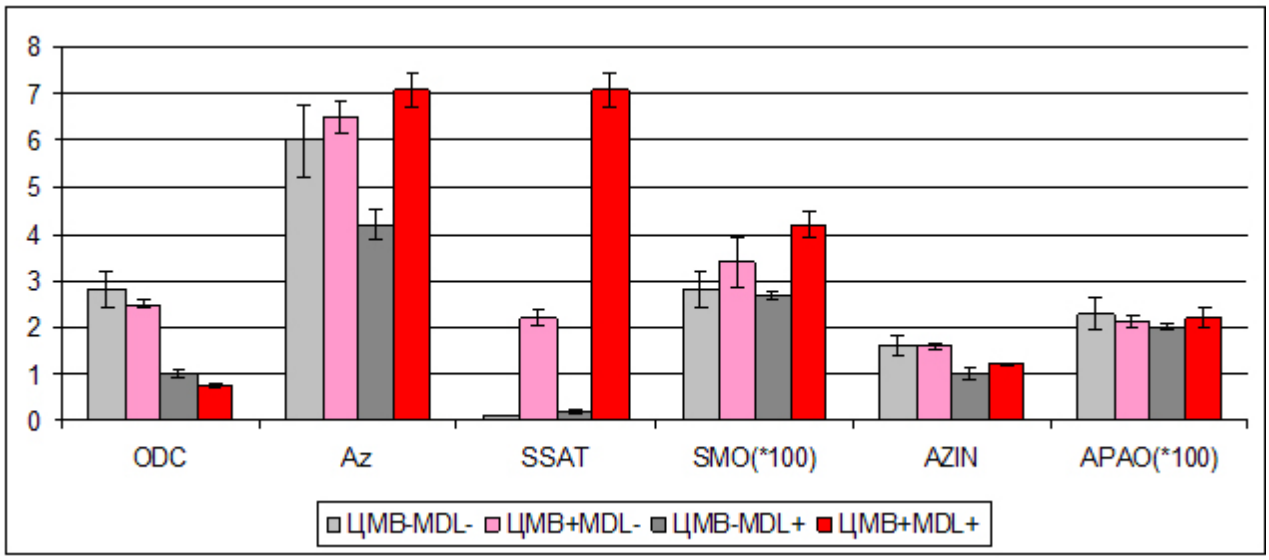


Рисунок 1. Анализ транскрипции генов ферментов полиаминового цикла в культуре THP-1. По вертикальной оси отложен относительный уровень мРНК генов ODC, AZ, SSAT, SMO (увеличенный в 100 раз), AZIN, APAO (увеличенный в 100 раз), нормированный на референсный ген GUS в неинфицированной культуре THP-1 (светло-серые столбики) при дополнительной обработке MDL72.527 (темно-серые столбики) и в ЦМВ-инфицированной культуре (розовые столбики), при дополнительной обработке MDL72.527 (красные столбики).

Действие ЦМВ на транскрипцию ферментов полиаминового цикла оценивали с помощью ОТ-ПЦР (рисунок 1). Из представленных результатов видно, что ЦМВ не оказывал никакого влияния на транскрипцию мРНК ODC и не изменял уровень экспрессии как самого антизима, так и его природного ингибитора азина. Не наблюдалось влияние вируса на катабалические ферменты – APAO и SMO, отвечающие за перевод высших полиаминов в низшие. В то же время было обнаружено влияние вируса на катаболический фермент SSAT, препятствующий накоплению высших полиаминов: ЦМВ увеличивал транскрипцию этого гена в 18 раз. Можно предположить, что увеличение экспрессии SSAT является механизмом, ингибирующим апоптоз, инфицированных клеток. В присутствии MDL72.527 ЦМВ также влиял только на транскрипцию мРНК SSAT, увеличивая ее в 35 раз, что в два раза больше, чем в случае без обработки ингибитором. Однако даже такое изменение оказалось недостаточным для смещения баланса полиаминов в сторону низших и остановки деградации укороченной изоформы белка p73 при ингибировании второго катабалического фермента APAO.

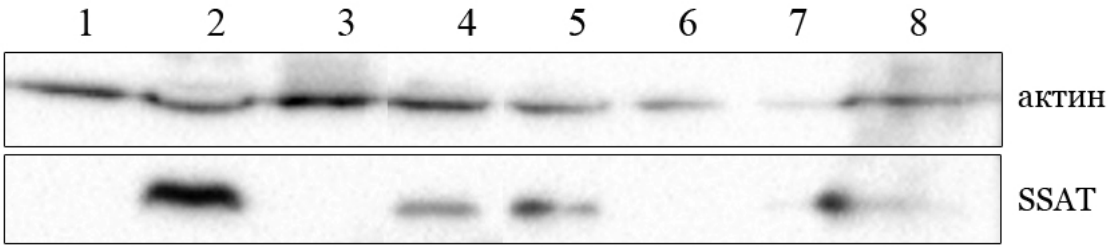
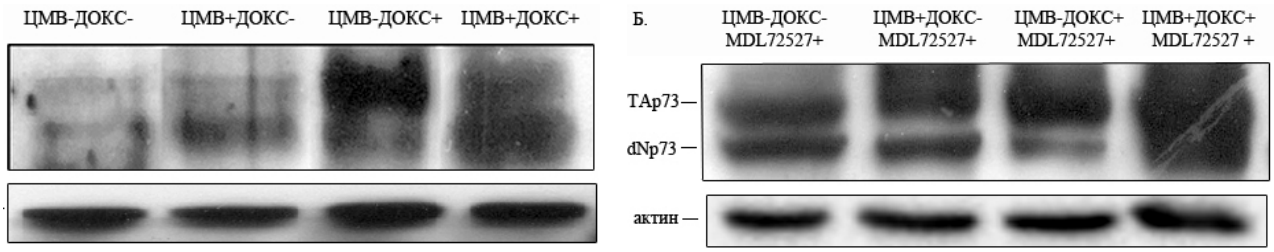


Рисунок 2. Выявления белка SSAT в культуре THP-1 с помощью иммуноблотинга. 1. ЦМВ+ДОКС-MDL72.527+, 2. ЦМВ+ДОКС+MDL72.527+, 3. ЦМВ-ДОКС-MDL72.527+, 4. ЦМВ-ДОКС+MDL72.527-, 5. ЦМВ-ДОКС+MDL72.527+, 6. ЦМВ+ДОКС-MDL72.527-, 7. ЦМВ+ДОКС+MDL72.527-, ЦМВ-ДОКС-MDL72.527–

Влияние ЦМВ на SSAT на белковом уровне оценивали с помощью иммуноблотинга (рисунок 2). Данный белок присутствует в клетках THP-1 на невысоком уровне, и чувствительность метода позволила выявить его лишь в клетках, обработанных ДОКС. В незараженной культуре THP-1, обработанной ДОКС, уровень SSAT был в 1,4 раза ниже, чем в зараженной культуре, что подтверждает гипотезу об увеличении количества этого фермента под действием ЦМВ. Дополнительная обработка MDL72.527 не изменяла этого соотношения.

Анализ влияния ДОКС и MDL72.527 на баланс изоформ белка p73 в инфицированных и неинфицированных клетках THP-1 осуществляли с помощью иммуноблотинга. Воздействие MDL72.527 приводило к превалированию полноразмерной изоформы над укороченной, что могло являться причиной наблюдаемой гибели 20 % клеток. При совместном применении с ДОКС в неинфицированных клетках THP-1 MDL72.527 практически не изменял баланс изоформ p73, поскольку он и так был существенно смещен в сторону полноразмерного белка TAp73. Воздействие ДОКС и MDL72.527 в зараженной культуре сдвигало отношение TAp73/dNp73 в сторону полноразмерной изоформы, что приводило к запуску апоптоза, заблокированного ранее вирусом (рисунок 3).

Представленные данные раскрывают один из возможных механизмов развития ЦМВ-индуцированной устойчивости опухолевых клеток THP-1 к ДОКС. Одной из мишеней вируса становится транскрипционный фактор семейства p53 – белок p73, баланс изоформ которого отвечает за клеточное выживание или гибель. Изоформа TAp73 отвечает за активацию апоптоза и арест клеточного цикла. Изоформа dNp73 обладает способностью блокировать основные онкосупрессорные пути, конкурируя с белками p53 и TAp73 за связывание со специфическими промоторами, и усиливать экспрессию антиапоптотических генов. Кроме того, изоформа dNp73 способна локализироваться непосредственно в месте повреждения ДНК и ингибировать активацию клеточного ответа на накопление двунитевых разрывов. Это может быть выгодно цитомегаловирусу, амплификация ДНК которого происходит по принципу катящегося колеса с нарезкой на фрагменты, которые нужно упаковать в частицы, не вызвав развитие апоптоза. В культуре THP-1 ЦМВ изменяет баланс TAp73/dNp73 на белковом уровне, смещая его в сторону накопления «выгодной» ему укороченной изоформы.



(А) (Б)

Рисунок 3. Выявление изоформ белка p73 с помощью иммуноблотинга. Соотношение полноразмерной (TAp73) и укороченной (dNp73) изоформ p73. А. Под действием ЦМВ и ДОКС Б. Под действием ЦМВ, ДОКС и MDL72.527. Через 28 часов после начала эксперимента.

Под действием апоптотических сигналов, индуцируемых ДОКС, в клетке происходит активация белка TAp73, которая по принципу петли обратной связи запускает транскрипцию со второго промотора. Одновременно индуцируются механизмы быстрой и селективной деградации dNp73-изоформы, например, через полиаминовый путь.

При индукции апоптоза активируется транскипционный фактор c-Jun, который ингибирует промотор гена катаболического фермента полиаминового синтеза APAO, что в норме должно приводить к накоплению высших полиаминов и активации антизима, перекрывающего полиаминовый цикл. Активированный антизим связывается с изоформой dNp73 и направляет ее на деградацию. ЦМВ препятствует накоплению высших полиаминов, увеличивая транскрипцию катаболического фермента полиаминового пути SSAT. В результате высшие полиамины переходят в низшие, активация антизима проходит менее эффективно и деградация dNp73 блокируется.

Использование прямого ингибитора APAO MDL72527 приводит к нарушению полиаминового цикла и сдвигу баланса в сторону высших полиаминов, активирующих деградацию dNp73 антизимом. При этом отношение TAp73/dNp73 сдвигается в сторону полноразмерной изоформы, а воздействие ЦМВ на SSAT оказывается недостаточным для защиты укороченной изоформы от деградации. Противоапоптотический эффект вируса аннулируется и устойчивость культуры THP-1 к химиотерапии исчезает.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) грант № 17–04–00812.

ЛИТЕРАТУРА

Duan Y. – L., Ye H. – Q., Zavala A.G.et al. Maintenance of Large Numbers of Virus Genomes in Human Cytomegalovirus-Infected T98G Glioblastoma Cells // J Virol. 2014; 88(7): 3861–3873.

Dötsch V. et al. P63 and p73, the ancestors of p53 // Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010; 2(9).

Engelmann D., Meier C., Alla V.et al. A balancing act: orchestrating amino-truncated and full-length p73 variants as decisive factors in cancer progression // Oncogene. 2015; 34: 4287 – 4299.

Bunjobpol W., Dulloo I., Igarashi K. et al. Suppression of acetylpolyamine oxidase by selected AP-1 members regulates DNp73 abundance: mechanistic insights for overcoming DNp73-mediated resistance to chemotherapeutic drugs // Cell Death and Differentiation. 2014; 21: 1240–1249.

Fedorova N.E., Chernoryzh Y.Y., Vinogradskaya G.R, Emelianova S.S. et al., Inhibitor of polyamine catabolism MDL72.527 restores the sensitivity to doxorubicin of monocytic leukemia Thp-1 cells infected with human cytomegalovirus // Biochimie. 2019; 158: P.82–89.

УДК 57.013

БИОМИМЕТИЧЕСКИЕ СТРУКТУРЫ ПЛЕНОК БИОСИНТЕТИЧЕСКОГО ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА

В.В. Воинова[1], Е.А. Акулина[1], А.А. Дудун[2], К.А. Меньших[1], А.П. Бонарцев[2], Д.В. Чеснокова[1], Т.К. Махина[2], Г.А. Бонарцева[2], И.Г. Чишанков[3], Т.М. Жданко[3], В.И. Куликовская[3], К.В. Шайтан[1], В.Е. Агабеков[3]

[1] Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
[2] Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт биохимии им. А.Н. Баха, Москва, Россия
[3] Институт химии новых материалов НАН Беларуси, Минск, Беларусь

ВВЕДЕНИЕ

Поли-3-оксибутират (ПОБ), основной полимер гомологичного ряда полиоксиалканоатов (ПОА) – наиболее известный микробиологический полиэфир, который является перспективной альтернативой биоразлагаемым синтетическим термопластикам и другим полимерам медицинского назначения. В отличие от природных полимеров (хитозан, альгинат, декстран, коллаген и т. д.) и химически синтезированных полимеров, ПОБ и его сополимеры получают биотехнологическим путем, который позволяет достичь высокой степени чистоты, задавать и контролировать физико-химические свойства биополимеров в узких пределах в процессе их биосинтеза. ПОБ является частично кристаллическим полимером, что значительно влияет на его основные свойства: термо-физические, механические свойства, скорость биодеградации, биосовместимость, а также нано- и микроструктуру изготовляемых на его основе изделий [1].

Перспективными материалами для клеточной и тканевой инженерии являются полимерные микроструктурированные пленки, размер пор в которых соизмерим с размером клеток [2]. Известно [2], что изменяя размер пор можно регулировать рост клеток на таких сетчатых структурах. Перспективным подходом к созданию упорядоченных микросеток с гексагональной симметрией ячеек является их получение путем «самоорганизации» микрокапель воды в жидкой полимерной пленке [3]. Данный подход заключается в обработке жидкой полимерной пленки, сформированной на какой-либо поверхности, влажным воздухом. Этот метод прост в практическом исполнении, не требует сложного и дорогостоящего оборудования и позволяет формировать полимерные структуры с регулируемым размером пор и степенью их упорядоченности.

Целью данной работы являлось получение пористых пленок на основе ПОБ методом «самоорганизации» микрокапель воды.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения ПОБ с заданными молекулярной массой использовали метод контролируемого биосинтеза с помощью высокоэффективного штамма-продуцента ПОБ Azotobacter chroococcum 7Б, для чего в культуральную среду добавляли регулятор молекулярной массы – 50 мМ ацетата натрия. Штамм-продуцент культивировали в течение 72. Процесс выделения и очистки полимера из биомассы штамма-продуцента включал экстракцию хлороформом, фильтрование, осаждение изопропиловым спиртом, очистку путем нескольких циклов растворения-осаждения и высушивание.

Величину молекулярной массы (ММ) ПОБ определяли методом капиллярной вискозиметрии и вычисляли по уравнению Марка – Хаувинка – Куна. Теплофизические характеристики ПОБ (температуры плавления и кристаллизации, теплоты плавления и кристаллизации) измеряли с помощью метода дифференциальной сканирующей калориметрии согласно. Температуру начала и максимума пика плавления или кристаллизации обозначали как $T_{пл.}^{0}$, $T_{пл.}^{пик.}$ и $T_{кр.}^{пик}$, соответственно. Кристалличность ПОА (Xc) рассчитывали согласно:

$$Xc = \Delta H_m(ПОА) / \Delta H^0_m(ПОБ) \times 100\ \%,$$

где ΔH^0_m(ПОБ) – теоретическое значение термодинамической энтальпии плавления, которая у 100 % кристаллического ПОБ могла составить 146.6 Дж/г, а ΔH_m(ПОА) – экспериментальная энтальпия плавления соответствующего образца ПОА.

Механические свойства пленок полимера (модуль Юнга (E) и удлинение при разрыве) определяли на универсальном динамометре Инстрон (Zwick Roell, Германия). Гидрофильность поверхности полимерных пленок оценивали, измеряя контактный угол смачивания, формирующийся между каплей воды и поверхностью полимерной пленки, с помощью цифрового угломера Contact Angle Meter 110 VAC (Cole-Parmer, США) [4].

Приём материалов статей по адресу: actbio@mail.ru

Получение микроструктурированных сетчатых пленок ПОБ осуществлялось следующим образом: каплю раствора полимера в хлороформе наносили на поверхность кремниевой подложки. Через 5–10 сек на полученную жидкую полимерную пленку действовали потоком воздуха с относительной влажностью 75 % и температурой 30 °С. Необходимая влажность воздуха создавалась путем его барботирования через насыщенный водный раствор хлорида натрия, температура которого регулировалась с помощью водяного термостата. Поток воздуха подавался перпендикулярно к поверхности жидкой полимерной пленки. Концентрацию раствора ПОБ, наносимого на подложку, варьировали от 10 до 50 мг/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

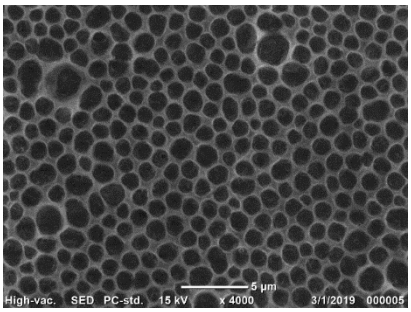
Физико-химические свойства ПОБ, полученного биотехнологическим путем представлены в таблице 1.

Таблица 1. Физико-химические свойства пленок ПОА.

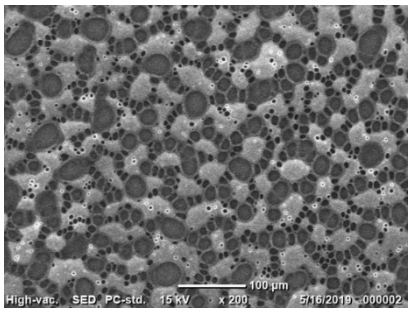
Образец	ММ,×10^3 г/моль	$T_{кр.}^{пик}$,°С	$T_{пл.}^{0}$/ $T_{пл.}^{пик}$, °С	X_c, %	Е, ГПа	Удлинение на разрыв, %	Контактный угол, °
ПОБ	364	87	159/176	65	2,0	4,5	60

Таким образом, полученный полимер обладает относительно высокой степенью кристалличности, жесткостью и гидрофобностью.

Установлено, что методом «самоорганизации» микрокапель воды из ПОБ можно сформировать сетчатые пленки, при этом их морфология зависит от концентрации полимера в растворе. Так, при использовании высоких концентраций (40 мг/мл) образуются пленки с размером ячеек 1–1,5 мкм (рис. 1а). Уменьшение концентрации ПОБ в растворе приводит к снижению упорядоченности структуры: пленка представляет собой сплошные полимерные «островки» размерами 20–40 мкм, которые соединяются порами диаметром 8–20 мкм (рис. 1б).



(а)



(б)

Рисунок 1. СЭМ-изображения пленок ПОБ, полученных из растворов в хлороформе с концентрацией 40 (а) и 10 (б) мг/мл

Таким образом, в данной работе показана принципиальная возможность формирования из ПОБ сетчатых пленок с различной морфологией. Полученные структуры являются перспективными для создания поверхностей с различной топографией с целью регулирования и исследования миграции, пролиферации и дифференцировки клеток разных типов, в частности, мезенхимальных стволовых клеток для клеточной и тканевой инженерии.

ЛИТЕРАТУРА

Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А., Решетов И.В., Шайтан К.В., Кирпичников М.П. Применение полиоксиалканоатов в медицине и природные функции поли-3-оксибутирата // Acta Naturae. 2019. V. 11. N. 41 P. 4–16.

Nishikawa et al. Fabrication of honeycomb film of an amphiphilic copolymer at the air–water interface // Langmuir. 2002. Vol. 18. P. 5734–5740.

Куликовская, В.И. Получение сетчатых микроструктурированных тонкопленочных материалов из нитроцеллюлозы // Материалы. Технологии. Инструменты. 2010. Т. 15. № 4. С. 84–87.

Bonartsev A.P., Zharkova I.I., Yakovlev S.G., Myshkina V.L., Mahina T.K., Voinova V.V., Zernov A.L., Zhuikov 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.

УДК 616–092.4

СОЗДАНИЕ 3D КЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДОВ НА МИКРОСФЕРАХ ИЗ ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА

К.А. Меньших, В.В. Воинова, А.П. Бонарцев

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Россия

Создание новых лекарственных соединений, обладающих противоопухолевым потенциалом, требует надёжных методов тестирования в доклинических условиях. К моделям для скрининга эффективности препаратов in vitro относят культуры клеток опухолей человека – 2D (монослойные) системы культур клеток и 3D системы.[1]

Трёхмерные системы клеточных культур – это своеобразное переходное звено между изучением рака и тестирований препаратов на клеточном уровне (в монослое) и в организме.[2] **Целью** данной работы являлось создание 3D клеточных сфероидов на микросферах из поли-3-оксибутирата (ПОБ). ПОБ зарекомендовал себя как перспективный биоматериал, находящий применение в самых разных областях биомедицины.[3] Для получения пористых микросфер с диаметрами 50–100 и более 100 мкм использовался метод «водная фаза / масляная фаза / водная фаза» (W/O/W) с последующим вымыванием порообразователя. В качестве пороборазователя был взят водный раствор карбоната аммония, поскольку он способен к термическому разложению до аммиака и углекислого газа.[4]

Выбор клеточной линии был обусловлен тенденциями частоты случаев заболевания различными видами рака головы и шеи в мире.[5] Для получения стабильных сфероидов клетки линии HEp-2 в суспензии совместно с пористыми микросферами из ПОБ переносили на лунки с покрытием из агарозы. В условиях постоянного перемешивания, температуры 37° и 5 % содержания CO_2 клетки культивировались совместно с микросферами в течение 14 суток со сменой среды каждые 2 дня. Динамика клеточного роста и деления в сфероидах отслеживалась посредством МТТ-анализа, измерением концентрации белка по Брэдфорду, а также оценивалась визуально с помощью конфокальной и сканирующей электронной микроскопии.

Согласно полученным данным, рост сфероидов достигал пика по истечении 7 суток культивирования с последующим падением числа живых клеток как в контроле (сфероиды из клеток), так и в опыте (сфероиды из клеток с микросферами). При этом при использовании микросфер диаметром менее 100 мкм наблюдалась более активная пролиферация клеток, чем в контроле и в сфероидах с микросферами более 100 мкм. Исследование роста клеток при помощи сканирующей электронной микроскопии показало лучшее прикрепление и агрегацию клеток с микросферами меньшего диаметра (см. Рисунок 1).

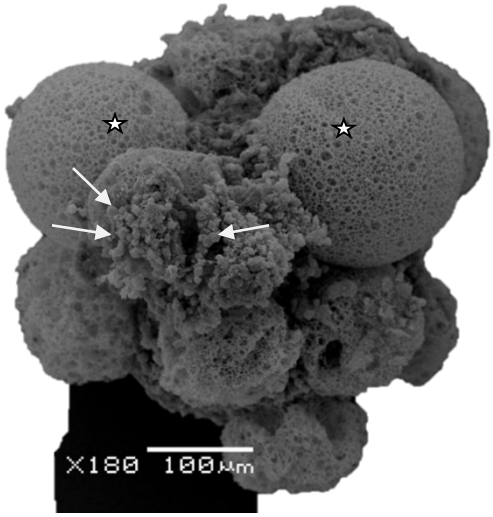


Рисунок 1 – Клетки (стрелки), агрегированные с микросферами из ПОБ (звёздочки). Сканирующая электронная микроскопия

Приём материалов статей по адресу: actbio@mail.ru

На основании полученных результатов можно заключить, что подобный подход к созданию трёхмерных клеточных конструкций из опухолевых клеток с использованием ПОБ является перспективным и может быть в дальнейшем использован для получения моделей для тестирования противоопухолевых препаратов. Более глубокое понимание процессов, происходящих при культивировании подобных трёхмерных комплексных систем, может быть достигнуто посредством анализа экспрессии различных транскрипционных факторов, а также в ходе масштабирования процесса до культивирования в большем объёме с постоянным током питательной среды.

Работа получила финансовую поддержку РФФИ мк № 18–29–09099.

ЛИТЕРАТУРА

1. Галимова, Э.С. & Галагудза, М.М. Двухмерные и трехмерные модели культур клеток опухолей in vitro: преимущества и недостатки. Бюллетень сибирской медицины 17, 188–196 (2018).
2. Melissaridou, S. et al. The effect of 2D and 3D cell cultures on treatment response, EMT profile and stem cell features in head and neck cancer. Cancer Cell Int. 19, 16 (2019).
3. Reddy, C.S.K., Ghai, R. & Kalia, V.C. Polyhydroxyalkanoates : an overview. 87, 137–146 (2003).
4. Бонарцев, А.П., Воинова, В.В., Шайтан, К.В. Пористые микросферы из поли 3 оксиалканоата для контролируемого высвобождения положительно заряженных белков и способ их получения. Патент РФ № 2692768 от 27.06.2019 г.
5. Feldman, R. et al. Molecular profiling of head and neck squamous cell carcinoma. 1625–1638 (2016).

УДК 633.367.2:631.526.3

ТЕХНОЛОГИЯ ХРАНЕНИЯ МАКСИМАЛЬНОГО КОЛИЧЕСТВА ГЕНОВ ВИДА РАСТЕНИЙ В МИНИМАЛЬНОМ КОЛИЧЕСТВЕ КОМПОНЕНТОВ ЕГО БИОЛОГИЧЕСКОГО БАНКА ГЕНОВ

Н.С. Купцов, Е.Г. Попов

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь

Современное сельхозпроизводство в связи с глобальными изменениями климата Земли и тем фактом, что в Европе этот процесс идёт более высокими темпами, чем в среднем по миру, поставило перед селекцией нашего времени в качестве стратегической задачи создание у сельскохозяйственных культур интенсивных сортов различного типа развития (яровых, факультативных, озимых, многолетних), обладающих высоким потенциалом продуктивности и адаптивности, приспособленных к технологиям возделывания в разных системах земледелия (классической, No-Till, Strip-Till, Mix-Crop, Rot-Mix). Однако время, которое отводится селекционерам на решение сегодняшних задач и ближайшего будущего, значительно короче, чем это было в прошлом. Дальнейшее успешное продвижение в области практической селекции всё более зависит от оперативного вовлечения в работу генофонда, хранящегося в мировых коллекциях. За последние десятилетия объёмы этих коллекций резко возросли, что затрудняет работу с ними, а именно, инвентаризацию, хранение, воспроизведение, выдачу потребителю, использование потребителем и др. [1–5]. Поэтому весьма актуально создание таких технологий, которые позволяют существенно сокращать объёмы коллекций, сохраняя при этом количество генов, подлежащих хранению.

С целью значительного сокращения объёмов коллекций, несущих подлежащие хранению гены, а также для удобства и ускорения работ по созданию необходимого для селекции генотипического разнообразия, нами были созданы для 4-х видов люпина (узколистного [Lupinus angustifolius L.], жёлтого [L. luteus L.], белого [L. albus L.], тарви [L. mutabilis Sweet]) биологические банки генов (ББГ), состоящие из 14 компонентов каждый [5–7]. При этом теоретическим базисом ББГ стал заложенный в молекуле ДНК общеизвестный принцип комплементарности полинуклеотидов, используемый природой для хранения и воспроизводства генетической информации разных организмов. Этот принцип с успехом применён нами в ББГ видов люпина для хранения и воспроизводства контролируемых генов вида в минимальном количестве компонентов. Комплементарные друг другу по многим генам 14 компонентов ББГ по генетической функции являются своего рода аналогами полинуклеотидов ДНК.

Гибридизация компонентов между собой (– ++×++ –) в результате неаллельного взаимодействия генов (-+ ±) и их рекомбинации позволяет значительно увеличить в потомстве гибридов генотипическое разнообразие по тому или иному элементарному признаками. Так, наряду с выщеплением родительских генотипов (– ++ и ++ –) происходит реверсия блока диких генов (+++) и образование новых блоков мутантных генов (– –).

Рекомбинации генов разных признаков приводят к образованию генотипов с новыми ассоциациями генов, которые являются принципиально новыми только в случаях, если в них включены новообразования при взаимодействии неаллельных генов [4, 5, 8].

Процесс создания ББГ указанных видов люпинов включал следующие 5 этапов: изучение и инвентаризация мировой коллекции; формирование стержневых коллекций; составление изопризнаковых групп; инвентаризация генов, подлежащих хранению; создание с помощью гибридизации биологического банка генов.

Биологический банк генов каждого из указанных видов люпина представляет собой систему из 14-ти комплементарных друг другу компонентов (ББГ-1… ББГ-14), в которой экспериментально с помощью гибридизации сконцентрированы и хранятся контролируемые и необходимые для практической селекции гены, ранее дисперсно разбросанные по отдельным образцам мировой коллекции. Каждый из компонентов ББГ сформирован на генетической основе того или иного геотипа (Иберийского, Апеннинского, Балкано-Азиатского и др.) или агрогеотипа (Австралийского, Северо-Американского, Польского и др.).

Число компонентов в ББГ (14) определено с учётом числа неаллельных генов по признаку "окраска семян" (11), а также необходимости иметь 1 компонент (ББГ-12) с полным набором доместикационных генов и 2 тестера для гибридологического анализа. Компонент ББГ-12 используется в процессе доместикации желательных диких форм вида и выведения на их генетической основе современных интенсивных сортов. Компонент ББГ-13 служит тестером, содержащим мутантные (рецессивные и доминантные аллели) генов большинства контролируемых признаков, а компонент ББГ-14 является тестером, содержащим набор диких (нормальных) генов.

Необходимо подчеркнуть, что на современном этапе селекционерами в процессе создания сортов самоопыляющегося вида люпина узколистного постоянно контролируется около 100 генов по 35 признакам, а у факультативных перекрёстников (люпинов жёлтого, белого и тарви) – около 30 генов по 20 признакам.

Сравнительный ISSR-анализ сортов, образцов и диких форм мировой коллекции люпина узколистного и компонентов ББГ этого вида, установил, что последние полностью отражают спектр его внутривидового разнообразия, равномерно распределяясь на дендрограмме генетического сходства [9]. Использование двух молекулярно-генетических методов (WPGMA и UPGMA) также показало, что биологический банк генов люпина узколистного обладает высоким генетическим разнообразием его 14 компонентов [5, 10]. Эти результаты молекулярно-генетического анализа и опыт использования ББГ люпина узколистного в практической селекции дают нам основание сделать заключение о том, что его объём в 14 компонентов является достаточным для хранения контролируемых генов в настоящее время, а также в обозримом будущем. Для идентификации компонентов ББГ люпина узколистного, а также защиты авторских прав на ББГ и на сорта, создаваемые в результате его использования в практической селекции, разработаны с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР, PCR) и двух ISSR-праймеров (IS3 и UBC810) молекулярно-генетические паспорта компонентов ББГ этого вида [5, 10]. Следует отметить, что молекулярно-генетические паспорта компонентов ББГ являются важными и необходимыми элементами при их идентификации, коррекции и использовании в селекционной работе.

Для результативного отбора желательных генотипов из гибридных популяций ББГ ($\mathbf{F_2}$… $\mathbf{F_n}$) разработана и используется система сигнальных генов, в том числе и молекулярно-генетических ДНК-маркеров [3, 5, 10].

Воспроизведение генов и их ассоциаций в ББГ осуществляется путём гибридизации между собой его компонентов и отбора растений с желательными генами во втором и последующих поколениях. В поколениях гибридов от скрещивания компонентов ББГ воспроизводится колоссальное разнообразие генотипов, превышающее по некоторым признакам таковое вида. Среди новых форм выделяются даже такие, которые имеют признаки, характерные для других видов люпина.

В ББГ исключается эрозия генетического материала, так как при гибридизации его компонентов между собой в результате неаллельного взаимодействия генов и их рекомбинаций происходит синтез принципиально новых генотипов, а также реверсия (возврат) как диких признаков вида, так и таковых, характерных для рода.

Указанное явление мы целенаправленно используем для экспериментального синтеза новых разновидностей у того или иного вида люпина. Так, у люпина узколистного (Средиземноморский генцентр) синтезирована новая разновидность (var. anastasii Kuptzov. var. nova), таксономические признаки которой близки к таковым разновидностей тарви (Южно-Американский генцентр) [3].

Кроме того, гибридизация между собой компонентов ББГ, которые созданы на генетической основе отдалённых геотипов и агрогеотипов, открывает возможности целенаправленного использования естественного тетраплоидного уровня видов люпина для экспериментального синтеза максимальной (4-х аллельной) гетерозиготности по желательным элементарным признакам, которая в поколениях обеспечивает высокий уровень их выраженности и, возможно, незатухающий гетерозис [11].

Малое количество компонентов ББГ значительно облегчает работу с ним. ББГ позволяет оперативно проводить инвентаризацию генов, закладку новых генов на хранение, воспроизводство желательных генов и их использование в селекции.

Биологический банк генов постоянно пополняется новыми аллелями генов. Этот процесс осуществляется в следующей последовательности. В случае появления в коллекции образца люпина с новым выражением того или иного признака, он скрещивается с тестером ББГ-14, содержащим в своём генотипе комплект диких (нормальных) генов. Это скрещивание даёт возможность выяснить происхождение гена, обусловливающего изучаемый признак (дикий, мутантный доминантный или мутантный рецессивный). Затем изучаемый ген проверяется на аллельность путём скрещивания изучаемого образца с соответствующими ему по признаку компонентом биологического банка генов. Доказательством неаллельности изучаемого гена является восстановление дикого выражения признака в $\mathbf{F_1}$ в случае его рецессивности, а в случае его доминантности – появление в $\mathbf{F_2}$ доли растений с диким выражением признака. Отсутствие восстановления дикого выражения признака в $\mathbf{F_1}$ и $\mathbf{F_2}$ гибридов свидетельствует об аллельности изучаемого гена таковому компонента ББГ. В случае выявления у тестируемого образца нового аллеля, последний, путём гибридизации, включается в наиболее подходящий для него тот или иной компонент ББГ, где он в дальнейшем хранится.

Следует также отметить, что ББГ даёт возможность вести селекционный процесс в соответствии с основными положениями классической генетики по трансформации признаков. Известно [3–5], что процесс выведения сортов состоит из создания путём рекомбинации генов уравновешенных (сбалансированных) полигенных комплексов, обеспечивающих новые сочетания признаков и свойств, наиболее соответствующих целям селекции. Указанные полигенные комплексы определяют повышение реакции на отбор и ускоряют трансформацию признаков в тем большей степени, чем больше объём популяций используется для отбора, большее число одновременно трансформируемых аллелей различных локусов, меньшее селективное преимущество каждого локуса, выше интенсивность рекомбинационных процессов, меньше элиминация рекомбинантов в жизненном цикле и выше интенсивность отбора. Биологический банк генов полностью удовлетворяет всем перечисленным требованиям классической генетики по трансформации признаков. Так, небольшое количество компонентов ББГ позволяет значительно увеличить объём желательных комбинаций скрещивания и использовать для отборов большие по численности гибридные популяции $\mathbf{F_2}$… $\mathbf{F_n}$. Вовлечение большего числа желательных аллелей в процессы трансформации обеспечивается их экспериментальной концентрацией в компонентах ББГ. Снижение селективного преимущества каждого локуса достигается использованием в компонентах ББГ в основном мутантных аллелей контролируемых локусов. Мы полагаем, что колоссальное генотипическое разнообразие потомства гибридов ББГ отражает существующее на сегодня разнообразие того или иного изучаемого нами вида люпина в дикой флоре и в коллекциях научных учреждений разных стран, как собранное описанное, так и несобранное и неописанное, а также, вероятно, ещё то разнообразие, которое имело место в процессе эволюции, но не закрепилось и элиминировало. Возможно и такое, которое может ещё появиться в дикой флоре, а также в процессе селекции.

По методическому подходу технология создания ББГ, хранения в нём генов, их воспроизводства и использования является принципиально новой, по своей сути "космической", технологией [5]. Космическая сущность этой технологии заключается в её способности обеспечить закладку, хранение, воспроизводство и транспортировку колоссального генетического разнообразия (на уровне вида) в минимально возможном количестве его компонентов. Эти свойства ББГ полностью отвечают требованиям, предъявляемым к банкам генов, которые могут быть использованы при освоении Космоса (на других планетах и космических станциях).

Включение ББГ в селекционный процесс позволило в короткие сроки создать разнообразный исходный для селекции материал и вывести серию сортов кормового узколистного люпина (Данко, Миртан, Першацвет и др.), жёлтого люпина (Пава, Владко, Алтын и др.), белого люпина (Эллин, Геракл и др.), тарви (Визент).

В коллекцию люпина Национального банка генетических ресурсов растений Республики Беларусь передано 112 образцов люпина узколистного, 82 – люпина тарви, 19 – люпина жёлтого, 2 – люпина белого [5].

Необходимо отметить, что компонент ББГ-12 биологического банка генов того или иного вида люпина, являясь донором набора доместикационных генов, с успехом используется в процессе доместикации их диких форм. Так, скрещивание дикого люпина греческого (подвида люпина белого, Subsp. graecus Bois. et Sprun.) с ББГ-12 люпина белого (L. albus L.) позволило в короткие сроки (7 лет) осуществить его доместикацию и создать интенсивный кормовой сорт Эллин, который с 2019 года проходит Государственное сортоиспытание.

Следует также указать, что имеющееся разнообразие образцов люпина, созданного на основе гибридного материала от скрещивания компонентов ББГ, позволило нам установить и описать у люпина узколистного – 20 новых разновидностей, 11 подразновидностей и 19 форм, у люпина жёлтого – 3 новых разновидности, 4 подразновидности, 4 формы, у люпина белого – 1 новую разновидность и 1 форму [12].

Таким образом, у каждого из 4-х видов люпина (узколистного, жёлтого, белого, тарви) сформированы биологические банки генов, состоящие из 14-ти компонентов, в которых экспериментально сконцентрированы и хранятся контролируемые гены, ранее дисперсно разбросанные по отдельным образцам мировых коллекций. Эти банки генов с успехом используются как в процессе доместикации диких форм указанных видов люпина, так и в селекционном процессе по синтезу новых внутривидовых таксонов и выведению интенсивных сортов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Купцов, Н.С. Энергоплантации: Справочное пособие по использованию энергетических растений / Н.С. Купцов, Е.Г. Попов. Минск: ЗАО «Конфидо», 2015. 128 с.

2. Топинамбур в Беларуси (монография) / Титок В.В. [и др.]. Минск: РУП "Беларуская навука", 2018. 263 с.

3. Купцов, Н.С. Люпин генетика, селекция, гетерогенные посевы / Н.С. Купцов, И.П. Такунов. Брянск, Клинцы: Клинцовская городская типография, 2006. 576 с.

4. Купцов, Н.С. Люпин узколистный / Н.С. Купцов, Т.П. Миронова // Генетические основы селекции в 4-х томах, Т.2: Частная генетика растений / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; науч. ред. А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылёва. Минск: Бел. наука, 2010. С. 369–421.

5. Купцов, Н.С. Стержневая генетическая коллекция Lupinus angustifolius L. Генетика, формирование биологического банка генов, использование / Н.С. Купцов [и др.] / РУП "НПЦ НАН Беларуси по земледелию". Минск: ИВЦ МФ РБ, 2014. 127 с.

6. Купцов, Н.С. Результаты и перспективы акклиматизации люпина тарви в Беларуси / Н.С. Купцов, П.А. Пашкевич, Д.А. Бугрова, В.Н. Купцов // Роль ботанических садов и дендрариев в сохранении, изучении и устойчивом использовании разнообразия растительного мира: Материалы Международной научной конференции, посвящённой 85-летию Центрального ботанического сада НАН Беларуси (Минск, 6–8 июня 2017 г.). Минск : «Медисонт», 2017. Часть 1. С. 143–146.

7. Купцов, Н.С. Результаты и перспективы селекции люпина тарви / Н.С. Купцов, П.А. Пашкевич П.А., Д.А. Бугрова // Новые сорта люпина, технология их выращивания и переработки, адаптация в системы земледелия и животноводство: Сб. материалов Междунар. научн.-практич. конф., посвящённой 30-летию со дня основания Всероссийского научно-исследовательского института люпина. Брянск: «Изд-во "Читай-город"», 2017. С. 125–135.

8. Kuptsov, N.S. Non-allelic gene recombination and its use in breeding of L. angustifolius / N.S. Kuptsov, B. Joernsgaard // Wild and cultivated lupins from the Tropics to the Poles : Proceedings of the 10th Int. Lupin Conference. Laugarvatn, Iceland, 19–24 June 2002. / E. van Santen & G.D. Hill (eds.). Canterbury (N.Z.): International Lupin Association, 2004. P. 53–55.

9. Артюхова, А.В. Паспортизация сортов люпина методами ISSR-PCR и RAPD-PCR для биотехнологических исследований: автореф. дис… канд. биол. наук: 03.01.06; 03.02.07 / А.В. Артюхова; Институт биологии Уфимского научн. центра РАН. Уфа, 2011. 23 с.

10. Nam, I.I. Identification and certification of lupine cultivars using molecular markers / I.I. Nam [et al.] // World Appl. Sci. J. 2014. Vol. 30, № 7. P. 796–801.

11. Купцов, Н.С. Изучение гетерозиса по признаку «масса тысячи семян» у гибридов люпина узколистного / Н.С. Купцов, В.Ч. Шор, А.А. Козловский // Земледелие и селекция в Беларуси. Сб. науч. тр. РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию». Минск: «ИВЦ Минфина», 2012. вып. 48. С. 358–367.

12. Унифицированный классификатор рода Lupinus L. / Ф.И. Привалов [и др.]; Национальная академия наук Беларуси, РУП "Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию". Минск: ИВЦ МФ РБ, 2013. 63 с.

УДК 577.2

НОВЫЕ ЧЕЛНОЧНЫЕ ВЕКТОРЫ НА ОСНОВЕ ПРИРОДНЫХ ПЛАЗМИД БАКТЕРИИ HELICOBACTER PYLORI

А.М. Белова, Д.В. Басманов, В.В. Бабенко, Т.В. Митько, Д.В. Клинов, В.Н. Лазарев

ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва

Бактерия H. pylori является важным участником формирования таких патологических состояний как острый и хронический гастрит, язвенная болезнь желудка, рак желудка, MALT-лимфома [1, 2] и по всей вероятности целого ряда других, в настоящее время ещё недостаточно расшифрованных с патогенетической точки зрения, заболеваний. Этот патоген отличается широким набором различных факторов вирулентности, а также метаболической и транскрипционной изменчивостью, что позволяет бактерии быстро адаптироваться к воздействию агрессивной среды желудка, а также иммунному ответу "хозяина" [3]. Считается, что плазмидные ДНК могут вносить определенный вклад в гетерогенность и адаптивный ответ штаммов H. pylori. Известно, что около 50 % клинических изолятов H. pylori содержат плазмиды [4 – 8], однако их функции и роль в патогенезе до сих пор остаются не до конца изученными. Кроме того, для данной бактерии существует необходимость расширить набор генно-инженерных инструментов путем создания челночных векторов, которые будут эффективно реплицироваться и стабильно поддерживаться в клетках данной бактерии. Целью данного исследования было выделение природных плазмидных ДНК из клеток клинических изолятов бактерии H. pylori и их характеристика. Также на основе двух различных природных плазмид (см. Рисунок 1) были сконструированы челночные векторы pSv2 и pSv4.

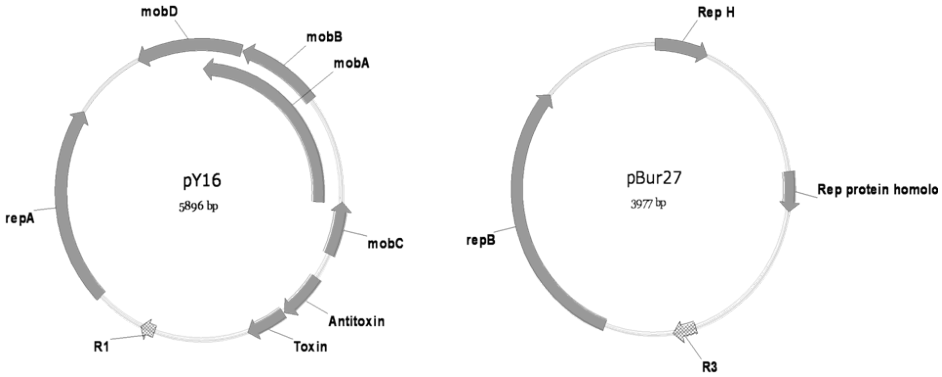


Рисунок 1. Генетические карты природных плазмид H. pylori pY16 и pBur27, использованных в качестве основы для создания pSv2 и pSv4. Гены семейства rep ответственны за репликацию плазмиды в клетках; гены семейства mob (mobA/B/C/D) участники процесса коньюгации; гены Toxin/Antitoxin относятся к генам системы токсин / антитоксин типа II, характерной для грамотрицательных бактерий; R1 / R3 – повторы типа 1 и типа 3, предположительная область начала репликации

Было показано, что векторы отличаются высокой стабильностью и могут быть успешно реализованы в клетках различных штаммов H. pylori. Кроме того в состав векторов был клонирован безпромоторный ген-репортер gfp (см. Рисунок 2). Промоторные области генов vacA и ureA, кодирующих хорошо охарактеризованные факторы вирулентности H. pylori, были слиты с геном gfp в составе челночных векторов.

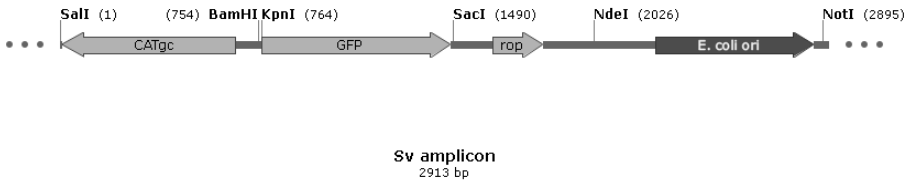


Рисунок 2. Генетическая карта ампликона, использованного для получения H. pylori / E. coli челночных векторов pSv2 и pSv4. catGC – ген устойчивости к хлорамфениколу в клетках H. pylori / E. coli; gfp – безпромоторный ген, кодирующий зеленый флуоресцентный белок GFP; rop – ген контроля копийности в клетках E. coli; ori – область начала репликации в клетках E. coli.

Таким образом, полученные нами векторы могли выступать в качестве репортерных систем в составе клеток H. pylori. Регистрация сигнала флуоресценции GFP от генетически модифицированных штаммов H. pylori, выявила чувствительность репортерных систем к воздействию на клетку осмотического стресса, кислотного стресса, повышенной концентрации Ni^{2+} или хелатирования железа (см. Рисунок 3).

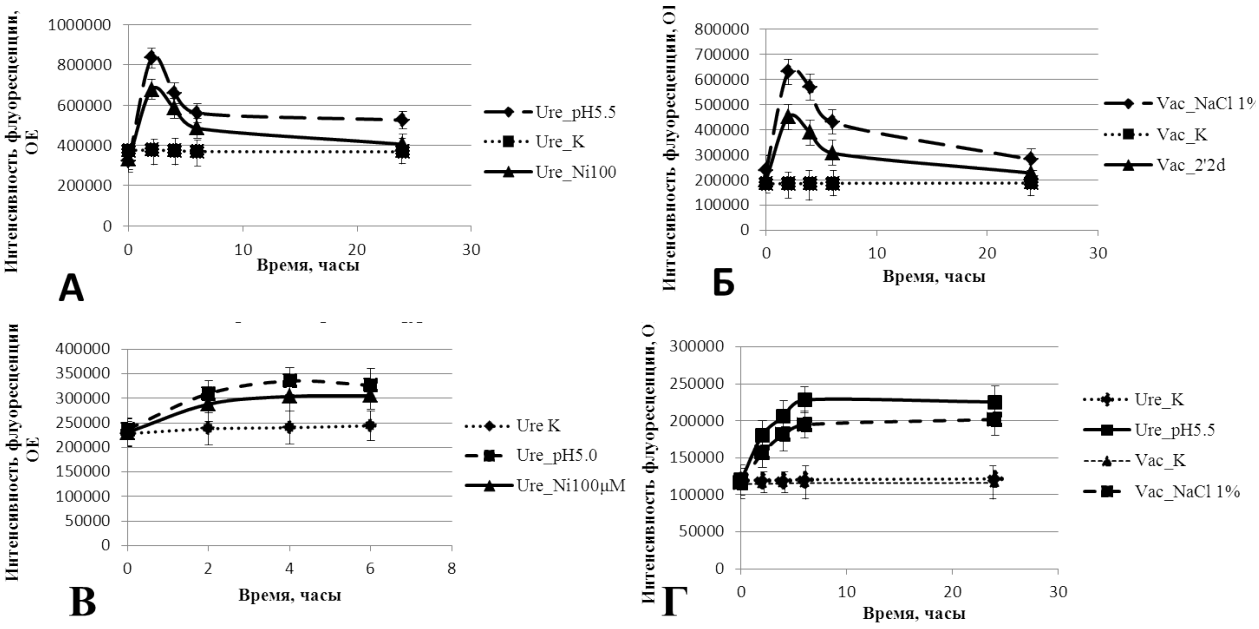


Рисунок 3. Сравнение чувствительности репортерных конструкций на основе плазмид pSv2, pSv4 и pHel в клетках штамма H. pylori. А. Модификация плазмидой pSv4-ure, клетки индуцировали кислым pH и повышенными концентрациями Ni2+. Б. Модификация плазмидой pSv4-vac, клетки индуцировали осмотическим стрессом и хелатированием железа. В. Модификация плазмидой pHel-ure, клетки индуцировали кислым pH и повышенными концентрациями Ni2+ Г. Модификации плазмидами pSv2-ure и pSv2-vac, клетки индуцировали кислым pH (промотор ureA) и осмотическим стрессом (промотор vacA). В каждом эксперименте были собраны статистические данные для более чем 100 отдельных клеток. Каждый образец был продублирован. Эксперимент был повторен три раза

Кроме того, была проведена оценка эффективности полученных векторов по сравнению с широко используемым вектором pHel2. Полученные результаты подтверждают эффективность векторов pSv2 и pSv4 в качестве новых инструментов для различных генно-инженерных модификаций патогена H. pylori. Бактериальные клетки H. pylori, модифицированные такими конструкциями, планируется использовать для решения широкого спектра экспериментальных задач. В частности, для мониторинга регуляции критически значимых генов H. pylori, а также в качестве экспериментального объекта при исследованиях сорбции биомолекул на иммобилизированные на поверхности бактериальные клетки с помощью биосенсора на поверхностных оптических волнах в одномерном фотонном кристалле [9].

Исследования поддержаны Российский фондом фундаментальных исследований (грант № 18–32–00797).

ЛИТЕРАТУРА

1. Marshall BJ, Warren JR.1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet.; 1(8390) : 1311–5.

2. Ji-Hyun Seo, Hyun-Jeong Do, Chan-Hoo Park, Hyang-Ok Woo, Hee-Shang Youn, Gyung-Hyuck Ko1, Seung-Chul Baik, Woo-Kon Lee, Myung-Je Cho, Kwang-Ho Rhee and Jeong Hee Lee. 2013. Helicobacter pylori Infection and Duodenal Gastric Metaplasia in Healthy Young Adults. Korean J. Gastroenterol.; 61(4) : 191–195.

3. Alm R.A., Ling L.S., Moir D.T., et al. 1999. Genomic sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen Helicobacter pylori. Nature; 397:176–80.

4. Penfold, S.S., A.J. Lastovica, and B.G. Elisha. 1988. Demonstration of plasmids in Campylobacter pylori. J. Infect. Dis.; 157:850–851.

5. Heuermann, D., and R. Haas. 1995. Genetic organization of a small cryptic plasmid of Helicobacter pylori. Gene; 165:17–24.

6. Kleanthous H., C.L. Clayton, and S. Tabaqchali. 1991. Characterization of a plasmid from Helicobacter pylori encoding a replication protein common to plasmids in gram-positive bacteria. Mol. Microbiol.; 5:2377–2389.

7. Minnis, J.A., T.E. Taylor, J.E. Knesek, W.L. Peterson, and S.A. McIntire. 1995. Characterization of a 3.5-kbp plasmid from Helicobacter pylori. Plasmid; 34:22–36.

8. De Ungria, M.C., T. Kolesnikow, P.T. Cox, and A. Lee. 1999. Molecular characterization and interstrain variability of pHPS1, a plasmid isolated from the Sydney strain (SS1) of Helicobacter pylori. Plasmid; 41:97–109.

9. Olga V. Morozova, Olga A. Levchenko, et.al. 2019. Surface modification with polyallylamines for adhesion of biopolymers and cells. International Journal of Adhesion and Adhesives; 92:125–132.

УДК 581.1

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА СТИЛЬБЕНСИНТАЗЫ ВИНОГРАДА В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ ТАБАКА

Е.Б. Рукавцова[1], В.В. Алексеева[1], С.В. Тарлачков[1], Н.С. Захарченко[1], А.К. Сурин[2], Е.Ю. Горбунова[1], В.Н. Азев[1], Я.И. Бурьянов[1]

[1] Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, Россия

[2] Институт белка РАН, Пущино, Россия

Растения являются удобной, безопасной и экономически выгодной альтернативой для продукции различных метаболитов по сравнению с системами экспрессии на основе микроорганизмов, культур животных клеток или трансгенных животных. Одним из ценных метаболитов некоторых растений, в частности, винограда, является резвератрол (3,5,4'-тригидроксистильбен). Синтез резвератрола в клетках растений происходит по фенилпропаноидному пути и регулируется ферментом стильбенсинтазой (STS). Резвератрол является антиоксидантом и обладает противоопухолевым, антибактериальным и противовирусным действием, а также благотворно влияет на сердечно-сосудистую, нервную систему человека и обладает гепатопротекторными свойствами. Кроме того, резвератрол является фитоалексином и растения с экспрессией гена стильбенсинтазы могут обладать повышенной устойчивостью к фитопатогенам. Для создания коммерческих растительных продуцентов резвератрола необходимо увеличение уровня экспрессии стильбенсинтазы за счет использования сильных вирусных промоторов. Цель данной работы – анализ физиологических и биохимических особенностей трансгенных растений Nicotiana tabacum L. с повышенным синтезом резвератрола.

Нами получены и проанализированы несколько линий трансгенных растений табака с геном стильбенсинтазы винограда STS (GenBank AB046375.1) под контролем сильного конститутивного двойного промотора 35S РНК вируса мозаики цветной капусты CaMV 35SS. Наличие генов STS и неомицинфосфотрансферазы nptII в геноме полученных растений было доказано методом ПЦР. Растения восьми трансгенных линий, в ДНК которых выявлялись фрагменты ДНК, соответствующие по размерам гену STS и внутреннему фрагменту гена nptII, были выбраны для дальнейших анализов.

Первоначально экспрессия гена STS в трансгенных растениях была показана методом полуколичественной ОТ-ПЦР. В РНК исследованных линий обнаружены продукты транскрипции фрагмента гена STS величиной 150 п.н., тогда как у контрольного растения соответствующие транскрипты отсутствовали. В линии Л7 экспрессию гена STS не наблюдали. В результате отобрано семь независимых линий табака с геном STS и маркерным геном nptII.

Экспрессия гена STS в этих линиях трансгенных растений проанализирована с помощью количественной ОТ-ПЦР в реальном времени. По данным ПЦР в реальном времени уровень экспрессии гена STS был минимален в линии Л24 и максимален в линии Л10, при этом разница в экспрессии между линиями с минимальным и максимальным уровнем отличалась более, чем в 100 раз.

Поскольку ген стильбенсинтазы отвечает за синтез резвератрола в растениях, нами проведены эксперименты по определению количества этого метаболита в листьях трансгенных растений. Выполнен хромато-масс-спектрометрический анализ экстрактов листьев табака линии Л10 с наибольшим уровнем экспрессии гена STS. Показано, что синтез резвератрола в трансгенных растениях составил до 150–170 мкг/г сырой биомассы. В полученных другими исследователями трансгенных растениях синтез резвератрола составлял от 0,1 до 650 мкг/г сырой биомассы, что сравнимо с количеством этого метаболита в кожуре ягод винограда, либо в листьях винограда после воздействия стресса [1].

Растения всех трансгенных линий с геном STS были высажены в закрытый грунт для получения гомозиготных линий и их дальнейшего анализа. Отобраны три гомозиготные линии для растений Л10 и две гомозиготные линии – для Л23.

Проведено изучение влияния встроенного гена на репродуктивные свойства растений и морфологию цветков. Повышенная экспрессия гена STS приводила к уменьшению пигментации венчиков цветков трансгенных растений. Цветки растений табака линии Л10 с наибольшей экспрессией гена STS имели почти белую окраску, хотя иногда в процессе созревания цветка приобретали слабо-розовую пигментацию. Содержание суммы антоцианов в венчиках цветков этих трансгенных растений снизилось до 48,7 % от количества антоцианов в венчиках контрольных цветков. При этом цветки трансгенной линии Л7 с «молчащим» геном STS не отличались от контрольных. Этот факт может быть результатом конкуренции за субстрат между ферментами стильбенсинтазой и халконсинтазой [2]. Общее количество флавоноидов также уменьшилось на 26–29 % в цветках линий табака с наибольшей экспрессией гена STS (Л10 и Л23) по сравнению с цветками нетрансформированных растений. В то же время не обнаружено снижение количества флавоноидов в листьях этих линий. Это крайне важное наблюдение, учитывая участие флавоноидов в регуляции развития растений, защите от ультрафиолетового излучения и передаче сигналов между растениями и микроорганизмами. Показанное нами уменьшение содержания флавоноидов в органах цветков могло повлиять на репродуктивные свойства трансгенных растений табака. Так, нами обнаружено негативное влияние конститутивной экспрессии гена STS на развитие пыльцы трансгенных растений (лишь 30 % пыльцевых зерен растений линии Л10 прорастали на среде с сахарозой) и в дальнейшем на семенную продуктивность этих растений табака. У трансгенных растений и их потомства уменьшился средний вес семенных коробочек. Для растений табака поколения Т2 вес коробочек составлял 70,2–88,8 % от контроля в Л23 и 47,4–52,6 % в Л10. Таким образом, снижение уровня флавоноидов может влиять как на окраску цветков трансгенных растений, так и на образование пыльцы и семенную продуктивность.

Проведены опыты по определению устойчивости полученных растений к грибным фитопатогенам Fusarium oxysporum, F. sporotrichioides, F. culmorum, Botrytis cinerea и к бактериальному фитопатогену Erwinia carotovora. Показана частичная устойчивость растений с наибольшим синтезом резвератрола к B. cinerea и E. carotovora.

Следует отметить, что ген STS, обеспечивающий трансгенные растения устойчивостью против фитопатогенных микроорганизмов, может быть перспективен для использования в биотехнологии растений. Полученные векторные конструкции с геном стильбенсинтазы можно в дальнейшем использовать для исследования эффекта этого гена в различных трансформированных растениях.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 16–08–00511.

ЛИТЕРАТУРА

1. Delaunois B., Cordelier S., Conreux A., Clement C., Jeandet P. Molecular engineering of resveratrol in plants // Plant Biotechnol. J. 2009. V. 7. P. 2–12.

2. FischerR., Budde I., Hain R. Stilbene synthase gene expression causes changes in flower colour and male sterility in tobacco // Plant J. 1997. V. 11. P. 489–498.

УДК 606

ОРГАНОСПЕЦИФИЧНОСТЬ ЭПОКСИАЛКОГОЛЬСИНТАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ЦИТОХРОМОВ Р450 СЕМЕЙСТВА CYP74 ОГУРЦА CUCUMIS SATIVUS

Е.К. Аскарова, С.С. Горина, Е.О. Смирнова, Я.Ю. Топоркова, Л.Ш. Мухтарова, А.Н. Гречкин

Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, Казань, Россия

Жирные кислоты являются важными компонентами липидов, они имеют сходное строение в клетках всех живых организмов. В основном, жирные кислоты входят в состав мембран и запасающих липидов. Помимо этого, жирные кислоты и их производные играют роль сигнальных молекул (Xue et al., 2007; Wang et al., 2006). Метаболизм полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), протекающий при участии липоксигеназ (ЛОГ) (Gardner et al., 1988; Hamberg, Gardner, 1992), называется липоксигеназным каскадом. Его продукты, оксилипины являются посредниками в осуществлении реакции ответа на повреждения и воздействие патогенов (Leon et al., 2001; Browse, 2005; Schilmiller, Howe, 2005; Wasternack et al., 2006; Wasternack et al., 2007). Оксилипины разнообразны по структуре и обладают высокой биологической активностью. Оксилипины вовлечены в регуляцию процессов роста, развития, защитных ответов, участвуют в переносе стрессовых сигналов, регулируют экспрессию генов, а также взаимодействуют с многочисленными сигнальными путями в растительных клетках, включая сигнальные пути гормонов – ауксина, гиббереллина, этилена и абсцизовой кислоты (АБК) (Савченко и др., 2014). Гидроперекиси ПНЖК служат важными первичными продуктами каскада реакций образования оксилипинов. Последующие превращения гидроперекисей в различные соединения, принадлежащие к семейству растительных оксилипинов, катализируются ферментами уникального семейства CYP74 цитохромов Р450. Ферменты семейства CYP74 широко распространены у наземных растений. Семейство включает 4 типа ферментов: алленоксидсинтазы (АОС), гидропероксидлиазы (ГПЛ), дивинилэфирсинтазы (ДЭС) и эпоксиалкогольсинтазы (ЭАС) (Grechkin, 1998; Brash, 2009; Hughes, 2009). По общепринятому правилу в семейство CYP74 входят ферменты, демонстрирующие 40 % гомологию аминокислотных последовательностей, в подсемействе объединены ферменты с 55 % гомологии. ДЭС являются членами подсемейств CYP74B, CYP74D, CYP74H, CYP74M и CYP74Q, АОС являются членами подсемейств CYP74A и CYP74C, ГПЛ являются членами подсемейств CYP74B, CYP74C, CYP74E, CYP74F и CYP74G. Недавнее обнаружение CYP74-связанных ферментов у некоторых протеобактерий, многоклеточных животных (Lee et al., 2008; Toporkova et al., 2017) и у бурых водорослей (Toporkova et al., 2017) расширило множественность CYP74 от семейства до клана. Истинные ЭАС до сих пор были обнаружены только у многоклеточных животных и бурых водорослей, однако, недавно была описана единственная ЭАС растений у плаунка Selaginella moellendorffii (Toporkova et al., 2018).

Объектами нашего исследования являются ферменты семейства CYP74 цитохромов Р450 огурца Cucumis sativus, у которого были обнаружены продукты эпоксиалкогольсинтазной ветви липоксигеназного каскада. Геном огурца был расшифрован в 2009 году, в нем было обнаружено 4 гена, кодирующих ферменты семейства CYP74. Фермент подсемейства CYP74A ранее был определен как 13-гидропероксид-специфичная алленоксидсинтаза. Два фермента CYP74C1_CS и CYP74B6 были охарактеризованы как 9- и 13-гидропероксид-специфичные гидропероксидлиазы. Первичная структура фермента CYP74C31 содержит ряд нехарактерных для АОС и ГПЛ аминокислотных остатков в каталитически важных сайтах и потенциально может являться эпоксиалкогольсинтазой у огурца Cucumis sativus.

Рекомбинантные ферменты были получены в гетерологичных системах экспрессии с использованием клеток E. coli. Полноразмерные открытые рамки считывания были клонированы для получения рекомбинантных белков, которые были экспрессированы в бактериальном продуценте, очищены методом металл-аффинной хроматографии, и методом ГХ-МС анализа были исследованы каталитические свойства. Все цитохромы Р450 имеют сходную третичную структуру белковой молекулы в комплексе с гемом и имеют определенные консервативные, каталитически важные домены. Выравнивание аминокислотных последовательностей различных ферментов семейства CYP74 выявили корреляцию между заменами отдельных аминокислот в основном «субстрат» распознающих сайтах. Выравнивание последовательностей иллюстрирует сайты, консервативные у всех CYP74.

Первый определитель типа катализа CYP74 локализуется на участке распознавания субстрата CPC-1 вблизи N-конца. Этот сайт известен как «F / L тоггль». Все AOC имеют остаток фенилаланина на этом сайте, а все известные ГПЛ и ДЭС имеют лейцин. Наши объекты содержат в этом сайте остаток лейцина, кроме CYP74A, который определен как AOC, следовательно, содержит остаток фенилаланина. Также в катализе непосредственно участвует гидропероксид-связывающий домен (домен ГСД), состоящий из 6 аминокислотных остатков. Наши объекты демонстрируют высокую степень гомологии аминокислотных последовательностей в этом домене.

Рекомбинантные ферменты были инкубированы 9- и 13-гидроперекисями линолевой и линоленовой кислот – естественными субстратами ферментов семейства CYP74. В зависимости от используемого субстрата, фермент CYP74C31 проявляет различные каталитические свойства. Что касается 9-гидропероксида линолевой кислоты, фермент CYP74C31 проявляет тройную активность – ЭАС, AOC и ГПЛ; по отношению к 9-гидроперекиси α-линоленовой и 13-гидроперекиси линолевой кислот является ЭАС и ГПЛ; для 13-гидроперекиси α-линоленовой кислоты свойства ГПЛ. Аналогичные результаты были получены при изучении каталитических свойств рекомбинантного CYP74C1_CS (Toporkova et al., 2018). Фермент CYP74B6 по отношению к 9- и 13-гидроперекисям линолевой кислоты проявляет свойства ЭАС; по отношению 13-гидроперекиси α-линоленовой кислоты проявляет свойства ГПЛ. Фермент Cucumis sativus CYP74A проявляет свойства AOC. Результаты настоящей работы впервые демонстрируют двойную активность ГПЛ подсемейства CYP74C. В зависимости от субстрата эти ферменты ведут себя в основном как ЭАС или ГПЛ. Один из изученных ферментов, CYP74C31, также обладал третьим типом AOC активности с 9-гидроперекисью линолевой кислоты в качестве субстрата. Синтез эпоксиспиртов является неотъемлемым свойством дуалистичных ферментов подсемейств CYP74B и CYP74C.

Помимо исследования каталитических свойств рекомбинантных ферментов, проводились измерения зависимости активности ферментов от pH буферных растворов. Вопрос о внутриклеточной локализации ферментов CYP74 еще не до конца изучен, но предполагается, что большинство ферментов этого семейства локализуется в мембранах (Froehlich et al., 2001). В литературных данных описана локализация AOC и ГПЛ в различных мембранах хлоропластов (Vick, Zimmerman, 1987); первые стадии жасмонатного пути, катализируемого AOC, протекают в пластидах (Feussner et al., 2002); полностью пластидную локализацию имеют 13-специфичные ГПЛ подсемейства CYP74B, так же как и 13-AOC, принадлежащие к подсемейству CYP74A. Локализация в липидных каплях характерна для 9/13-ГПЛ огурца (Hughes et al., 2009). Для ферментов CYP74A, CYP74C1_CS и CYP74C31 максимальная эффективность превращения субстратов наблюдалась в диапазоне pH 7,5–8. Однако, для фермента CYP74B6 оптимум pH был равен 6. В стороме хлоропласта pH достигает 8, в то время как на поверхности тилакоидов значение pH лежит в более кислом диапазоне и равен 6. По полученным результатам можно сделать предположение о клеточной локализации данных ферментов огурца. Ферменты CYP74C1_CS и CYP74C31 и CYP74A ассоциированы с мембранами и находятся в строме хлоропластов, CYP74B6 локализован на поверхности тилакоидов хлоропластов, где понижение значения pH обусловлено трансмембранным электрохимическим градиентом ионов водорода в ЭТЦ.

Помимо этого, подобные дуалистичные свойства были обнаружены у ферментов ДЭС. В частности, фермент CYP74B16 льна-долгунца (Linum usitatissimum L.) (LuDES) из подсемейства CYP74B катализировал превращения 13-гидроперексей линолевой и линоленовой кислот в (ω5Z) – этеролевую и (ω5Z) – этероленовую кислоты, продукты ДЭС реакции, соответственно. Однако превращение 13-гидроперексей линолевой кислоты привело к образованию значительного количества дополнительных соединений эпоксиспиртов, продуктов ЭАС реакции.

Работы по клонированию рекомбинантных ферментов поддержаны грантом МК-5989.2018.4. Кинетические исследования рекомбинантных ферментов проводились при финансовой поддержке государственного задания Федерального исследовательского центра "Казанский научный центр Российской академии наук". Работа по получению и исследованию фермента CYP74B16 льна-долгунца (Linum usitatissimum L.) (LuDES) выполнена при поддержке гранта 18–34–01012 мол_а.

ЛИТЕРАТУРА

Brash A.R. Mechanistic aspects of CYP74 allene oxide synthases and related cytochrome P450 enzymes // Phytochemistry. T.70. 2009. C. 1522–1531.

Browse, J. Jasmonate: an oxylipin signal with many roles in plants / Vitam Horm. 2005. V. 72. P. 431–456.

Feussner, I. The Lipoxygenase pathway / I. Feussner, C. Wasternack // Annual Review of Plant Biology. 2002. V. 53. P. 275–297.

Froehlich, J.E. Tomato allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase, two cytochrome P450s involved in oxylipin metabolism, are targeted to different membranes of chloroplast envelope / J.E. Froehlich, A. Itoh, G.A. Howe // Plant Physiol. 2001. V. 125. P. 306–317.

Gardner, H.W. Lipoxygenase pathway in cereals. Advances in Cereal Science and Technology / H.W. Gardner Am. Assoc. Cereal Chem. St. Paul, MN, 1988. P. 161–215.

Grechkin A.N. Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway // Prog. Lipid Res. T.37. 1998. C. 317–352.

Hamberg, M. Oxylipin pathway to jasmonates: biochemistry and biological significance / Hamberg M., Gardner H.W. // Biochim Biophys Acta. 1992. V. 1165. P. 1–18.

Hughes R.K., De Domenico S., Santino A. Plant cytochrome CYP74 family: biochemical features, endocellular localisation, activation mechanism in plant defence and improvements for industrial applications // ChemBioChem. T. 10. -2009. C. 1122–1133.

Lee D. S., Nioche P., Hamberg M. Raman C.S. Structural insights into the evolutionary paths of oxylipin biosynthesis enzymes // Nature. T. 455. 2008. C. 363–370.

Leon, J. Wound signalling in plants / J. Leon, E. Rojo, J.J. Sanchez-Serrano // J Exp Bot. 2001. V. 52. P. 1–9.

Schilmiller, A.L. Systemic signalling in the wound response / A.L. Schilmiller, G.A. Howe // Curr Opin Plant Biol. 2005. V. 8. P. 369–377.

Toporkova Y.Y. Double function hydroperoxide lyases/epoxyalcohol synthases (CYP74C) of higher plants: identification and conversion into allene oxide synthases by site-directed mutagenesis / 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. // BBA Molecular and Cell Biology of Lipids. T. 1863. -2018. C. 369–378.

Toporkova Y.Y. Epoxyalcohol synthase of Ectocarpus siliculosus. First CYP74-related enzyme of oxylipin biosynthesis in brown algae / Toporkova Y.Y., Fatykhova V.S., Gogolev Y.V., Khairutdinov B.I., Mukhtarova L.S., Grechkin A.N. // Biochim. Biophys. Act. 2017. T. 1862. C. 167–175.

Toporkova Y.Y., Gorina S.S., Mukhitova F.K., Hamberg M., Ilyina T.M., Mukhtarova L.S., Grechkin A.N. Identification of CYP443D1 (CYP74 clan) of Nematostella vectensis as a first cnidarian epoxyalcohol synthase and insights into its catalytic mechanism / Toporkova Y.Y., Gorina S.S., Mukhitova F.K., Hamberg M., Ilyina T.M., Mukhtarova L.S., Grechkin A.N. // Biochim. Biophys. Acta. T. 1862. 2017. C. 1099–1109.

Toporkova, Y.Y. Detection of the first higher plant epoxyalcohol synthase: Molecular cloning and characterisation of the CYP74M2 enzyme of spikemoss Selaginella moellendorffii / Toporkova Y.Y., Smirnova E.O., Gorina S.S., Mukhtarova L.S., Grechkin A.N. // Phytochemistry. -2018. V. 156. P. 73–82.

Vick, B.A. Pathways of fatty acid hydroperoxide metabolism in spinach leaf chloroplasts / B.A. Vick, D.C. Zimmerman // Plant Physiology. 1987. V. 85. P. 1073–1078.

Wang, X. Signaling functions of phosphatidic acid / X. Wang, S.P. Devaiah, W. Zhang, R. Welti // Prog Lipid Res. 2006. V. 45. P. 250–78.

Wasternack, C. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development / Ann Bot. 2007. V. 100. P. 681–697.

Wasternack, C. The wound response in tomato–role of jasmonic acid / C. Wasternack, I. Stenzel, B. Hause, G. Hause, C. Kutter, H. Maucher, J. Neumerkel, I. Feussner, O. Miersch // J Plant Physiol. 2006. V. 163. P. 297–306.

Xue, H. Involvement of phospholipid signaling in plant growth and hormone effects / H. Xue, X. Chen, G. Li // Curr Opin Plant Biol. 2007. V. 10. P. 483–9.

Савченко Т.В., Застрижная О.М., Климов В.В. Оксилипины и устойчивость растений к абиотическим стрессам // Биохимия. Т.79. 2014. С. 458–475.

УДК 535.36 + 577.336 + 541.18.535 + 577.323.2

НОВЫЙ СПОСОБ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ДОСТАВКИ БИОМОЛЕКУЛ НА ОСНОВЕ МОНОСЛОЕВ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ С ПРИМЕНЕНИЕМ ИК-ЛАЗЕРА

Е.С. Авдеева, Т.Е. Пылаев, Н.Г. Хлебцов

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

Новейшие разработки в области генно-инженерных, клеточных, тканевых и иммунобиологических технологий способствуют развитию современных биомедицинских исследований. Одной из таких технологий являются системы для внутриклеточной доставки терапевтических агентов, в первую очередь, лекарственных препаратов и генетических конструкций. Ожидается, что успешное применение подобных систем приведет к «пересмотру» традиционных представлений о способах лечения наиболее опасных заболеваний – аутоиммунных, онкологических, инфекционных и пр., и переходу медицины на качественно новый «персонализированный» уровень. Однако одной из основных проблем при переносе технологии генной терапии в клиническую практику является нехватка общедоступных способов для эффективной и безопасной целевой доставки векторов, несущих специфическую ДНК или РНК. Поэтому разрабатываемые системы должны обладать целым рядом параметров, таких как применимость с высокой эффективностью для различных типов клеток, тканей и организмов; возможность доставки объектов с варьируемыми физико-химическими параметрами; минимальное повреждающее действие (выживаемость клеток), максимальная эффективность (количество загруженных и экспрессируемых векторов), относительная дешевизна и простота исполнения [1]. Одними из традиционно используемых векторов в генной терапии являются вирусные векторы из-за их высокой эффективности трансфекции. Однако их использование в клинике ограничено проблемами безопасности, такими как иммуногенность, инсерционный мутагенез самих векторов [2]. В настоящее время активно развиваются альтернативные системы для внутриклеточной доставки генов на основе безвирусных систем, химических агентов, наноматериалов, с применением разного рода физических воздействий (механическая микроинъекция, электропорация, сонопорация, лазерное облучение [3]) и пр. Использование последнего варианта в комбинации с плазмонными наночастицами (т.н. плазмонная оптопорация клеток, или лазерная трансфекция), главным образом наночастицами золота (ЗНЧ), является крайне перспективным направлением современной биомедицины [4]. Воздействие лазерного излучения на ЗНЧ приводит к усилению электромагнитного поля и локальному высокотемпературному нагреву плазмонной частицы, что в свою очередь вызывает различные системные эффекты на живые клетки. Известно, что в зависимости от выбранных параметров лазерного излучения и ЗНЧ можно вызвать, например, осмотический шок и гибель клеток вследствие денатурации белков и генерации высокого внутриклеточного давления, либо неповреждающее воздействие на клетки образующимися вблизи мембран кавитационных пузырьков. Сочетанное неповреждающее воздействие лазерного облучения и ЗНЧ на клеточную мембрану может быть основой для создания эффективных способов внутриклеточной доставки биомолекул [5]. Основным параметром при выборе оптимального кандидата для лазерной трансфекции (или плазмонной оптопорации) клеток является полное или частичное перекрывание плазмонного пика золотых наночастиц с длиной волны лазерного излучения [3].

Проводимые нами исследования направлены на разработку и оптимизацию нового варианта плазмонной оптопорации для внутриклеточной доставки нуклеиновых кислот на основе кратковременного увеличения проницаемости мембран клеток, выращенных на монослоях плазмонно-резонансных наночастиц под воздействием ИК-лазерного излучения [6]. Типичная схема экспериментов состояла из нескольких этапов: иммобилизации ЗНЧ на предварительно активированных поливинилпиридином (ПВП) лунках культуральных планшетов [7]; выращивание животных клеток на слоях ЗНЧ; кратковременное однократное воздействие лазерным облучением и дальнейшее культивирование клеток для детекции результатов оптопорации и их жизнеспособности. Оптимизация процедуры включала тщательный подбор всех параметров ЗНЧ (плотность монослоя, способ иммобилизации, размер частиц и т. д.) [8], а также режимов лазера (мощность, длина волны, длительность облучения, рабочая температура и т. д.). Количественная валидация эффективности

разработанного метода оптопорации клеток проводилась с использованием традиционного арсенала инструментов, модельных объектов, и методов статистической обработки данных. Эффективность трансфекции оценивалась интегрально по двум параметрам: количеству трансфицированных клеток и их выживаемости. Клетки линии HeLa были взяты как одни из наиболее хорошо изученных модельных объектов для генной инженерии и внутриклеточной доставки. В качестве модельных агентов для доставки были выбраны: непенетрирующий флуоресцентный краситель пропидиум иодид (ПИ), а также ДНК-плазмиды, несущие гены флуоресцентных белков. Препаративное количество плазмид было наработано с помощью технологии молекулярного клонирования в клетках E. coli. Источником непрерывного лазерного облучения был 808 нм непрерывный лазер с расфокусированным пятном по диаметру облучаемой поверхности. В качестве импульсного источника использовалась установка с наносекундным 1064-нм лазерным излучателем с сильно фокусированным пучком с пятном около 3 мкм. Облучение проводили в 3D сканирующем режиме со скоростью сканирования 0.05 м/с, что обеспечивало расстояние между отдельными пачками импульсов 50–100 мкм. Длины волн выбранных источников располагаются вблизи плазмонного пика используемых монослоев наночастиц, и находятся в окне прозрачности биотканей, что минимизирует воздействие самого лазерного излучения на клетки. В результате проведенных серий экспериментов были найдены оптимальные параметры для эффективной внутриклеточной доставки молекул ПИ. Наиболее перспективными из всех протестированных типов частиц (наностержней, нанозвезд и наносфер) с различными характеристиками оказались монослои золотых нанозвезд с плазмонным резонансом 800 нм с поверхностной плотностью Au ~ 15 мкг/см^2. Оптимальными параметрами двух выбранных источников лазерного излучения являются: температурный диапазон 42–45 °C, энергия облучения 75 Дж (интенсивность лазера, площадь и время облучения 1 Вт/см^2; 0.5 см^2, и 150 с соответственно) для непрерывного лазера; энергия импульса 15 мкДж при длительности импульса 200 нс, частоте повторения 10 кГц для импульсного лазера.

Таким образом, представленный новый метод внутриклеточной доставки генетических конструкций, является простой и удобной системой с высокими параметрами эффективности и выживаемости клеток. Мы надеемся, что проведенные исследования могут быть востребованы в лабораторной и клинической практике, как основа новых разработок, в области клеточной инженерии, генной терапии, молекулярной диагностики, фармакологии и пр., направленных на переход к персонализированной медицине и улучшению качества жизни и здоровья населения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (иммобилизация и характеристика монослоев наночастиц с заданными параметрами в рамках проекта № 18–14–00016, эксперименты по оптопорации клеток в рамках проекта № 17–74–10090).

ЛИТЕРАТУРА

Glover D.J., Lipps H.J., Jans D.A. Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans // Nat Rev Genet. 2005. V. 6 (4). P. 299–310.

Pack D.W., Hoffman A.S., Pun S., Stayton P.S. Design and development of polymers for gene delivery // Nat Rev Drug Discov 2005. V. 4 (7). P. 581–93.

Stewart M.P., Langer R., Jensen K.F. Intracellular Delivery by Membrane Disruption: Mechanisms, Strategies, and Concepts // Chem. Rev. 2018. V. 118 (16). P. 7409–7531.

Chen G., Roy I., Yang C., Prasad P.N. Nanochemistry and nanomedicine for nanoparticle-based diagnostics and therapy // Chem. Rev. 2016. V. 116. P. 2826–2885.

Lakshmanan S., Gupta G.K., Avci P., Chandran R., Sadasivam M., Jorge A.E.S., Hamblin M.R. Physical energy for drug delivery; poration, concentration and activation // Adv. Drug Deliv. Rev. 2014. V. 71. P. 98–114.

Pylaev T., Vanzha E., Avdeeva E., Khlebtsov B., Khlebtsov N. A novel cell transfection platform based on laser optoporation mediated by Au nanostar layers // Journal of Biophotonics. 2019. V. 12. Art. No e201800166.

Vanzha E., Pylaev T., Prilepskii A., Golubev A., Khlebtsov B., Bogatyrev V., Khlebtsov N. Cell culture surfaces with immobilized gold nanostars: a new approach for laser-induced plasmonic cell optoporation // Proc. SPIE. 2017. No 10336.

Pylaev T., Avdeeva E., Khlebtsov B., Zakharevich A., Khlebtsov N. A novel centrifuge-based approach for tunable 2D layering of plasmonic nanoparticles // Proc. SPIE. 2018. No110671I.

УДК 575.174.015.3

НУКЛЕОТИДНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ СИНТЕЗА NOD-ФАКТОРА ШТАММА SINORHIZOBIUM MELILOTI АК555 – ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОГО СИМБИОНТА ЛЮЦЕРНЫ

А.С. Саксаганская, В.С. Мунтян, Ю.В. Лактионов, М.Л. Румянцева, Б.В. Симаров

ВНИИСХМ, Санкт-Петербург, Пушкин-8, Россия

Взаимодействие между клубеньковыми бактериями и бобовыми растениями – это широко изучаемая модель молекулярно-генетического взаимодействия микро- и макросимбионта, при котором ферментативный аппарат ризобий трансформирует атмосферный азот в аммоний. В результате биологического процесса азотфиксации происходит накопление белка, что обуславливает повышение урожайности (ц/га) зеленой массы и семенной продукции бобовых растений. Этот процесс является экологически чистым, низкоэнергозатратным и уменьшает потребность в экзогенных азотных удобрениях.

Sinorhizobium meliloti АК555 – высокоэффективный штамм, выделенный из клубенька дикорастущего растения люцерны вида Medicago falcata на северо-западе Казахстана. Этот штамм также формирует высокоэффективный симбиоз с разными сортами растений люцерны Medicago sativa подвида varia (сорта Агния, Вега 87 и Селена), согласно данным географической сети опытов [1]. В симбиозе со штаммом АК555 средняя сухая масса растений в среднем увеличивалась на 215,6 % по сравнению с контрольными не обработанными штаммом растениями. Установлено также, что штамм АК555 формировал эффективный симбиоз с модельным диплоидным видом люцерны – M. truncatula и неэффективный с растениями M. polymorpha в модельных микровегетационных опытах. Секвенирование геномов высокоэффективных штаммов является важным этапом для поиска маркеров симбиотической активности клубеньковых бактерий.

Геном штамма АК555 секвенирован с использованием методов высокопроизводительного секвенирования 2-го и 3-го поколения (MiSeq и MinION; [2]). Установлено, что геном АК555 содержит хромосому SMc длиной 3 675 т. п.н., две мегаплазмиды SMa и SMb – 1 328 т. п.н. и 1 658 т. п.н., соответственно, а также две криптические плазмиды SMd и SMe, размер которых составляет 31 и 442 т. п.н., соответственно. Последовательность генома Sinorhizobium meliloti АК555 депонирована в GenBank (PZMI00000000).

Проведен анализ нуклеотидных последовательностей генов nodA, nodB и nodC, которые локализованы на симбиотической мегаплазмиде и детерминируют синтез основной структуры сигнальной молекулы Nod-фактора, необходимой для взаимодействия с растениями-хозяевами. Размеры нуклеотидных последовательностей генов nodA, nodB и nodC были сходны с размерами последовательностей указанных генов у референс-штамма Rm1021 и составили, соответственно 591, 654 и 1281 п.н. В последовательности гена nodA выявлена одна синонимичная нуклеотидная замена, а в последовательности nodB – две нуклеотидные замены, также не приводящие к замене аминокислот в последовательности белкового продукта гена. В случае гена nodC, кодирующего N-ацетилглюкозаминилтрансферазу, выявлено пять нуклеотидных замен, две из которых являются несинонимичными.

Таким образом, в структуре nod генов штамма АК555, детерминирующих синтез основной структуры сигнальной молекулы Nod-фактора, выявлены однонуклеотидные замены, которые в случае nodA и nodB являлись синонимичными, а в случае nodC – несинонимичными.

Данная работа выполнена при поддержке РНФ № 17–16–01095 (секвенирование генома АК555) и РФФИ № 17–04–02011а (анализ структуры симбиотических генов и симбиотических свойств штамма).

ЛИТЕРАТУРА

1. Юрков А.П. и др., 2017, Анализ симбиотической эффективности бактериальных и грибных препаратов на кормовых культурах по данным урожайности семян // Кормопроизв, № 3, сс. 16–21.

2. Muntyan V.S. et al., Draft Genome Sequence of Sinorhizobium meliloti AK555 // Microbiol Resour Announc, 2019, 8:e01567–18.

УДК 579.663

РАЗРАБОТКА CRISPR-CAS9 СИСТЕМЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА ДРОЖЖЕЙ YARROWIA LIPOLYTICA НА ПРИМЕРЕ СИНТЕЗА В-КАРОТИНА

***М.О. Таратынова*, Е.Ю. Юзбашева, Ю.М. Косихина, С.П. Синеокий**

Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт, Москва, Россия

Аскомицетовые дрожжи Yarrowia lipolytica могут быть использованы для производства химических веществ класса терпенов, в частности β-каротина. Сам β-каротин применяется главным образом в пищевой и кормовой промышленности.

Создание стабильных производственных штаммов требует повышения уровня экспрессии генов, кодирующих ферменты, которые участвуют в синтезе заданного продукта. Однако, традиционный метод редактирования генома предполагает встраивание экспрессионной кассеты совместно с маркером. Перед вторым раундом встраивания новой генетической кассеты необходимо удалить генетический маркер используя сайт-специфическую рекомбинацию с помощью системы Cre-Lox, что является долгим и трудоемким процессом. Более того, дрожжи Y. lipolytica характеризуются высокой эффективностью негомологичной рекомбинации и относительно низкой эффективностью гомологичной рекомбинации, что значительно затрудняет встраивание генетической конструкции в заданный локус генома.

В настоящее время набирает популярность технология редактирования генома с помощью системы CRISPR-Cas9, которая позволяет осуществить интеграцию генов в заданный локус генома без интеграции селективных маркеров. CRISPR-ассоциированный белок Cas9 является эндонуклеазой, которая связывается с единой направляющей РНК (sgRNA), состоящей в свою очередь из направляющей CRISPR-РНК (crRNA) и транс-кодируемой CRISPR-РНК (tracrRNA) (1). 20 нуклеотидов 5’ концевой последовательности crRNA определяет сайт-мишень на ДНК по принципу комплементарности. Эта ДНК-мишень описывается формулой 5’ – N20-NGG-3’, где N обозначает любой нуклеотид, а NGG – смежный мотив протоспейсера (PAM). Сначала Cas9 распознаёт PAM, а после этого прилегающая ДНК проверяется на комплементарность crRNA. Затем в результате Cas9-sgRNA опосредованного разрезания ДНК-мишени образуется двухцепочечный разрыв. В результате репарации такого разрыва путем негомологичной рекомбинации с высокой частотой возникают ошибки (делеции или инсерции пар нуклеотидов), что может приводить к инактивации гена. Для репарации двунитевого разрыва путем гомологичной рекомбинации необходимо также введение генетической кассеты, содержащей участки гомологии к заданному локусу. Данная генетическая кассета может содержать гомологичные или гетерологичные гены которые будут интегрированы в выбранный локус на хромосоме.

Таким образом, целью данной работы является разработка CRISPR-Cas9 системы редактирования генома дрожжей Y. lipolytica на примере конструирования гетерологичного пути синтеза β-каротина. Исходя из обзора литературы и анализа генома in silico были выбраны локусы для интеграции (Int) в геном Y. lipolytica, не содержащие кодирующих генов. В данной работе нами был собран путь биосинтеза β-каротина в дрожжах Y. lipolytica в следующей последовательности: 1) гетерологичные гены, кодирующие бифункциональные ферменты фитоенсинтазу и ликопинсинтазу (carRP) и фитоэндегидрогеназу (carB) из Mucor circinelloides (2), а так же ген Y. lipolytica GGS1, кодирующий геранилгеранил дифосфат синтазу, которые совместно приводят к синтезу геранилгеранилдифосфата, фитоена, ликопина и β-каротина; 2) ген Y. lipolytica HMGR1, кодирующий гидроксиметилглутарил-КоА-редуктазу, синтезирующую мевалонат; 3) ген Y. lipolytica ERG20, кодирующий геранил / фарнезилдифосфатсинтазу, участвующую в синтезе фарнезилдифосфата; 4) ERG12, кодирующий мевалонаткиназу, фосфорилирующую мевалонат. Для интеграции выбранных генов были сконструированы эписомальные плазмиды, содержащие целевые гены с промоторами и терминаторами, экранированные гомологичными хромосомальными областями к заданным локусам, а также ген устойчивости к антибиотику гигромицину (hph). Каждая экспрессионная кассета была сконструирована таким образом, чтобы целевые гены были интегрированы в два различных локуса (Рис. 1). С помощью программы ChopChop (3) были выбраны по две нуклеотидных последовательности ДНК мишени в заданных локусах генома Y. lipolytica. Были сконструированы эписомальные плазмиды pCNR-sgInt (по две для каждого локуса), содержащие ген, кодирующий эндонуклеазу Cas9, нуклеотидную последовательность, кодирующую направляющую sgRNA к локусам Int, а также ген устойчивости к антибиотику нурсеотрицину (Nat).

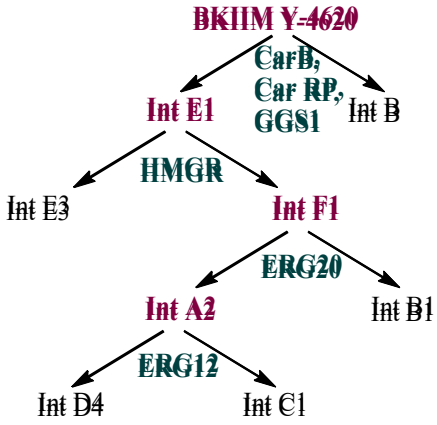


Рисунок 1. Этапы конструирования пути синтеза β-каротина в дрожжах Y. lipolytica при использовании CRISPR-Cas9 опосредованной системы интеграции целевых генов в локусы Int

На первом этапе осуществляли ко-трансформацию генетической кассеты, содержащей гены CarB, CarRP, GGS1, и эписомальной плазмиды pCNR-sgInt в штамм ВКПМ Y-4620, накапливающий нейтральные липиды до 50 % от сухого веса и способный утилизировать сахарозу в качестве источника углерода. Генетическую кассету CarB-CarRP-GGS1 использовали как в виде эписомальной плазмиды, так и в виде линеаризованного фрагмента. Использование CarB-CarRP-GGS1 кассеты в виде эписомальной плазмиды не привело к появлению трансформантов оранжевого цвета, в отличие от линеаризованного фрагмента, где около 80 % полученных трансформантов характеризовались ярко-оранжевым цветом колоний. Таким образом, в дрожжах Y. lipolytica для репарации двунитевого разрыва, вызванного Cas9-sgRNA опосредованным разрезанием ДНК-мишени, необходимо введение генетической кассеты с гомологичными фланками в виде линеаризованного фрагмента.

Интересно отметить, что эффективность интеграции при использовании разных sgRNA для одного и того же локуса могла сильно отличаться. Например, при встраивании генетической кассеты в локус IntF1 наблюдалась эффективность 100 % для двух выбранных sgRNA, при интеграции в локус IntC1 – 100 % и 17 % для двух разных sgRNA, соответственно, а встраивание генетической кассеты в локус IntA2 с использованием одного варианта sgRNA не прошло совсем, а для другого варианта эффективность составила 40 %.

Культивирование рекомбинантных штаммов проводилось в пробирках с общим объемом 50 мл и рабочим объемом 5 мл в богатой среде YPSuc9, содержащей 90 г./л сахарозы. Штамм, содержащий CarB-CarRP-GGS1 кассету, интегрированную в локус IntB, характеризовался снижением скорости роста по сравнению со штаммом, содержащим данную кассету в локусе IntE1. Поэтому для дальнейшей работы был выбран штамм ВКПМ Y-4620 IntE1: CarB-CarRP-GGS, который накапливал 7,9 мг/г сухого веса β-каротина. Наибольший эффект на продукцию β-каротина оказало повышение уровня экспрессии гена HMGR1 при его интеграции в локус IntF1 (накопление β-каротина увеличилось на 16 % по сравнению с родительским штаммом), тогда как интеграция гена HMGR1 в локус IntE3 повысила продукцию β-каротина только на 9 %. Интеграция гена ERG20 в локусы IntA2 и IntB1 повысила уровень накопления β-каротина на 23 % и 12 %, соответственно, относительно штамма ВКПМ Y-4620 IntE1: CarB-CarRP-GGS. Повышение уровня экспрессии гена ERG12 посредством его интеграции в локусы IntD4 и IntC1 не повлияло на продукцию β-каротина.

Таким образом в ходе проделанной работы была разработана CRISPR-Cas9 система редактирования генома дрожжей Y. lipolytica и сконструирован штамм ВКПМ Y-4620 IntE1: CarB-CarRP-GGS IntF1:HMGR1 IntA2:ERG20, продуцирующий 9,7 мг/г сухого веса (214 мг/л) β-каротина.

Работа выполнена при финансовой поддержке государства (Государственное задание № 595–00003–19 ПР) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.

ЛИТЕРАТУРА

Schwartz C. et al. Standardized markerless gene integration for pathway engineering in Yarrowia lipolytica //ACS synthetic biology. – 2016. – Т. 6. – №. 3. – С. 402–409.

Gao S. et al. Iterative integration of multiple-copy pathway genes in Yarrowia lipolytica for heterologous β-carotene production //Metabolic engineering. – 2017. – Т. 41. – С. 192–201.

https://chopchop.cbu.uib.no

Актуальная биотехнология

№3 (30), 2019

УДК 328

СОЗДАНИЕ УСТОЙЧИВЫХ К ВИРУСУ ШАРКИ КОСТОЧКОВЫХ КУЛЬТУР БИОИНЖЕНЕРНЫМИ МЕТОДАМИ

Т.Н. Сидорова[1.2], В.Р. Тимербаев[1.2.3], Л.Ю. Муринец[1], О.А. Шульга[3], А.С. Пушин[1.3], А.П. Фирсов[1.3], С.В. Долгов[1,2,3]

[1] Институт биоорганической химии им. акад. М.М, Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (Филиал), Московская обл., Россия

[2]. Никитский ботанический сад-Национальный научный центр, г. Ялта, Крым

[3]. Всероссийский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия

В последние годы вирус оспы сливы (PPV), возбудитель болезни Шарка, стал главной угрозой для выращивания косточковых плодовых растений. Этот вирус нанес огромный экономический ущерб и вызвал значительное уменьшение производственных площадей. Вирус оспы сливы распространился по всему миру и классифицирован карантинными службами растений как наиболее опасный патоген для абрикосов, слив и персиков. За последние 10–15 лет он зафиксирован на большинстве косточковых плодовых культурах в южных регионах стран СНГ [Митрофанова и др., 2001, 2009]. В настоящее время наука не может предложить никаких способов лечения вирусных заболеваний растений, а уничтожение зараженных деревьев остается единственным способом сдерживания распространения вирусов.

Современная биотехнология включает несколько подходов для повышения устойчивости растений к вирусным патогенам. В настоящее время наибольшее распространение получило использование вирусных генов или их фрагментов для придания PDR – (pathogen -derived resistance) устойчивости к вирусным заболеваниям (Lomonossoff G.P. 1995). При этом в геном растения встраивается вирусный ген в прямой или обратной ориентации (косупрессия или антисенс–технология), либо шпилечная конструкция, содержащая самокомплементарные фрагменты трансгена, разделенные интроном (технология РНК-интерференции) (Agrawal N et al., – 2003. Baulcombe D.C. 2001, Beachy, R.N.et al., 1990). Ранее получение трансгенных сортов косточковых культур тормозилось отсутствием надежных методик, способных обеспечить достаточно высокую частоту регенерации ее побегов in vitro, поэтому большинство работ проводилось с использованием материалов зародышевого происхождения, что не позволяло сохранить исходные сортовые характеристики. Но к настоящему времени в лаборатории экспрессионных систем и модификации генома растений “Биотрон”, ФИБХ РАН разработана методика регенерации растений из соматических тканей сливы домашней (Prunus domestica L.), и подвоев косточковых культур, что позволило получить трансгенные растения сорта "Стартовая" и подвоев «Элита» и 1–146 с сохранением исходного генотипа сорта.

С использованием вектора для РНК-интеренференционного ингибирования вируса возбудителя Шарки сливы (PPV) получены пять независимых трансгенных растений (RNAi-1, RNAi-2, RNAi-3, RNAi-4, RNAi-6) Prunus domestica L. районированного сорта «Стартовая». Трансгенные линии сливы были инфицированы вирусом Шарка (PPV-M) путем окулировки почками, взятых с зараженных растений. После пяти лет культивирования в условиях теплицы все растения показали высокую степень устойчивости к данному вирусу, что также подтверждено с помощью молекулярно-биологических и иммунологических методов (ОТ-ПЦР, DAS-ELISA, Вестерн блоттинг, ImmunoStrip тест). Результаты работы показывают, что использование метода РНК-интерференции позволяет получать трансгенные растения сливы со стабильной устойчивостью к вирусным заболеваниям.

В целях изучения возможности использования позитивной селекции на основе гена фосфоманнозизомеразы (pmi) в создании трансгенных растений плодовых культур, свободных от селективных генов устойчивости к антибиотикам и / или гербицидам растения разработана эффективная система агробактериальной трансформации листовых эксплантов сливы (Prunus domestica L.) с использованием маннозы как селективного агента, позволяющая сохранить исходные сортовые качества растений сливы сливы сорта Стартовая были трансформированы штаммом A. tumefaciens CBE21 несущим вектор pNOV35SGFP. Листовые экспланты были помещены на питательную среду содержащую различные концентрации и комбинации маннозы и сахарозы для разработки эффективной системы селекции. Девять трансгенных независимых линий растений сливы были получены на питательной среде содержащей 2 % сахарозы и 1,5 % маннозы. Наибольшая частота трансформации (1,4 %) наблюдалась при использовании отсроченной схемы селекции.

Начиная с первых дней после трансформации и заканчивая регенерацией побегов из трансгенного каллуса проводили мониторинг отбора трансгеных клеток с использованием GFP флуоресценции. Интеграция трансгенов manA и gfp была подтверждена с помощью PCR анализов. Для определения копийности, геномная ДНК трансгенных растений и растений исходного сорта была обработана HindIII и проанализирована Саузерн блоттингом анализом. Описанная методика трансформации с использованием позитивной manA системы является альтернативным методом для безопасного получения трансгенных растений сливы без селекции на антибиотиках и гербициде, а использование листовых эксплантов позволяет сохранять сортовые характеристики растений сливы.

Для проведения молекулярно-биологического анализа и оценки уровня экспрессии репортерного гена GFP в растениях сливы трансформированных конструкциями обеспечивающими локализацию гетерологичного белка в различных компартментах клетки (вакуоль, эндоплазматический ретикулюм, цитозоль) использовали культивируемые в условиях защищенного грунта растения сливы домашней трансформированные векторами pNOV35SGFP, pCam35SGFP и pGAGFP-AFVY содержащими гены, кодирующие разные формы GFP. Известно, что за внутриклеточную локализацию белка отвечают сигнальные пептиды, входящие в аминокислотную последовательность. Так, в векторе pCam35SGFP химерный ген GFP включал последовательности, кодирующие N-концевой сигнальный пептид из хитиназы арабидопсиса и С-концевой тетрапептид HDEL для локализации продукта экспрессии в эндоплазматическом ретикулуме (ретикулярная форма GFP). В векторе pGAGFP-AFVY химерный ген GFP включал последовательности, кодирующие N-концевой сигнальный пептид из хитиназы арабидопсиса и С-концевой сигнальный пептид AFVY из фазеолина фасоли, обеспечивающий накопление белка в вакуолях (вакуолярная форма GFP). В векторе pNOV35SGFP ген GFP не включал (кодировал) сигнальные последовательности (цитозольная форма GFP). Во всех векторах использовали кодон-оптимизированный для экспрессии в растениях ген GFP под контролем CaMV 35S промотора.

В ходе работы показано влияние компартментализации продуктов экспрессии гетерологичных генов на примере репортерного гена GFP на уровень экспрессии зеленого флюоресцирующего белка. Полученные результаты продемонстрировали возможность использования лидерных последовательностей из генетически отдаленных видов растений для генетической трансформации сливы. При сравнении трансгенных линий сливы результаты показали визуально детектируемые различия в уровне экспрессии гена GFP. Линии с цитозольной формой GFP (особенно) линия #9 имели более высокий уровень экспрессии GFP по сравнению с линиями с вакуолярной и ретикулярной формами GFP. При этом интенсивность флуоресценции GFP в листьях растений сливы коррелировала с уровнем накопления белка GFP). Также было отмечено, что уровень экспрессии GFP сильно варьировал между линиями, содержащими ген, кодирующий одну и ту же форму GFP.

На основе разработанных ранее протоколов индукции морфогенеза на листовых тканях клоновых подвоев абрикоса АП и № 146–2 (L.Y. Mourenets and S.V. Dolgov, 2016) проводились исследования по разработке способов их генетической трансформации. В качестве исходного материала был выбран подвой № 146–2, как более широко используемый в промышленных насаждениях и демонстрирующий лучшую регенерационную способность. Для проведения генетической трансформации использовался обезоруженный супервирулентный агробактериальный штамм CBE 21, несущий бинарный вектор pBINmGFP5ER, содержащий гены gfp (репортерный ген) и nptII (ген устойчивости к канамицину.

Первые регенеранты появлялись через 3 недели после трансформации, были как экспрессирующие GFP, так и не проявлявшие экспрессию побеги. Предположительно, GFP-отрицательные регенеранты не являются трансгенами, но способны расти на эксплантах с трансгенными клетками (GFP-положительными каллусами).

Проведена генетическая трансформация клонового подвоя сливы Элита векторной конструкций CamPPVRNAi. В результате получили две независимые трансгенные линии. Частота трансформации клонового подвоя сливы в среднем составила 0.5 %. Укорененные трансгенные побеги успешно адаптировали к условиям защищенного грунта. Проведено заражение трансгенных растений сливового подвоя «Элита» (линия RNAi-1, полученных в результате трансформации вектором CamPPVRNAi) проводили методом окулировки почками, взятыми с растений сливы инфицированными вирусом Шарки.в августе 2017 года в условиях зимней теплицы.

Окулировку почками, взятыми с растений сливы инфицированными вирусом PPV (серотип M), проводили в период активногосокодвижения растений. Одновременно с трансгенными растениями проводили заражение вирусом контрольных нетрансгенных растений подвоя «Элита». Все привитые почки прижились, часть из них образовали побеги, которые будут являться постоянным источником вируса, что позволило оценить эффективность перенесенной шпилечной кассеты для придания устойчивости к вирусу Шарки.

Визуальная оценка трансгенных и нетрансгенных растений сливового подвоя «Элита» показала развитие симптомов вируса Шарка, таких как хлоротичные пятна и кольца на листьях, а также наличие деформации листовой пластинки на листьях контрольных растений и на листьях побегов, проросших из зараженных почек, привитых на трансгенные растения. В то же время на трансгенных растениях в течение всего времени наблюдения визуальные симптомов болезни Шарка не проявлялись. Проведенный одновременно с визуальными наблюдениями иммуноферментный анализ (ИФА) на присутствие белка оболочки вируса PPV в тканях трансгенных и нетрансгенных растений инокулированных вирусом полностью подтвердил результаты визуальной диагностики. В трансгенных растениях сливы белок оболочки вируса не был обнаружен, тогда как во всех контрольных нетрансгенныхинокулированных растениях, а также в проросших прививках, белок оболочки вируса PPV присутствовал.

Создана кассета экспрессии на основе фрагментов генома вируса Шарки для генерирования РНК интерференции в полученных растениях, в том числе с использованием системы рекомбинации для создания цисгенных растений, не содержащих генов селективных антибиотик. В дальнейшей работе будет использован вектор с индуцируемой гомологичной рекомбинацией для создания растений, не содержащих генов селективных антибиотиков MF2 имеющий дополнительный селективный ген hpt, обеспечивающий устойчивость к антибиотику гигромицину.

В дальнейшем для создания косточковых культур, устойчивых к вирусу PPV, было решено применить подход РНК-интерференционного ингибирования генов трансляционных факторов растения-хозяина. Известно, что эукариотические факторы инициации трансляции являются детерминантами устойчивости растений против восприимчивости к потивирусам. Белок eIF4E связывается с 5`-структурой мРНК и является ключевым звеном при инициации биосинтеза белка. eIF4E ассоциирован с eIF4G, вместе они формируют комплекс eIF4F. eIF4G – поддерживающий, структурный белок осуществляющий взаимодействие между другими факторами инициации. Последовательности ДНК промоторов, интронов и терминаторов были амплифицированы с геномной ДНК подвоя персика. Последовательности генов факторов инициации трансляции амплифицированы с кДНК сорта Родзинка. Все версии промоторов, а также терминаторов взяты с последовательностями 5`- и 3`-нетранслируемых регионов соответственно, поскольку их присутствие способно значительно увеличить уровень экспрессии. В качестве спейсера между плечами «шпильки» использованы интроны генов ACO2 и RBCS персика длиной 178 и 371 п.н. соответственно. Способность к сплайсингу проверена по базам онлайн.

РНК-интерференционные кассеты были собраны в векторе pUCXB1 (pUC18 с добавленными сайтами рестрикции. Векторы были так спроектированы по типу «конструктора» таким образом, чтобы все сайты, использованные для клонирования, остались целыми сохранили свою уникальность после последнего шага клонирования, и их можно было затем использовать для замены тех или иных элементов. Все стыки фрагментов генов в конструкциях содержат лишь по одному 6-членному палиндрому без дополнительного генетического «мусора» и остатков полилинкеров.

Проведена агробактериальная трансформация сорта сливы «Стартовая» векторной конструкцией pMF2-TFRNAi6’ (R10–4isoE). Вектор сконструирован на основе системы pMF2, с удаляемыми селективными маркерами устойчивости к гигромицину, а также содержит интереференционные шпилечные последовательности, комплементарные гену транскрипционного фактора 4isoE косточковых культур. Анализ ДНК, выделенной из листовых тканей этих побегов, подтвердил перенос гена устойчивости к антибиотику в геном полученных линий. Дальнейший анализ показал, что полноразмерная последовательность экспрессионной кассеты pMF2 присутствует в одной из изучаемых линий. Это открывает возможность исследовать изменение устойчивости к вирусу PPV у плодовых косточковых культур.

Также проведена агробактериальная генетическая трансформация сливового и абрикосового клонового подвоя 146–2. Для переноса использовался обезоруженный супервирулентный штамм агробактерий A.tumefaciens CBE21, содержащий вектор pMF1-R6–4isoG с селективным маркерным геном неомицин-фосфотрансферазы (nptII) и кассету интерференционного ингибирования целевых генов трансляционных факторов на основе фрагментов гена eIF4isoG.

В результате экспериментов получено 6 трансгенных линий, частота трансформации составила 0.35–0.69 %. Из линий была выделена тотальная ДНК с помощью набора реактивов ThermoScientific для выделения и очистки геномной ДНК и проведен ПЦР-анализ на наличие гена nptIIи целевых генов.

Полученные линии подтвердили свой трансгенный статус и были укоренены на среде ½ MS, содержащей 20 г./л сахарозы, витамины MS, 0.5 мг/л ИМК и 30 мг/л канамицина. После адаптивного периода укорененные растения были выданы в теплиц. Линия с переносом всех генов, полученная первой, была привита путем окулировки материалом от зараженного вирусом Шарки растения (слива, сорт Стартовая). С началом вегетации будет проведен анализ привитых растений (9 растений трансгенной линии и 5 контрольных растений) на наличие у них симптомов и вирусного агента в растительных тканях. Таким образом, будет проведена оценка устойчивости трансгенных растений к вирусу Шарки.

В дальнейшем предполагается разработать эффективную методику генетической трансформации как подвоев, так и сортов абрикоса и получить устойчивые к вирусу Шарки сливы формы в том числе и с использованием технологии элиминации маркерных генов.

Для редактирования генома с помощью системы CRISPR-Cas9 необходимо подобрать и оценить функциональность гидовых РНК, комплементарных участкам гена-мишени. Обязательным условием для выбора потенциальной гидовой РНК является наличие прилегающего к протоспейсеруPAM мотива 5'-NGG-3′. Для выбранных участков генов eIFiso4E иеIFiso4G по этому критерию удалось обнаружить более 40 мест посадки гидовой РНК. Помимо присутствия PAM мотива для выбора эффективных гидовых РНК необходимо учитывать достаточно обширный набор факторов и правил, описывающих GC состав, последовательность, прилегающую к PAM, наличие повторяющихся нуклеотидов, консерватизм по отношению к другим аллельным вариантам гена, и один из самых важных критериев – присутствие в геноме косточковых «ложных» мишеней. После тщательного анализа потенциальных гидовых РНК с учетом всех вышеперечисленных факторов удалось отобрать по 10 последовательностей для генов трансляционных факторов. Двадцать плазмид с уникальными последовательностями гидовых РНК были наработаны, очищены и проверены рестрикционным анализом. После секвенирования эти векторы использованы для in vitro транскрипции гидовых РНК и анализа эффективности выбранных последовательностей в экспериментах с белком Cas9 и субстратом, содержащем фрагмент гена-мишени. В качестве таковых выступили промежуточные векторы, созданные на предыдущих этапах работ при создании плазмид для получения интра-генных растений косточковых с помощью технологии РНК интерференции.

Эксперименты по расщеплению векторов с генами-мишенями белком Cas9 позволили определить наиболее эффективно работающие гидовые РНК. Для каждого гены были отобраны по 3 РНК, в присутствии которых происходит внесение разрывов с эффективностью более 50 %. Эти гидовые РНК в дальнейшем будут использованы для редактирования геномов косточковых культур и получению, в конечном итоге, устойчивых к вирусу оспы сливы растений.

ЛИТЕРАТУРА

Sidorova T, Mikhailov R, Pushin A, Miroshnichenko D, Dolgov S. Agrobacterium-mediated Ttransformation of Russian commercial plum cv “Startovaya”. Front Plant Sci (2019), 10.286

Sidorova T, Pushin A, Miroshnichenko D, Dolgov S. Generation of transgenic rootstock plum ((Prunus pumila L. P. salicina Lindl.) (P. cerasifera Ehrh.)) using hairpin-RNA construct for resistance to the plum pox virus. Agronomy (Basel) (2018), 8 (1).

Sidorova T, Mikhailov R, Pushin A, Miroshnichenko D, Dolgov S. A non-antibiotic selection strategy uses the phosphomannose-isomerase (PMI) gene and green fluorescent protein (GFP) gene for Agrobacterium-mediated transformation of Prunus domestica L. leaf explants. Plant Cell Tissue Organ Cult (2017), 128 (1) 197–209.

Mourenets, L.Y. and Dolgov, S.V. (2016). Adventitious shoot regeneration from leaf explants of two apricot rootstocks. Acta Hortic. 1139, 285–290

Sidorova, T.N., Vagapova, T.I. and Dolgov, S.V. (2016). Intron-hairpin-RNA construct provides stable resistance to Plum pox virus in plum cultivar ‘Startovaja’. Acta Hortic. 1110, 197–202

УДК 66.047

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ДИВИНИЛЭФИРСИНТАЗЫ (ДЭС): ПОЛУЧЕНИЕ, ОЧИСТКА, АНАЛИЗ ПРОДУКТОВ РЕАКЦИИ

Е.О. Смирнова, М.Е. Воробьева, С.С. Горина, Е.К. Аскарова, Т.М. Ильина, Я.Ю. Топоркова, А.Н. Гречкин

Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр РАН, Казань, Россия.

Дивинилэфирсинтазы (ДЭС) принадлежат к цитохромам Р450 семейства CYP74. Помимо ДЭС, в это семейство ферментов входят алленоксидсинтазы (АОС), гидропероксидлиазы (ГПЛ) и эпоксиалкогольсинтазы (ЭАС). Ферменты CYP74 являются нетипичными представителями Р450, так как им для каталитического действия не нужен кислород. Субстратами ферментов CYP74 у растений являются 9- и 13-гидроперекиси линолевой и альфа-линоленовой кислот.

Ферменты семейства CYP74 играют важную роль в липоксигеназном каскаде, продуктами функционирования которого являются оксилипины. Эти соединения широко распространены в организмах, принадлежащих к разным таксонам. Интерес к механизмам биосинтеза оксилипинов обусловлен высокой практической значимостью веществ этого класса. Они являются сигнальными соединениями, обеспечивающими защитный ответ растений на клеточном, организменном, популяционном и межвидовом уровне, что может быть использовано в агропромышленном производстве и биотехнологии. Оксилипины ответственны за многие свойства растений, характеризующие их в качестве сырья и пищевых продуктов.

Продуктами дивинилэфирсинтазной ветви липоксигеназного каскада являются дивиниловые эфиры. Данные соединения обладают ярко выраженными антимикробными свойствами (Toporkova et al., 2018). ДЭС были обнаружены у небольшого числа видов растений из разных таксонов. Так, например, 9-специфичные ДЭС были обнаружены в растениях табака (Fammartino et al., 2007), томата (Song et al., 1993), картофеля (Stumpe et al., 2001), перца (Gullner et al., 2010). ДЭС, утилизирующие 13-гидроперекиси жирных кислот, были выявлены в растениях льна-долгунца (Gogolev et al., 2012), лютика едкого (Gorina et al., 2014) и древнейшего сосудистого растения Selaginélla moellendorffii (Gorina et al., 2016). ДЭС, утилизирующая 9/13-гидроперекиси жирных кислот, была найдена в луковицах чеснока (Itoh, Howe, 2001).

К настоящему времени имеются данные о том, что ряд ферментов CYP74 из разных подсемейств могут обладать двойным типом катализа. Так, для АОС томата (CYP74C3) была показана минорная активность типа ГПЛ в реакциях с 9-гидроперекисью линолевой кислоты (Toporkova et al., 2008). У ряда ферментов подсемейства CYP74C, ранее описанных как ГПЛ, была обнаружена дополнительная ЭАС активность; следует отметить, что с некоторыми субстратами данная активность преобладала (Toporkova et al., 2018 (2)). У ДЭС подобного поведения зафиксировано не было. Однако на возможный дуалистичный характер ДЭС указывают спектрофотометрические данные. Активность ДЭС можно наблюдать не только по уменьшению субстрата, но и по увеличению продукта (длина волны дивиниловых эфиров 250 нм – для производных линолевой кислоты и 267 нм – для производных альфа-линоленовой кислоты). Кривая Михаэлиса-Мэнтена некоторых ДЭС указывает на возможный аллостерический эффект. Однако для ферментов CYP74 такая кинетика не описана. И, как правило, данное поведение принимают за наличие артефактов. Никто не анализировал продукты реакции в случае, когда по спектрофотометрическим данным субстрат расходуется, но дивиниловых эфиров не образуется. В связи с этим изучение ДЭС представляет особый интерес для исследователей.

Получение и характеристика рекомбинантных ДЭС будет рассмотрено на примере ДЭС табака (NtDES, CYP74D3). Для получения рекомбинантного фермента NtDES (CYP74D3) использовали бактериальный плазмидный вектор pET-32 Ek/LIC (для клонирования использовали метод безлигазного клонирования) и клетки E. coli штамма Rosetta-gami(DE3)pLysS B (Novagen, США). Образующийся рекомбинантный белок содержит концевую последовательности His×Tag, позволяющую проводить очистку с помощью металлоаффинной хроматографии. Процедура наработки целевого белка была разработана на основе нескольких общепринятых протоколов. Ночную культуру клеток E. coli (10 мл) выращивали в среде LB, разведенной 1 объемом минеральной среды M9 и содержащей 500 мг/л ампициллина, 35 мг/л хлорамфеникола, 12,5 мг/л тетрациклина и 15 мг/л канамицина при 37° С и умеренной аэрации (180 об/мин) в течение 6 ч, после чего культуру выдерживали при 4° С в течение 14 ч.

Затем ночную культуру добавляли в 1 л свежей среды LB, разведенной 1 объемом среды M9, добавив вышеупомянутые антибиотики в тех же концентрациях. Полученную культуру клеток выращивали при 37° С и интенсивной аэрации (250 об/мин) до достижения культурой значения оптической плотности OD_{600} = 0,6. Оптическую плотность измеряли с помощью спектрофотометра Lambda 25 (Perkin-Elmer, США). Клеточную суспензию быстро охлаждали до 18° С на ледяной бане, немедленно добавляли индуктор ИПТГ в конечной концентрации 0,5 мМ и предшественник гема – 5-аминолевулиновую кислоту – из расчета 115 мг/л. Кроме того, в среду вносили дополнительное количество ампициллина из расчета 100 мг/л для компенсации его разрушения бета-лактамазой бактерий в ходе роста культуры. Индуцированную культуру инкубировали в течение 8–14 ч при умеренной аэрации (180 об/мин) и пониженной температуре

(18° С), после чего собирали центрифугированием (4500 об/мин, 15 мин, 4° С) и лизировали с помощью реагента для экстракции белков BugBuster (Novagen, США). Количество целевого белка в клетках оценивали по результатам электрофоретического разделения тотальных белков лизатов в полиакриламидном геле (SDS-PAGE, окрашивание геля красителем Coomassie Brilliant Blue R-250) с использованием системы PowerPac Universal MiniProtein (Bio-Rad, США) по прилагаемой инструкции. Полученные рекомбинантные белки очищали методом металлоаффинной хроматографии с использование картриджей Bio-Scale Mini Profinity IMAC и хроматографической системы BioLogic LP (Bio-Rad, США). Рекомбинантный фермент элюировали из картриджей с использованием 100 мМ Na-фосфатнго буфера (pH 7,5), содержащим 50 мМ гистидина. Концентрации рекомбинантного белка определяли с использованием набора для анализа белка Quant-iT^{TM} HS (Invitrogen, США). Концентрацию гемопротеина оценивали с помощью анализа гемохромогена (Schenkman et al., 2006).

Каталитическую активность очищенных ферментативных препаратов определяли по снижению оптической плотности в минуту при 234 нм. Измерения проводили с использованием спектрофотометра PB 2201 B (ЗАО «СОЛАР», Беларусь). Концентрация субстрата составляла 40 мкмоль. Анализ проводили при 25 °C в 100 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7,5). Для расчета скорости реакций использовали первоначальные линейные участки кинетических кривых. Коэффициент молярной экстинкции для 9- и 13-гидроперекисей жирных кислот при 234 нм равен 25000 M^{-1} $см^{-1}$. Для каждого варианта проводили не менее пяти измерений.

В результате данной работы было показано, что фермент NtDES утилизировал 9-гидроперекиси жирных кислот (9-ГПОД и 9-ГПОТ) и не проявлял активности в отношении 13-гидроперекисей жирных кислот. При участии данного фермента 9-ГПОД превращалась в колнелевую кислоту – продукт, характерный для 9-специфичных дивинилэфирсинтаз. Но в реакциях с 9-ГПОТ образовывались в равных количествах продукты дивинилэфирсинтазной (колнеленовая кислота) и гидропероксидлиазной (9-оксононановая кислота) активности. Таким образом, было показано, что фермент NtDES обладал двойной ДЭС/ГПЛ активностью в зависимости от используемого субстрата. Описанная методика подходит для получения и характеристики и других ферментов CYP74.

Работы по получению фермента CYP74D3 (NtDES) поддержаны грантом РФФИ 18–34–01012-мол_а. Работы по очистке рекомбинантного фермента CYP74D3 (NtDES) проводились при финансовой поддержке государственного задания Федерального исследовательского центра "Казанский научный центр Российской академии наук".

ЛИТЕРАТУРА

1. Stumpe, M., Kandzia, R., Gobel, C., Rosahl, S., and Feussner I. (2001) A pathogen-inducible divinyl ether synthase (CYP74D) from elicitor-treated potato suspension cells, FEBS Letters. 507, 371–376.

2. Toporkova, Y.Y., Bessolitsyna, E.K., Smirnova, E.O., Gorina, S.S., Petrova O.E., Mukhtarova, L.S., and Grechkin, A.N. (2018) Antimicrobial activity of geometric isomers of etherolenic acid – the products of plant lipoxygenase cascade, Dokl. Biochem. Biophys. 480, 139–142.

3. Toporkova, Y.Y., Gorina, S.S., Bessolitsyna, E.K., Smirnova, E.O., Fatykhova, V.S., Brühlmann, F., Ilyina, T.M., Mukhtarova, L.S., and Grechkin, A.N. (2018) Double function hydroperoxide lyases/epoxyalcohol synthases (CYP74C) of higher plants: identification and conversion into allene oxide synthases by site-directed mutagenesis, Biochim. Biophys. Acta. 1863(4), 369–378 (2).

4. Gorina, S.S., Toporkova, Y.Y., Mukhtarova, L.S., Chechetkin, I.R., Khairutdinov, B.I., Gogolev, Y.V., and Grechkin, A.N. (2014) Detection and molecular cloning of CYP74Q1 gene: identification of Ranunculus acris leaf divinyl ether synthase, Biochim Biophys Acta. 1841, 1227–1233.

5. Gorina, S.S., Toporkova, Y.Y., Mukhtarova, L.S., Smirnova, E.O., Chechetkin, I.R., Khairutdinov, B.I., Gogolev, Y.V., Grechkin A.N. (2016) Oxylipin biosynthesis in spikemoss Selaginella moellendorffii: Molecular cloning and identification of divinyl ether synthases CYP74M1 and CYP74M3, Biochim Biophys Acta. 1861, 301–309.

6. Schenkman, J.B., and Jansson, I. (2006) Spectral analyses of cytochromes P450, Meth. Mol. Biol. 320, 11–18.

7. Gogolev, Y.V., Gorina, S.S., Gogoleva, N.E., Toporkova, Y.Y., Chechetkin, I.R., and Grechkin, A.N. (2012) Green leaf divinyl ether synthase: gene detection, molecular cloning and identification of a unique CYP74B subfamily member, Biochim. Biophys. Acta 1821, 287–294.

8. Song, W.C., Funk, C.D., and Brash, A.R. (1993) Molecular cloning of an allene oxide synthase – a cytochrome-P450 specialized for the metabolism of fatty acid hydroperoxides, Proc. Natl Acad. Sci USA 90, 8519–8523.

9. Fammartino, A., Cardinale, F., Göbel, C., Mène-Saffrané, L., Fournier, J., Feussner, I., and Esquerré-Tugayé M.T. (2007) Characterisation of a divinyl ether biosynthetic pathway specifically associated with pathogenesis in Nicotiana tabacum, Plant Physiol 143, 378–388.

10. Toporkova, Y.Y., Gogolev, Y.V., Mukhtarova, L.S., and Grechkin, A.N. (2008) Determinants governing the CYP74 catalysis: conversion of allene oxide synthase into hydroperoxide lyase by site-directed mutagenesis, FEBS Letters 582, 3423–3428.

11. Itoh, A., Howe, G.A. (2001) Molecular cloning of a divinyl ether synthase. Identification as a CYP74 cytochrome P-450, J. Biol. Chem 276, 3620–3627.

12. Gullner, G., Künstler, A., Király, L., Pogány, M., and Tóbiás, I. (2010) Up-regulated expression of lipoxygenase and divinyl ether synthase genes in pepper leaves inoculated with Tobamoviruses, Physiological and Molecular Plant Pathology 74, 387–393.

УДК 66.047

ОСОБЕННОСТИ КАТАЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЦИТОХРОМОВ Р450 СЕМЕЙСТВА CYP74

В.С. Фатыхова, Е.О. Смирнова, М.Е. Воробьева, Е.К. Аскарова, С.С. Горина, Т.М. Ильина, Я.Ю. Топоркова, А.Н. Гречкин

Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение ФИЦ "Казанский научный центр Российской академии наук", Казань, Россия

В процессе жизнедеятельности растения постоянно подвергаются воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды, таких как поранение, поражение патогенными микроорганизмами, засуха, холод, чрезмерное воздействие света или ограниченное питание. Чтобы выжить в условиях неблагоприятной окружающей среды, растения используют широкий спектр физиологических механизмов, позволяющий распознавать стрессовое воздействие или атаку патогена и вызывать множественные быстрые защитные реакции (Leon et al., 2001; Noordermeer et al., 2001).

Важное место в осуществлении процессов ответа на неблагоприятные факторы окружающей среды занимает липоксигеназный каскад. Липоксигеназный каскад представляет собой совокупность ферментативных реакций, в ходе которых мембранные липиды преобразуются в ряд оксилипинов при участии липоксигеназ и цитохромов Р450 семейства CYP74 (Grechkin, 1998; Brash 2009). Оксилипины являются мощными липидными медиаторами, которые играют важную роль в различных биологических процессах. Будучи важными регуляторами и маркерами широкого спектра нормальных и патологических процессов, оксилипины являются популярным предметом изучения. Среди ферментов семейства CYP74, катализирующих образование оксилипинов у растений в рамках липоксигеназного каскада, принято выделять следующие: аллеоксидсинтаза (AOC) – участвует в образовании сигнальных молекул – жасмонатов и циклопентенонов (Browse, 2005), гидропероксидлиаза (ГПЛ) – отвечает за синтез альдокислот и летучих защитных соединений, составляющих «запах зеленых листьев» (Savchenko et al., 2014), дивинилэфирсинтаза (ДЭС) и эпоксиалкогольсинтаза (ЭАС) – генерируют ряд антимикробных и фунгицидных оксилипинов (Prost et al., 2005).

AOC и ГПЛ являются широко распространенными и изученными растительными ферментами, тогда как ДЭС и ЭАС менее распространены и соответственно менее изучены. AOC входят в подсемейства CYP74A и CYP74C. ДЭС являются членами подсемейства CYP74B, CYP74D, CYP74H, CYP74M и CYP74Q. ЭАС входят в состав подсемействCYP74A и CYP74M (Gorina et al., 2016; Toporkova et al., 2018 (1); Toporkova et al., 2019), и ГПЛ являются представителями подсемейств CYP74B, CYP74C, CYP74E, CYP74F и CYP74G.

В 2018 году было показано, что предполагаемые 9/13-специфичные ГПЛ подсемейства CYP74C проявляют дополнительную эпоксиалкогольсинтазную активность (Toporkova et al., 2018 (2)). Первоначально было обнаружено, что рекомбинантный фермент CYP74C13_MT люцерны (Medicago truncatula) ведет себя преимущественно как ЭАС в отношении 9(S) – гидроперекиси линолевой кислоты (9-ГПОД). В то же время данный фермент проявляет ГПЛ активность в отношении 13(S) – гидроперекисей линолевой и α-линоленовой кислот (13-ГПОД и 13-ГПОТ соответственно). Чтобы проверить, является ли этот феномен случайностью или закономерностью, было исследовано еще пять ГПЛ подсемейства CYP74C (CYP74C4_ST (Solanum tuberosum), CYP74C2 (Cucumis melo), CYP74C1_CS и CYP74C31 (Cucumis sativus), CYP74C13_GM (Glycine max). Все проанализированные ферменты ведут себя преимущественно как ЭАС в отношении 9-ГПОД. Кроме того, фермент CYP74C31 обладает дополнительной алленоксидсинтазной активностью в отношении данного субстрата. Таким образом, был продемонстрирован дуалистичный характер каталитического действия данных ферментов (Toporkova et al., 2018 (2)). Результаты описанной работы позволили по-новому взглянуть на характер каталитического действия ферментов CYP74.

К настоящему времени дуалистичный характер каталитического действия был продемонстрирован для ряда ферментов CYP74 из различных подсемейств. Так, в продуктах превращения 9-ГПОД при участии эпоксиалкогольсинтазы плаунка Selaginélla moellendorffii (CYP74M2) в минорных количествах были обнаружены α-кетол и 9-оксононановая кислота (AOC и ГПЛ продукты соответственно).

Ферменты из подсемейства CYP74B, включающие в себя 13-гидропероксидлиазы, а также ДЭС льна-долгунца (CYP74B16, LuDES), в зависимости от субстрата проявляют ГПЛ либо ЭАС активность. Подобными свойствами обладает и ДЭС лютика едкого (CYP74Q1, RaDES). При участии ДЭС табака (CYP74D3, NtDES) 9-ГПОД превращается в продукт, характерный для 9-специфичных ДЭС. Но в реакциях с 9-ГПОТ образуются в равных количествах продукты ДЭС и ГПЛ, таким образом, 9-специфичный фермент табака обладает ДЭС/ГПЛ активностью. Эти данные расширяют знания о функционировании одной из важнейших сигнальных систем растений – липоксигеназного каскада.

Исследования ферментов CYP74B16 и CYP74D3 поддержаны грантом РФФИ 18–34–01012 мол_а. Исследования ферментов подсемейства CYP74B проводились при поддержке гранта МК-5989.2018.4. Работы по очистке рекомбинантных ферментовпроводились при финансовой поддержке государственного задания Федерального исследовательского центра "Казанский научный центр Российской академии наук".

ЛИТЕРАТУРА

Leon, J. Wound signalling in plants / J. Leon, E. Rojo, J.J. Sanchez-Serrano // J Exp Bot. 2001. Vol. 52. N.354. P. 1–9.

Noordermeer, M.A. Fatty acid hydroperoxide lyase: a plant cytochrome P450 enzyme involved in wound healing and pest resistance / M.A. Noordermeer, G.A. Veldink, J.F. Vliegenthart // Chem Bio Chem. 2001. Vol. 2. N.7–8. P. 494–504.

Grechkin, A.N. Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway / Prog Lipid Res. 1998. Vol. 37. N.5. P. 317–352.

Brash, A.R. Mechanistic aspects of CYP74 allene oxide synthases and related cytochrome P450 enzymes / Phytochemistry. 2009. Vol. 70. N.13–14. P. 1522–1531.

Browse, J. Jasmonate: an oxylipin signal with many roles in plants / Vitam Horm. 2005. Vol. 72. P. 431–456.

Savchenko T.V. Oxylipins and plant abiotic stress resistance / T.V. Savchenko, O.M. Zastrijnaja, V.V. Klimov //Biochemistry (Mosc) 2014. Vol. 79(4). P. 362–375.

Prost, I. Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens / I. Prost, S. Dhondt, G. Rothe, J. Vi 164 cente, M.J. Rodriguez, N. Kift, F. Carbonne, G. Giffiths, M. T. Esquerre-Tugaye, S. Rosahl, C. Castresana, M. Hamberg, J. Fournier // Plant Physiol. 2005. Vol. 139. N. 4. P. 1902–1913.

Gorina, S.S. Oxylipin biosynthesis in spike moss Selaginella moellendorffii: Molecular cloning and identification of divinyl ether synthases CYP74M1 and CYP74M3. / S.S. Gorina, Y.Y. Toporkova, L.S. Mukhtarova, E.O. Smirnova, I.R. Chechetkin, B.I. Khairutdinov, Y.V. Gogolev, A.N. Grechkin // BiochimBiophysActa. (BBA). 2016. V.1861(4). P. 301–309.

Toporkova Y.Y. Epoxyalcohol synthase RjEAS (CYP74A88) from the japanese buttercup (Ranunculus japonicus): Cloning and characterization of catalytic properties / Y.Y. Toporkova, V.S. Fatykhova, S.S. Gorina, L.S. Mukhtarova, A.N. Grechkin.

Toporkova Y.Y. Detection of the first higher plant epoxyalcohol synthase: Molecular cloning and characterisation of the CYP74M2 enzyme of spike moss Selaginella moellendorffii / Y.Y. Toporkova, E.O. Smirnova, S.S. Gorina, L.S. Mukhtarova, A.N. Grechkin // Phytochemistry 2018. Vol. 156. P.73–82.

Toporkova Y.Y. Double function hydroperoxidelyases/epoxyalcohol synthases (CYP74C) of higher plants: identification and conversion into allene oxide synthases by site-directed mutagenesis / Y.Y. Toporkova, S.S. Gorina, E.K. Bessolitsyna, E.O. Smirnova, V.S. Fatykhova, F. Brühlmann, T.M. Ilyina, L.S. Mukhtarova, A.N. Grechkin // BiochimBiophysActaMol Cell Biol Lipids. 2018. Vol. 1863(4). P. 369–378.

Schaller A. Enzymes in jasmonate biosynthesis: structure, function, regulation / A. Schaller, A. Stintzi // Phytochemistry 2009. Vol. 70. P. 1532–1538.

Wasternack, C. The wound response in tomato–role of jasmonic acid / C. Wasternack, I. Stenzel, B. Hause, G. Hause, C. Kutter, H. Maucher, J. Neumerkel, I. Feussner, O. Miersch // J Plant Physiol. 2006. Vol. 163. N.3. P. 297–306.

УДК 579.66

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МАНИПУЛЯЦИИ ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ТРАНСПОРТЕР ЦИТРАТА, НА ПРОДУКЦИЮ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ ДРОЖЖАМИ YARROWIA LIPOLYTICA

***Ю.М. Косихина*, Е.Ю. Юзбашева, А.В. Шутов, М.О. Таратынова, С.П. Синеокий**

Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт, Москва, Россия

Органические кислоты по объему производства являются одним из главных продуктов микробного синтеза и имеют широкое применение в сельскохозяйственной, пищевой, фармацевтической и химической промышленностях. Лимонная кислота широко применяется в сельском хозяйстве, в пищевой, фармацевтической и химической промышленностях. Изолимонная кислота может быть использована для создания препаратов для профилактики и лечения гипоксии.

Известно, что природные изоляты дрожжей вида Yarrowia lipolytica непатогенны, пригодны для пищевых продуктов и также способны продуцировать смесь лимонной и изолимонной кислот в условиях избытка углерода и голодания по азоту, фосфору или сере. В качестве источника углерода они используют глюкозу, спирты, ацетаты и гидрофобные субстраты (такие как алканы, жирные кислоты и масла). Следует отметить, что источник углерода определяет соотношение концентраций лимонной и изолимонной кислот в их смеси. Так, при культивировании на глюкозе Y. lipolytica продуцирует преимущественно лимонную кислоту [1]. При культивировании на гидрофобных субстратах продукция лимонной кислоты значительно снижается и соотношение органических кислот смещается в сторону изолимонной кислоты [2]. Синтез лимонной и изолимонной кислот происходит в результате реакций цикла Трикарбоновых кислот в митохондрии. Внутренняя мембрана митохондрии непроницаема для интермедиантов цикла Трикарбоновых кислот. Транспорт метаболитов через внутреннюю мембрану митохондрии в цитозоль осуществляется с помощью белков, принадлежащих к семейству митохондриальных транспортеров. Нами был выявлен и охарактеризован главный митохондриальный транспортер цитрата в дрожжах Y. lipolytica (YlYhm2p) [3]. Целью данного исследования было изучение влияния повышения экспрессии, а также инактивации гена YlYHM2 в дрожжах Y. lipolytica на продукцию лимонной и изолимонной кислот при культивировании на глюкозе и оливковом масле.

Были сконструированы рекомбинантные штаммы Y. lipolytica ВКПМ Y-4221 (YlYHM2) и ВКПМ Y-3178 (ΔYlYhm2), характеризующиеся, как усилением уровня экспрессии гена YlYHM2, так и инактивацией данного гена, соответственно. Культивирование проводилось в лабораторном ферментере с рабочим объемом 500 мл в минимальной среде с лимитом по азоту и избытком глюкозы или оливкового масла в качестве единственного источника углерода. Продукция лимонной кислоты штаммом ВКПМ Y-4221 (YlYHM2) на среде с глюкозой составила 97.1 г./л, что превосходило на 32.7 % уровень продукции лимонной кислоты для контрольного штамма ВКПМ Y-4221. Накопление изолимонной кислоты штаммом ВКПМ Y-4221 (YlYHM2) наоборот снизилось более чем в 1.4 раза по сравнению с таковым для штамма ВКПМ Y-4221 и составило 6.0 г./л. При культивировании на среде с оливковым маслом штамм ВКПМ Y-3178 (ΔYlYhm2) накапливал 89.3 г./л изолимонной кислоты, тогда как контрольный штамм ВКПМ Y-3178 в этих условиях продуцировал 54.1 г./л изолимонной кислоты. При этом продукция лимонной кислоты штаммами ВКПМ Y-3178 (ΔYlYhm2) и ВКПМ Y-3178 составила 17.1 г./л и 35.4 г./л, соответственно. Таким образом, путем инактивации гена, кодирующего митохондриальный транспортер цитрата, удалось увеличить соотношение концентраций изолимонной кислоты к лимонной кислоте в 3.4 раза с 1.5:1, характерного для контрольного штамма ВКПМ Y-3178, до 5.2:1 для штамма ВКПМ Y-3178 (ΔYlYhm2). Полученный результат превосходит лучшие данные по соотношению концентраций изолимонной кислоты к лимонной, опубликованные ранее в научной литературе и равные 4.3:1 [2].

В результате проведенной работы было продемонстрировано, что повышение уровня экспрессии гена YlYHM2 приводит к увеличению продукции лимонной кислоты при культивировании дрожжей Y. lipolytica на глюкозе в качестве единственного источника углерода. При инактивировации гена YlYHM2, в свою очередь, наблюдается значительное увеличение продукции изолимонной кислоты и снижение накопления лимонной кислоты при культивировании на среде, содержащей оливковое масло.

Работа выполнена при финансовой поддержке государства (Государственное задание № 595–00003–19 ПР) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cavallo E. et al. Yarrowia lipolytica: a model yeast for citric acid production / FEMS yeast research. 2017. Т. 17. №. 8. С. fox084.

2. Kamzolova S.V. et al. Isocitric acid production from rapeseed oil by Yarrowia lipolytica yeast / Applied microbiology and biotechnology. 2013. Т. 97, №. 20. с. 9133–9144.

3. Yuzbasheva E.Y. et al. The mitochondrial citrate carrier in Yarrowia lipolytica: Its identification, characterization and functional significance for the production of citric acid / Metabolic engineering. 2019. Т. 54. с. 264-274.

УДК 636.92.082.453.5:591.147

ПОЛУЧЕНИЕ СЕМЕНИ АМЕРИКАНСКОЙ НОРКИ ПРИ ПОМОЩИ ЧРЕЗКОЖНОЙ АСПИРАЦИОННОЙ БИОПСИИ ПРИДАТКА СЕМЕННИКА

Д.В. Попов, Г.Ю. Косовский, С.П. Шипова

Научно-исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства им. В.А. Афанасьева, п. Родники, Россия

Разработка новых репродуктивных биотехнологий в пушном звероводстве – неотъемлемая часть развития отрасли. Для сохранения и тиражирования ценного генетического материала необходимым условием является получение гамет, в том числе, сперматозоидов норок. Полученную сперму можно использовать для искусственного осеменения самок или получения эмбрионов In vitro.

Получение спермы с помощью искусственной вагины у норок невозможно, а посткоитальная аспирация спермы из репродуктивного тракта самки трудозатратна, и полученное семя может быть контаминировано инфекционными агентами. Способ взятия спермы у норок с помощью электроэякуляции требует дополнительного оборудования, и не все попытки заканчиваются получением эякулята. Возможно получение эпидидимальной спермы постмортально или после орхиэктомии, но при этом неизбежна потеря животного-донора.

Получение спермы с помощью чрезкожной аспирационной биопсии уже широко используется в репродуктологии других видов животных и человека. Проводится эта процедура под общей седацией с применением местной анестезии.

Семенники у норок овальные, слегка уплощены, плотные, с хорошо развитыми придатками. Эластичная кожа мошонки позволяет зафиксировать семенник и успешно провести биопсию придатка без надрезов.

Исследование проводилось на базе отдела биотехнологий ФГБНУ НИИПЗК. В опыте использовались 10 голов самцов американской норки.

Перед процедурой животные выдерживались на голодной диете 12 часов для профилактики аспирации рвотных масс. Каждое хирургическое вмешательство сопровождалось антибитикотерапией.

Мошонку брили и обрабатывали с применением спирта этилового ректификованного. Норок располагали на операционном столе лёжа на спине. Операционное поле изолировалось с помощью нетканной самоклеющейся салфетки.

Дозировки для препаратов использовались по Карпентеру для хорьков. В качестве премедикации использовали 0,1 % атропин 0,1 мл на голову и димедрол 0,3 мл на голову внутримышечно за 20 минут до общей анестезии. Для седации использовали Ксилазин 0,2 мг/кг внутримышечно, а для местной инфильтрационной анестезии в области прокола использвали Лидокаин 2 % р-р.

Кожа натягивалась, семенник удерживался мануально. В придаток семенника вводилась игла диаметром 23 G по школе Гейдж, закреплённая на шприце. Поршень шприца оттягивался для создания вакуума, иглу передвигали в придатке семенника поступательными движениями.

Семя во всех случаях было успешно получено. Полученное семя можно характеризовать как густую, мутноватую белёсую жидкость в объёме 0,1-0,2 мл на каждый семенник.

Небольшое количество семени наносилось на тёплое предметное стекло с добавлением капли разбавителя.

Далее оценивали подвижность сперматозоидов. Во всех случаях подвижность не была ниже 0,7 (т. е. поступательные движения совершали не менее 7 сперматозоидов из 10).

Из этого можно сделать вывод, что семя, полученное от американской норки при помощи чрезкожной аспирационной биопсии придатка семенника, пригодно для дальнейших манипуляций.

ЛИТЕРАТУРА

Способ взятия спермы у норок // Патент СССР 635982. 1977.бюл. № 45 / Бернацкий В. Г, Ромбе С.М.

Хонин Г.А., Шестаков В.А., Кулинич Е.Н., Вологжин Е.Г., Овчинников Д.К. Анатомо-топографическая характеристика и гистоструктура семенников норки американской в период гона // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. 2011. № 4.

Carpenter J.W. Exotic Animal Formulary / James W. Carpenter. // – USA: Elsevier. – 2012. – 518p

УДК 579.25

ГЕНОМНЫЕ ОСТРОВА СИМБИОТИЧЕСКИХ АЗОТФИКСИРУЮЩИЙ БАКТЕРИЙ РОДА SINORHIZOBIUM

***М.Е. Черкасова*, В.С Мунтян, А.С. Саксаганская, Б.В. Симаров, М.Л. Румянцева**

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

Геномные острова (ГО) – протяженные интегративные генетические элементы, обладающие потенциальной мобильностью и широко распространенные в геномах бактерий. Функции ГО зависят от функций генов, входящих в их состав, например: острова патогенности (гены вирулентности), антибиотикоустойчивости (гены устойчивости к антибиотикам), экологические (метаболические гены), симбиотические острова (гены, участвующие в процессах симбиоза) [1]. Показано, что штаммы одного вида могут значительно различаться по наличию ГО и их количеству, а также могут одновременно содержать несколько ГО разных типов [2, 3].

Sinorhizobium medicae – симбиотические азотфиксирующие клубеньковые бактерии таксономически родственные S. meliloti, но образующие эффективный симбиоз преимущественно с однолетними видами люцерны. Геномы S. medicae и S. meliloti обладают сходной организацией и состоят из трех основных репликонов: хромосома размером около 3.7 млн. п.н. и две мегаплазмиды, размеры которых варьируют от 1.2 до 1.7 млн. п.н. В хромосомах модельных штаммов S. medicae WSM419 (RefSeq: NC_009636.1) и S. meliloti Rm1021 (RefSeq: NC_003047.1) были выявлены ГО, функции которых не известны. В геноме первого штамма присутствует два ГО: Sme4.42S и Sme4.51K, а в геноме второго штамма – три ГО: Sme21T, Sme19T и Sme80S, протяженность которых составляет от 19 до 80 т. п.н. Каждый из этих островов сайт-специфически встроен в определенный ген тРНК.

В данной работе впервые проанализирована встречаемость двух ГО S. medicae WSM419 и трёх ГО штамма родственного вида S. meliloti Rm1021 у 23 штаммов S. medicae, геномы которых депонированы в базе данных GenBank. Поиск геномных островов проводили согласно алгоритму ISLANDER [4]. На основе полученных данных созданы системы пар праймеров для ПЦР-детекции ГО у природных штаммов S. medicae, представленных 29-ю природными изолятами, выделенными из центров разнообразия люцерн, расположенных на Кавказе и в северной части Казахстана.

В результате, в геномах проанализированных природных штаммов с наибольшей частотой (0.70) был выявлен ГО Sme4.51K штамма S. medicae WSM419. Частота встречаемости второго ГО Sme4.42S штамма WSM419 была в два раза ниже. Также в геномах природных штаммов S. medicae проведен поиск ГО, описанных для Rm1021. Установлено, что два ГО, Sme21T и Sme19T, встречались в среднем с частотой 0.34, тогда как третий ГО Sme80S в геномах проанализированных штаммов S. medicae отсутствовал.

Таким образом, показано, что штаммы видов S. meliloti и S. medicae достоверно различались по наличию и количеству геномных островов ($P = 7.8\times10^{-3}$). Выявлены ГО уникальные для каждого из двух близкородственных видов ризобий, а также ГО общие для рассматриваемых видов, т. е., имевшие идентичные сайты встраивания ГО или «горячие точки» рекомбинации. Высказано предположение, что по указанным сайтам происходит горизонтальный перенос генов внутри вида или между видами, соответственно.

Работа выполнена при поддержке РНФ 17-16-01095 (анализ геномов S. meliloti на наличие геномных островов в сайтах, описанных для S. medicae WSM419) и РФФИ 18-04-01278 а.

ЛИТЕРАТУРА

Juhas et al. 2009. FEMS Microbiol Rev 33, pp. 376-393. doi: 10.1111/j. 1574-6976.2008.00136.x
Мунтян и др. 2016. Генетика. 52(10) : 1126–1133. doi: 10.7868/S0016675816080105
Dobrindt et al. 2004. Nat. Rev. Microbiol. 2(5) : 414-424. doi: 10.1038/nrmicro884
Hudson et al. 2015. Nucleic Acids Res. 43 (Database issue): D48-53. doi: 10.1093/nar/gku1072

УДК 57.088

ЭКСПЕРЕМЕНТАЛЬНОЕ СРАВНЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ДЛЯ СОЗДАНИЯ МОДЕЛИ ГЭБ

Д.А. Сахаров, Ю.М. Аверина, А.Ю. Курбатов, М.А. Ветрова

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева» Москва, Россия

Были разработаны методики анализа состояния клеточных культур ГЭБ. Использованы методы ПЦР и микроскопии для исследования характеристик клеточных культур, входящих в коллекцию. По результатам ПЦР и иммунофлуоресцентного анализа, клетки, выбранные для формирования микрофлюидной клеточной модели ГЭБ, обладают ярко выраженной экспрессией всех характерных маркеров: клетки эндотелия микрососудов головного мозга iPS-EC, дифференцированные из плюрипотентных стволовых клеток IMR90-4, обладают ярко выраженной экспрессией vFW, CD31, ZO1, GLUT1, BCRP, MDR1; иммортализованные перициты сосудов головного мозга imHBVP – ярко выраженной экспрессией αSMA, PDGFRβ; иммортализованные астроциты fHA-hTERT – ярко выраженной экспрессией GFAP, S100β, A2B5, O4.

Разработана методика сокультивирования клеток эндотелия iPS-EC, перицитов и астроцитов для формирования клеточного барьера в составе модели ГЭБ[1, 2].

Для сокультивирования клеток эндотелия, перицитов и астроцитов проведен выбор и экспериментальная оценка микропористых мембран и внеклеточного матрикса. Для адгезии клеток выбраны компоненты ВКМ, близкие к составу базальной мембраны микрососудов головного мозга человека. Для нанесения ВКМ и адгезии клеток выбрана микропористая мембрана из полкарбоната (PC) в составе мембранных вставок Transwell, с площадью мембраны 0,143 см 2, толщиной мембраны 10 мкм, диаметром пор 3 мкм.

Для культивирования клеточной модели ГЭБ в условиях циркуляции питательной среды был выбран микробиореактор (МБР) Homunculus, включающий блок управления и сменный клеточный блок (чип). Теоретически обоснованы и экспериментально подтверждены оптимальные параметры циркуляции питательной среды.

Для анализа проницаемости клеточного барьера в составе модели ГЭБ в качестве модельных веществ были выбраны [13C] сахароза, FITC-декстран 4 кДа, FITC-декстран 70 кДа. Полученные значения проницаемости [13C] Сахарозы через клеточный барьер в условиях циркуляции питательной среды близки к физиологическим значениям коэффициента проницаемости сахарозы. Наиболее плотный, малопроницаемый для FITC-декстранов в течение длительного времени клеточный барьер формируется при культивировании моделей ГЭБ в условиях циркуляции питательной среды при режиме 1,5 ГЦ, ±10 кПа. Проницаемость для FITC-декстранов на 1-2 порядка ниже проницаемости FITC-декстранов через клеточный барьер в составе известных микрофлюидных и статических клеточных моделей ГЭБ, а также на порядок ниже проницаемости ГЭБ для FITC-декстранов in situ[3].

Через 3, 7, 14 и 30 дней после начала культивирования клеточных моделей ГЭБ в МБР были определены следующие параметры клеточного барьера: TEER клеточного барьера; жизнеспособность клеток в составе модели ГЭБ; фенотип клеток в составе модели ГЭБ (экспрессия характерных маркеров клеток эндотелия, перицитов и астроцитов, наличие плотных контактов между клетками эндотелия); проницаемость клеточного барьера для модельных веществ. В результате проведенного экспериментального анализа установлено, что клеточный барьер в составе немодифицированной микрофизиологической клеточной модели ГЭБ обладает следующими характеристиками, сохраняющимися в течение 30 дней после начала культивирования в МБР: высокой жизнеспособностью клеток (более 80 %) в составе клеточного барьера; плотными контактами (ZO1) между клетками эндотелия; TEER, приближенным к физиологическому (> 2000 Ом×см^2); коэффициентом проницаемости для сахарозы, приближенным к физиологическому (3–12×10^{-8} см/с или 0,18–0,72×10-5 см/мин); осуществляет транспорт низкомолекулярных и высокомолекулярных веществ (модельных веществ) между апикальной и базальной стороной клеточного барьера; в клетках эндотелия, перицитах и астроцитах в составе клеточного барьера сохраняется высокая экспрессия характерных маркеров.

Проведена валидация методики сокультивирования клеточных культур, входящих в ГЭБ. В соответствии с методикой сокультивирования получали образцы клеточной модели ГЭБ. Получение образцов осуществляли в трех независимых повторах.

В каждом из повторов в полученных образцах анализировали TEER и проницаемость сахарозы через клеточный барьер в составе сформированных образцов клеточной модели ГЭБ. В каждом из трех независимых повторов получены близкие значения TEER и коэффициентов проницаемости сахарозы. Результаты валидации указывают на то, что получение клеточной модели ГЭБ в соответствии с разработанной методикой сокультивирования приводит к формированию клеточного барьера со стабильно воспроизводимыми характеристиками [2].

Также была проведена модификация клеточных культур с использованием технологии CRISPR/Cas для создания модели ГЭБ с заданными свойствами. Для модификации были выбраны астроциты fHA-hTERT. С помощью технологии CRISPR/Cas был проведен нокаут гена GFAP в астроцитах, проведена селекция и выбран клон, у которого отсутствовала достоверная экспрессия GFAP. Клетки-потомки выбранного клона были заморожены в достаточном количестве для формирования банка модифицированных с помощью CRISPR/Cas клеточных культур, предназначенных для создания модели ГЭБ[4,5].

Соглашение о предоставлении субсидии № 14.583.21.0066

ЛИТЕРАТУРА

1. K.L. Sellgren, B.T. Hawkins, and S. Grego, “An optically transparent membrane supports shear stress studies in a three-dimensional microfluidic neurovascular unit model.,” Biomicrofluidics, vol. 9, no. 6, p. 061102, Nov. 2015.

2. D.S. Grant, C.P. Leblond, H.K. Kleinman, S. Inoue, and J.R. Hassell, “The incubation of laminin, collagen IV, and heparan sulfate proteoglycan at 35 degrees C yields basement membrane-like structures.,” J. Cell Biol., vol. 108, no. 4, pp. 1567–74, Apr. 1989.

3. L. Shi, M. Zeng, Y. Sun, and B.M. Fu, “Quantification of Blood-Brain Barrier Solute Permeability and Brain Transport by Multiphoton Microscopy,” J. Biomech. Eng., vol. 136, no. 3, p. 031005, Feb. 2014.

4. F.R. Walter et al., “A versatile lab-on-a-chip tool for modeling biological barriers,” Sensors Actuators B Chem., vol. 222, pp. 1209–1219, Jan. 2016

5. F. Alqahtani, E.A. Chowdhury, R. Bhattacharya, B. Noorani, R. Mehvar, and U. Bickel, “Brain Uptake of [13C] and [14C] Sucrose Quantified by Microdialysis and Whole Tissue Analysis in Mice.,” Drug Metab. Dispos., vol. 46, no. 11, pp. 1514–1518, Nov. 2018.

УДК 328

МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ КРАСНОКНИЖНОГО РАСТЕНИЯ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ HEDYSARUM CRETACEUM FISCH

С.Д. Бакулин

Ботанический сад ЮФУ, Ростов-на-Дону, Россия

Сегодня помимо таких методов сохранения редких видов растений как создание коллекций, банков семян и органов, большой популярностью пользуется метод микроклонального размножения. Благодаря нему возможно за короткое время получить больше количество безвирусных растений-регенарнтов, используя всего один или несколько эксплантов. Благодаря свои преимуществам, данный метод является надежным и высокопродуктивным способом воспроизводства охраняемых видов растений.

Отсюда **целью работы** является поиск наиболее подходящей питательной среды для потенциального создания культуры растений Hedysarum cretaceum Fisch. в асептических условиях для сохранения генофонда популяций данного вида в нашем регионе.

Задачи исследования:

1) Подобрать наиболее эффективный способ стерилизации посадочного материала. 2) Выявить оптимальную концентрацию фитогормонов для пролиферации побегов Hedysarum cretaceum Fisch. 3) Провести статистический анализ коэффициента пролиферации побегов Hedysarum cretaceum Fisch. с учетом использования разных сред и фитогормонов в различных концентрациях. 4)Заложить опыт по изучению влияния различных концентраций ауксинов на степень ризогенеза растений Hedysarum cretaceum Fisch.

Объектом исследования является копеечник меловой – степной травянистый многолетник, облигатный меловик, имеющий в КК РО статус 1 а – вид, находящийся под угрозой исчезновения, в КК РФ – 3, редкий вид. Эндемик степной части бассейнов Дона и Волги. Семенная продуктивность высокая, однако, семенное размножение затруднено, так как семена обладают твёрдосемянностью, как и многие другие дикорастущие представители семейства бобовых [1–3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использовался семенной материал Hedysarum cretaceum Fisch., собранный на территории Питомника краснокнижных и исчезающих видов растений Ростовской области Ботанического сада ЮФУ. Исследование проводилось на базе лаборатории клеточных и геномных технологий растений Ботанического сада ЮФУ.

В качестве методик стерилизации и предпосевной обработки использовались следующие:

Скарификация семян ножданой бумагой с последующим промыванием их в спирте и сулеме в течение 3 и 2 минут соответственно. Затем производилась трехкратная промывка семян дистиллированной водой в течение 10 минут.

Промывание семян в дистиллированной воде в течение 15 минут с последующей обработкой 96 % спиртом (2 минуты) и обжигом в пламени горелки (1 сек.).

После проращивания производился пассаж растений на питательные среды Мурасиге-Скуга (MS) и Драйвера и Кинюуки (DKW). Для пролиферации в среды добавлялся БАП в различных концентрациях, а также смесь БАП и ИУК. На этапе укоренения растений-регенрантов в среды вносились ИМК и ИУК. Также производилась закладка контрольных проб. В процессе исследования выявлялись такие показатели, как коэффициент пролиферации (среднее количество побегов на один эксплант), а также средние длина и количество корней на растение. Значения коэффициента пролиферации растений на разных средах сравнивались между собой с помощью t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее эффективной методикой стерилизации семян оказалась термическая, т. е. с промыванием их в спирте и обжигом в пламени горелки – стерильными оказались 87,5 % семян, где 20 % не проросли. Предположительно, это связано с тем, что зародыши были повреждены слишком высокими температурами пламени, так как известно, что кожура семян копеечников отличается меньшей толщиной по сравнению с семенами многих других представителей семейства бобовых [4]. Обжиг по всей видимости оказывает не только стерилизирующий, но и скарифицирующий эффект. Скарификация ножданой бумагой привела к заражению 86 % семян.

Удалось выяснить, что эффективные концентрации гормонов для мультипликации побегов на средах MS и DKW составляют БАП 0,5 мг/л в сочетании с ИУК 0,1 мг/л. Эти данные согласуются с литературной информацией о том, что комбинации различных регуляторов роста часто обладают высоким синергическим действием [5,6]. При анализе данных было выявлено достоверное превышение коэффициента пролиферации по сравнению с контролем для следующих вариантов опыта: БАП 0,5, 1,0, 2,5 мг/л как отдельно, так и вместе с использованием ИУК 0,1 мг/ л – в случае со средой MS; БАП 0,5 и 1,0 мг/л, а также для всех вариантов опыта с совместным использованием БАП и ИУК – в случае со средой DKW.

Средние значения коэффициента пролиферации при использовании среды DKW оказались выше по сравнению с таковыми для среды MS, однако достоверное превышение данного показателя при статистическом сравнении было установлено только для одного варианта опыта, где присутствовал лишь БАП в концентрации 1,0 мг/л. Скорее всего такие данные можно объяснить достаточно близкими значениями сравниваемых выборок. Исходя из вышесказанного, нельзя с полной уверенностью утверждать, что среда DKW действительно является более подходящей для пролиферации побегов Hedysarum cretaceum Fisch.

На текущем этапе исследования пока не удалось получить данных, отражающих степень корнеобразования растений-регенрантов на средах MS и DKW по причине того, что постановка эксперимента требует большего количества времени, чем было запланировано.

ВЫВОДЫ

Наиболее эффективной методикой стерилизации оказалась термическая обработка с использованием спирта в качестве обеззараживающего средства, а также пламени горелки, обладающего не только стерилизующим, но и скарифицирующим действием.

Наиболее эффективными концентрациями гормонов для мультипликации побегов на средах MS и DKW составили БАП 0,5 мг/л в сочетании с ИУК 0,1 мг/л.

Исходя из статистических данных среда DKW не является более подходящей для пролиферации побегов Hedysarum cretaceum Fisch. по сравнению со средой MS.

Данные по корнеобразованию растений-регенрантов исследуемого вида пока не были получены. Планируется продолжение исследования с дальнейшим анализом и оформлением результатов.

ЛИТЕРАТУРА

Красная книга Ростовской области / Министерство природных ресурсов и экологии Ростовской области: Издание 2-е. Ростов-на-Дону: Минприроды Ростовской области, 2014. – Т. 2. Растения и грибы. – 344 с.

Супрун Н.А. Копеечники (Hedysarum L.) Нижнего Поволжья: изменчивость и систематика – Дисс… кандидата биологических наук. – Москва, 2014. – 160 с.

Николаева М.Г., Разумова М.В., Гладкова В.Н. Справочник по проращиванию покоящихся семян. – Л.: Наука, Ленингр. отд., 1985. – 348 с.

Пономаренко С.Ф. Сем. Fabaceae // Сравнительная анатомия семян. Том 5. Двудольные. Rosidae I. – СПб.: Мир и семья, 1996. – С. 264–299.

Середа М.М., Козловский Б.Л., Луценко Е.В. Перспективная технология размножения платана испанского для зеленого строительства на юго-западе ростовской области // Инженерный вестник Дона. 2014. Т. 31, № 4-1. С. 9.

Cerovi R., Runic J. Micropropagation of sour cherry (Prunus cerasus L.) cv. Sumadinka // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1987. Vol. 51, № 9. C. 157.

УДК 577.29

ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ГЕНОМА НОРКИ МЕТОДОМ ISSR-PCR И IRAP-PCR

Е.С. Щукина[1], В.И. Глазко[1,2], Т.Т. Глазко[1,2], Г.Ю. Косовский[1]

[1] Научно-Исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства имени В.А. Афанасьева

[2] Российский государственный аграрный университет-Московская сельскохозяйственная академия имени К.А. Тимирязева

С целью обнаружения наиболее информативных молекулярно-генетических маркеров в геноме норки, для последующего полилокусного генотипирования пород и создания генофондного паспорта выполнен сравнительный анализ спектров продуктов амплификации фланкированных инвертированными повторами микросателлитов ISSR-PCR ($(GT)_9$ C; $(AGC)_6$ C; $(AGC)_6$ T; $(TGC)_6$ G) и транспозонов IRAP-PCR (Gossy-R, Sabrina, Sabrina 111, LTR OR2, Gossy-L, InTol, Trna2L). На основании оценок полиморфизма суммарно 60 локусов, 26 из которых являются консервативными, а 34 полиморфными.

Анализ фореграмм выполнен на основе расчета доли полиморфных локусов, полиморфного информационного содержания (PIC-polymorphism information content), эффективного мультиплексного отношения (EMR-effective multiplex ratio) и маркерного индекса (MI-marker index). PIC рассчитывался по формуле: PIC = 2f (1-f), где f – частота одного из двух аллелей, рассчитанная как $f=\sqrt{R}$, где R – частота вариантов, у которых отсутствовал фрагмент ДНК соответствующей длины. $EMR = n_p(n_p/n)$, где n_p – число полиморфных локусов, n – общее число локусов. Расчет маркерного индекса проводился по формуле MI = PIC x EMR.

Самое высокое содержание доли полиморфных локусов наблюдалась у праймеров $(AGC)_6$ C (80 %), LTR OR2 и InTol (по 85.71 %), Gossy-R (62.5 %), минимальное же содержание было у $(AGC)_6$ T и Sabrina – по 40 %, $(GT)_9$ C – 33 % и Sabrina 111 – 16 %. Наивысшие показатели полиморфного информационного содержания были по (AGC) 6C, Gossy-R, LTR OR2 и InTol и равнялись 0,323; 0,322; 0,367 и 0,3949 соответственно.

По проведенным расчетам можно сделать вывод, что имеется прямая корреляционная зависимость между эффективным мультиплексным отношением и маркерным индексом, показывающий эффективность молекулярного маркера, используемого при генотипировании животных. Так, (AGC) 6C, Gossy-R, LTR OR2 и InTol имеют самые высокие показатели представленных индексов (EMR = 3,2; 3,1; 5,14; 5,14 соответственно и MI – 1,006-2,03), исходя из чего их рекомендуется использовать при генотипировании норок, так как являются наиболее информативными молекулярно-генетическими маркерами в геноме норки.

УДК 57.054

ИСКУССТВЕННАЯ СТИМУЛЯЦИЯ ФОЛЛИКУЛОГЕНЕЗА САМОК НОРОК

Д.В. Попов, Е.С. Щукина, И.С. Кашапова, Г.Ю. Косовский

Научно-Исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства имени В.А. Афанасьева

Норка является ведущим объектом звероводства. Перевод норководства на интенсивный путь разведения требует коренных изменений в существующей технологии и организации производства шкурок. Методы регуляции эстральных циклов пушных зверей является актуальной темой для звероводческих хозяйств, так как это дает возможность повышения плодовитости и получения потомства.

Для решения данной проблематики на базе ФГБНУ НИИПЗК был применен режим введения гонадотропных препаратов на испытуемых норках с целью индуцирования фолликулогенеза. Стимуляция фолликулогенеза проводилась вне периода естественного гона норки [1]. По окончании схемы гормональной индукции фолликулогенеза было осуществлено естественное спаривание самки с самцом методом многократного подсаживания самца к самке с периодичностью в 7–10 дней, что обусловлено множеством периодов охоты (3–5). во время течки, которая длится 20–25 дней.

В период гестации, который в среднем длится у норок 37–70 дней, изменений, говорящих о беременности, не было обнаружено, однако примерно на 50 день предполагаемой беременности все испытуемые норки проявили гнездостроительный инстинкт в виде постройки гнезда из собственного пуха.

На 55-60 дни испытуемые самки норок дали щенение в количестве щенят от 2 до 5, что является средним показателем плодовитости для данной возрастной группы. Полученные результаты подтверждают успешно проведенную гормональную терапию гонадотропными препаратами с целью получения приплода вне сезона гона и может использоваться звероводческими хозяйствами для повышения качества и количества щенения в год, что снизит экономический ущерб от получения потомства единожды в год.

ЛИТЕРАТУРА

Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2019» / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов. [Электронный ресурс]. – М: МАКС Пресс, 2019. – 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM); 12 см. – Систем. требования: ПК с процессором 486+; Windows 95; дисковод DVD-ROM; Adobe Acrobat Reader. – 1600 Мб. – 11000 экз. ISBN 978-5-317-06100-5

УДК 573.6: 577.2

КОНСТРУИРОВАНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ ВЫРОЖДЕННЫХ ПРАЙМЕРОВ

С.С. Горина, Я.Ю. Топоркова

Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение ФИЦ «Казанский научный центр РАН», Казань, Россия

Праймеры (или олигонуклеотиды) представляют собой небольшие фрагменты нуклеиновых кислот, комплементарные целевым последовательностям дезоксирибонуклеииновой (ДНК) или рибонуклеиновой (РНК) кислот и ответственные за инициацию репликации ДНК во всех живых организмах. В отличие от живых организмов, которые используют РНК-праймеры, в молекулярной биологии применяются РНК- и ДНК-праймеры, которые являются одними из ключевых компонентов в полимераазной цепной реакции (ПЦР), где так же служат затравками для синтеза комплементарной цепи [1]. Вследствие того, что генетический код является вырожденным, т. е. одна аминокислота кодируется несколькими кодонами, одна аминокислотная последовательность может быть представлена несколькими нуклеотидными последовательностями. В том случае, когда отсутствует информация о нуклеотидной последовательности, а имеются данные только о полной либо частичной аминокислотной последовательности белка, конструируют вырожденные праймеры, с помощью которых проводят амплификацию целевых фрагментов гена. Таким образом, вырожденный праймер представляет собой смесь нуклеотидных последовательностей, каждая из которых представляет собой индивидуальный праймер [2].

Объектом наших исследований являются ферменты клана CYP74, принадлежащие к суперсемейству цитохромов P450. В состав клана CYP74 входят две дегидразы (алленоксидсинтаза (АОС) и дивинилэфирсинтаза (ДЭС)) и две изомеразы (гидропероксидлиаза (ГПЛ) и эпоксиалкогольсинтаза (ЭАС)). Ферменты CYP74 относятся к неклассическим цитохромам P450, поскольку не нуждаются ни в молекулярном кислороде, ни в окислительно-восстановительном партнере для протекания реакции. Они используют гидроперекиси жирных кислот, как в качестве субстрата, так и донора кислорода [3]. Ферменты CYP74 принимают участие в биосинтезе важного класса биологически активных молекул – оксилипинов. В растениях оксилипины принимают участие в ответных реакциях на механическое повреждение, воздействие патогенов и факторов окружающей среды, обеспечивая адекватный ответ организма в условиях стресса. Помимо этого, они участвуют в процессах роста и развития растения, регулируют рост корней и процессы старения.

Несмотря на значительный прогресс в области секвенирования, исследователи зачастую сталкиваются с отсутствием необходимых геномных данных. В связи с этим целью данного исследования была разработка системы поиска и клонирования ферментов CYP74 de novo (в отсутствии геномных данных). Ключевым моментом исследований являлось определение участков генов ферментов CYP74, которые не перекрывались бы с последовательностями генов других цитохромов и, вместе с тем, были достаточно консервативны, чтобы служить универсальными праймируемыми участками, обеспечивающими специфичное взаимодействие с олигонуклеотидными праймерами и амплификацию целевых генов в ПЦР.

Для выявления подходящих генных локусов и конструирования праймеров нами был проведен сравнительный анализ аминокислотных последовательностей известных ферментов CYP74 различных видов растений. В зависимости от степени сходства полипептидных последовательностей, все ферменты были разделены на три группы. В каждой группе были выделены и подвергнуты сравнению каталитически важные области: гидропероксид-связывающий домен (HBD – “hydroperoxide-binding domain”), который соответствует «кислород-связывающему» домену классических монооксигеназ P450 [4], B′-спираль, область ERR-триады и гем-связывающий домен. Это сопоставление позволило выявить наиболее консервативные участки ферментов CYP74. Такими участками оказались, в первую очередь, два домена: B′-спираль и ERR-триада (Рис. 1). Их аминокислотные последовательности были транслированы в наиболее вероятные кодирующие нуклеотидные последовательности с учетом частоты встречаемости кодонов у высших растений.

В случае высокой вероятности встречаемости двух или трех кодонов (из четырех максимально возможных) в нуклеотидной последовательности праймера допускалась замена соответствующего нуклеотида.

При этом подходе итоговая (вырожденная) последовательность представляла собой перебор предполагаемых вариантов, а праймер являлся смесью соответствующих олигонуклеотидов. На основе рассчитанных таким образом последовательностей были сконструированы три пары олигонуклеотидных праймеров, соответствующих трем группам ферментов. Схема расположения праймеров приведена на рисунке 2.

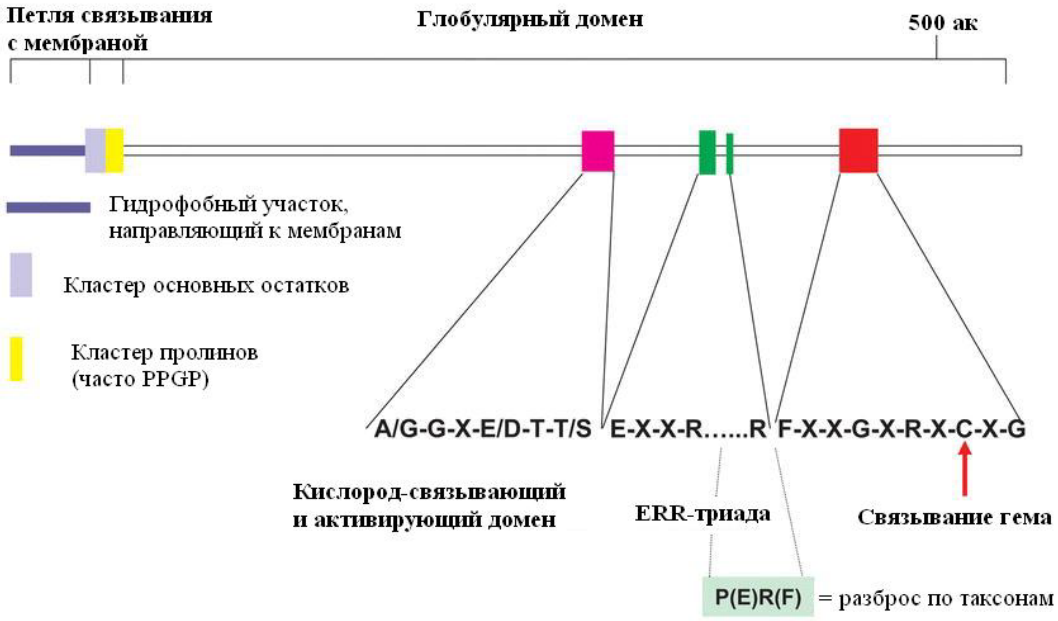


Рисунок 1. Доменная организация цитохромов P450 [5]: пролиновый кластер (Pro-Pro-X-Pro) образующий петлю, которому предшествует кластер основных остатков; гем-связывающая петля, расположенная на внутренней поверхности гема, содержит наиболее характерную для цитохромов P450 консенсусную последовательность (PXXGXRXCXG); I-спираль, включающая консенсусную последовательность (A/G-G-X-D/E-T-T/S), участвующую в связывании и активации кислорода; ERR-триада, включающая аминокислотные остатки (KETLR)

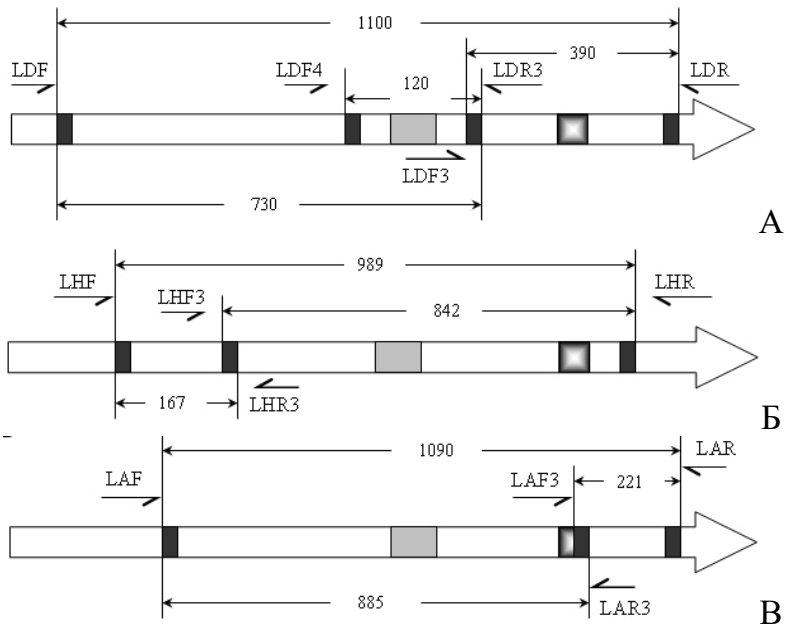


Рисунок 2. Схема расположения праймеров на последовательности мРНК ферментов CYP74: группа ДЭС (А), группа 0ГПЛ (Б), группа АОС (В)

Перечисленные три группы ферментов, обозначенные как группы ДЭС, ГПЛ и АОС, были определены следующим образом. В группу ДЭС были включены охарактеризованные дивинилэфирсинтазы растений семейства пасленовых.

Праймеры LDF и LDR оказались строго комплементарны генам этой группы. Праймеры LHF и LHR группы ГПЛ были сконструированы на основе последовательностей гидропероксидлиаз люцерны (Medicago truncatula), апельсина (Citrus sinensis), гуавы (Psidium guajava), дыни (Cucumis melo), померанца (Citrus aurantium), поскольку по сравнению

с другими гидропероксидлиазами эти ферменты обладают большей степенью сходства аминокислотной последовательности и субстратной специфичности с известными дивинилэфирсинтазами. Так, ГПЛ дыни, как и все изученные ДЭС, использует в качестве субстратов 9-гидроперекиси жирных кислот [Stumpe et al., 2001].

С другой стороны, ГПЛ люцерны, гуавы и цитрусовых обладают 13-гидропероксид-специфичностью, но при этом участок, выбранный нами для праймирования, у этих ферментов и дивинилэфирсинтаз обладает наибольшим сходством первичной структуры. Пара праймеров LAF/LAR группы AOC была сконструирована с использованием нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих гидропероксидлиазу тополя (Populus trichocarpa, GenBank ID: EF145878) и алленоксидсинтазу льна (GenBank ID: U00428.1). Выбор этой пары основывался на том, что ферменты одного и того же вида, либо филогенетически близких видов, могут иметь сходную нуклеотидную последовательность кодирующих генов. На момент начала исследований среди растений с расшифрованным геномом именно тополь оказался таксономически наиболее близким видом для льна. В базах данных среди охарактеризованных генов тополя присутствовал полный набор последовательностей ферментов CYP74, среди которого, к сожалению, не оказалось ни одной дивинилэфирсинтазы.

С помощью этой системы были клонированы первые 13-специфичные дивинилэфирсинтазы LuDES (Linum usitatissimum L., cv. Novotorzhski) [6] и RaDES (Ranunculus acris) [7], а также была клонирована одна из первых растительных эпоксиалкогольсинтаз RjEAS (Ranunculus japonicus) [8]. Продукты реакции идентифицировались с помощью ЯМР и УФ-спектроскопии. Предпочтительными субстратами LuDES и RaDES являются 13-гидроперекиси линолевой (13-ГПОД) и альфа-линеновой (13-ГПОТ) кислот, преобразующиеся в дивиниловый эфир – (омега5Z) – этеролевую и (омега5Z) – этероленовую кислоты, соответственно. Основными продуктами реакции SmDES1 и SmDES2 с 13-ГПОТ является (11Z) – этероленовая и (омега5Z) – этероленовая кислоты, соответственно. Предпочтительными субстратами для RjEAS являются 9- и 13-гидроперекиси линолевой кислоты, преобразующиеся в эпоксиспирты – 9,10 – эпокси-11-гидрокси-12-октадеценовую и 11-гидрокси – 12,13 – эпокси-9-октадеценовую кислоты, соответственно. Таким образом, была разработана успешно функционирующая система вырожденных праймеров, с применением которой были идентифицированы новые представители семейства CYP74: LuDES – идентифицированный как первая ДЭС принадлежащая к подсемейству CYP74B; RaDES – ДЭС нового типа открывающая новое подсемейство CYP74Q; RjEAS – вторая растительная ЭАС и первая ЭАС входящая в подсемейство CYP74A.

Исследования функционирования системы вырожденных праймеров проводились при поддержке гранта МК-5989.2018.4. Кинетические исследования ферментов проводились при финансовой поддержке государственного задания Федерального исследовательского центра "Казанский научный центр РАН".

ЛИТЕРАТУРА

1. Lilit Garibyan and Nidhi Avashia. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). J Invest Dermatol. 2013. 133 (3). P.1–4.

2. Compton T (1990). Degenerate primers for DNA amplification. pp. 39–45 in: PCR Protocols (Innis, Gelfand, Sninsky and White, eds.); Academic Press, New York.

3. Brash AR. Mechanistic aspects of CYP74 allene oxide synthases and related cytochrome P450 enzymes. Phytochemistry. 2009 Sep; 70(13–14) : 1522–31. doi: 10.1016/j.phytochem.2009.08.005. Epub 2009 Sep 9. Review.

4. Toporkova YY, Gorina SS, Bessolitsyna EK, Smirnova EO, Fatykhova VS, Brühlmann F, Ilyina TM, Mukhtarova LS, Grechkin AN. Double function hydroperoxide lyases/epoxyalcohol synthases (CYP74C) of higher plants: identification and conversion into allene oxide synthases by site-directed mutagenesis. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids. 2018 Apr; 1863(4) : 369–378. doi: 10.1016/j.bbalip.2018.01.002. Epub 2018 Jan 8.

5. Bak S, Beisson F, Bishop G, Hamberger B, Höfer R, Paquette S, Werck-Reichhart D. Cytochromes P450. Arabidopsis Book. 2011; 9:e0144. doi: 10.1199/tab.0144. Epub 2011 Oct 6.

6. Gogolev YV, Gorina SS, Gogoleva NE, Toporkova YY, Chechetkin IR, Grechkin AN. Green leaf divinyl ether synthase: gene detection, molecular cloning and identification of a unique CYP74B subfamily member. Biochim Biophys Acta. 2012 Feb; 1821(2) : 287–94. doi: 10.1016/j.bbalip.2011.11.003. Epub 2011 Nov 23.

7. Gorina SS, Toporkova YY, Mukhtarova LS, Chechetkin IR, Khairutdinov BI, Gogolev YV, Grechkin AN. Detection and molecular cloning of CYP74Q1 gene: identification of Ranunculus acris leaf divinyl ether synthase. Biochim Biophys Acta. 2014 Sep; 1841(9) : 1227–33. doi: 10.1016/j.bbalip.2014.05.005. Epub 2014 May 24.

8. Toporkova YY, Fatykhova VS, Gorina SS, Mukhtarova LS, Grechkin AN. Epoxyalcohol Synthase RjEAS (CYP74A88) from the Japanese Buttercup (Ranunculus japonicus): Cloning and Characterization of Catalytic Properties. Biochemistry (Mosc). 2019 Feb; 84(2) : 171–180. doi: 10.1134/S0006297919020081.

УДК 604.4:577.112.3

РЕСУРСОСБЕРЕГАЮЩАЯ ТЕХНОЛОГИЯ БИОПЕРЕРАБОТКИ ВОЗОБНОВЛЯЕМЫХ СЫРЬЕВЫХ РЕСУРСОВ

В.П. Молчанов, А.И. Сидоров, М.Г. Сульман

Тверской государственный технический университет, Тверь, Россия

В настоящее время рентабельность процессов утилизации и переработки отходов пищевых производств остается весьма невысокой. В этом плане перспективными направлениями повышения эффективности существующих процессов переработки данного вида отходов являются методы получения экологически чистых продуктов и совершенствования технологических схем утилизации.

Поэтому использование модульных установок средней и малой мощности, учитывающих конкретное количество сырья или отходов промышленного предприятия для получения компостов, является наиболее перспективным. Получение на этой основе эффективных экологически чистых продуктов связано с разработкой производственных процессов, альтернативных известным процессам, с использованием метанового брожения или микробного компостирования.

По результатам анализа и обобщения прикладных исследований, выполненных на базе Тверского государственного технического университета, Всероссийского научно-исследовательского института мелиорированных земель и ООО "Наукоемкое производство", разработана новая ресурсосберегающая, безотходная и экологически чистая технология утилизации отходов пищевых производств методом их биоконверсии при использовании торфонавозных смесей в качестве основного субстрата, создана модульная установка и проведена серия опытно-промышленных испытаний.

Предлагаемая технология на основе отходов животноводства и отходов пищевых производств включает следующие основные стадии:

– подготовка и дозирование компонентов субстрата;
– смешение компонентов;
– твердофазная ферментация субстрата в основном аппарате;
– пастеризация при повышенной температуре;
– сушка готового продукта;
– упаковка и хранение готового продукта.

При проектировании модульной установки были приняты за основу следующие экспериментально установленные оптимальные режимы:

- процесс биоконверсии проводится при температуре 35–40 ºС и pH 7.0 ± 0.1, продолжительность стадии биоконверсии 60 часов;

– аэрация осуществляется периодически воздухом, нагретым до температуры ферментации (с интервалом 24 часа и продолжительностью 30 минут), содержание кислорода в воздухе 21 % (об.);

– этап пастеризации осуществляется при температуре 80 ºС в течение 48 часов;

– использование добавок отходов хлебопекарных производств в количестве до 50 % (масс.) интенсифицирует процесс микробиологической переработки субстрата.

Созданная модульная установка по утилизации отходов животноводства и пищевой промышленности позволяет не только использовать местное сырье, но и применять типовое технологическое оборудование других производств (в том числе, комбикормовых заводов). В свою очередь, полученный на модульной установке продукт биоконверсии может быть использован в качестве кормовой добавки, содержащей необходимые организму аминокислоты и источники протеина, а также позволяющей снизить расход комбикормов и сбалансировать по аминокислотам рационы сельскохозяйственных животных и птицы.

Анализ данных, полученных в ходе опытно-промышленных испытаний модульной установки, показывает, что разработанная технология является высокорентабельной и имеет небольшой срок окупаемости, что позволяет рекомендовать ее к внедрению на предприятиях пищевой промышленности.

Предлагаемая технология утилизации органогенных отходов с получением кормовых добавок обеспечит высокую экономическую эффективность внедрения процессов биоконверсии за счет существенного сокращения затрат на производство продукции сельскохозяйственного назначения на основе сочетания таких преимуществ, как использование дешевого, доступного и конкурентоспособного органического сырья, а также интенсивных биотехнологических методов его переработки.

Конкурентоспособность создаваемой продукции будет обеспечиваться высокой рентабельностью производства кормовых добавок: ожидаемые показатели рентабельности производства, подтверждаемые выполненными технико-экономическими расчетами, составляют не менее 40 %.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 18–08–00460).

УДК 67.05

ГК «БИОТЕХНО»: ПРОЕКТИРОВАНИЕ И ПРОИЗВОДСТВО БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ОБОРУДОВАНИЯ

М.М. Тимофеева, А.Е. Никулин

ГК «БИОТЕХНО, Москва, Россия

Компания BioTechno Group осуществляет проектирование и производство оборудования для биотехнологических, фармацевтических, химических и пищевых производств, для любых стерильных и гигиенических применений, в том числе для чистых помещений.

За более чем 15 лет BioTechno Group стала современной сервисной и производственной компанией с командой компетентных, высокомотивированных профессионалов и большим опытом поставок по России и СНГ. Мы реализовали более 150 проектов по всей России и в странах СНГ, при этом поставили более 700 единиц оборудования. Мы понимаем рынок биотехнологий и поставляем качественное и современное оборудование для производств и научно-исследовательских институтов. Наш ассортимент включает как отдельные единицы оборудования, так и производственные линии; возможнополное оснащение производственных процессов микробной ферментации и культур клеток, включая CIP, фильтрационное, сепарационное оборудование, сушилки, периферийные и вспомогательные устройства, запчасти и сервис.

Мы можем предложить вам различные технологические установки, в т. ч. нестандартные, а также современные и хорошо зарекомендовавшие себя инжиниринговые решения. Каждый наш проект сопровождается детальным 3D-проектированием, чтобы производимое нами оборудование отвечало всем особенностям вашего процесса. В случае поставки производственной линии оборудования, для всех аппаратов линии предусмотрена единая система управления (для upstream&downstream процессов). Наша компания способна обеспечить полную автоматизацию как поставляемого нами, так и имеющегося у вас оборудования.

В случае необходимости ваше оборудование будет сертифицировано по стандартам GMPс предоставлением документации по протоколам испытаний. Мы готовы оказать вам консультационную поддержку по оценке производственных помещений и подбору наиболее подходящего для вас оборудования. Особое внимание мы уделяем процедуре инсталляции и пуско-наладочному процессу, которые обеспечиваются нашими сервис-инженерами. Наша компания обеспечивает сервисную поддержку реализованных проектов, что позволяет нам контролировать качество нашего оборудования и соответствовать мировым стандартам производства биотехнологического оборудования.

Секция 7. Промышленная биотехнология и производство БАВ

УДК 637.1/.3

ПОИСК ЭКОЛОГИЧЕСКИ БЕЗОПАСНЫХ ПАВ ДЛЯ МОЙКИ АВТОМАТОВ РОЗЛИВА И ФАСОВКИ МОЛОКА И МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Н.Н. Гаврилова, Ж.И. Кузина, Б.В. Маневич

ООО «БАСФ, Москва, Россия

Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности, Москва, Россия

Конечной стадией любого технологического процесса производства молока и молочной продукции является фасовка или розлив. С целью достижения качества и безопасности продукции на этом этапе созданы новые асептические автоматы, исключающие контакт продукта с воздухом производственного помещения. Для предотвращения попадания патогенной микрофлоры в готовый продукт необходимо соблюдение высокого уровня санитарно-гигиенического состояния как самого фасовочного автомата, внутренних, соприкасающихся с продуктом, так и наружных поверхностей.

В системах современного фасовочного оборудования предусмотрена автоматизация их мойки пенным моющим средством, растворы которого автоматически создаются в узле автомата и через специальные форсунки подаются в виде пены. Для предотвращения разбрызгивания моющего раствора в воздух производственного помещения автоматы снабжены пластиковыми кожухами [1].

В процессе фасовки станины и кожухи загрязняются остатками продукта. Недостаточно качественная мойка этих поверхностей может привести к развитию нежелательной микрофлоры на их поверхностях и в последствии явиться источником микробиологического загрязнения готового продукта. Как показала практика для мойки поверхностей автоматов необходимы специальные моющие средства, выбор которых диктуется не только составом загрязнений, но и степенью смачивания и стойкостью материала, из которого изготовлены кожухи, к используемым химическим агентам. При неблагоприятных условиях внешний вид кожухов из прозрачного становится матовым, с мелкими трещинами, в которых легко развиваются патогенные микроорганизмы вплоть до образования в них биопленок. Немаловажное значение при этом играют и такие факторы, как жесткость используемой воды в процессах мойки, уровень выполнения режимов ежедневной санитарной обработки [2, 3].

Производство новых молокосодержащих продуктов с использованием различных растительных белков и жиров приводит к образованию на поверхности оборудования отложений со специфическими высокомолекулярными жировыми фракциями растительного происхождения [4].

Исходя из теории эмульгирования следует, что для удаления подобных жировых отложений необходимы специальные высокомолекулярные виды ПАВ или их смеси, не обладающие отрицательным действием по отношению к материалу аппаратов и характеризующиеся смачивающими и эмульгирующими свойствами. Для пенной мойки автоматов начальная пенообразующая способность (H_o) ПАВ должна быть не ниже 17–19 см, а устойчивость пены – не ниже 0,7. При этих условиях моющий раствор в виде пены может удерживаться на вертикальной поверхности в течение 10–15 минут, необходимых для контакта с отложениями с целью полного его растворения. В соответствии с первым этапом исследований определена смачиваемость пластиков водой. В экспериментах использованы следующие пластики: PE-HD, Polylac PA 727, PMMA Plexiglas 8N, PC Makrolon 3103. В качестве контроля использовано стекло.

Результаты эксперимента представлены в виде диаграммы на рисунке 1.

Дальнейшие исследования будут направлены на поиск экологически безопасных со-ПАВ для получения требуемого эмульгирующего и диспергирующего действия по отношению к белково-жировым отложениям. Поскольку на большинстве молочных предприятий используется вода жесткостью свыше 5 мг-экв/л необходимо предусмотреть в составе моющей композиции экологически безопасного комплексоната и, кроме щелочного средства, создать слабокислотное с требуемыми комплексообразующими и эмульгирующими свойствами.

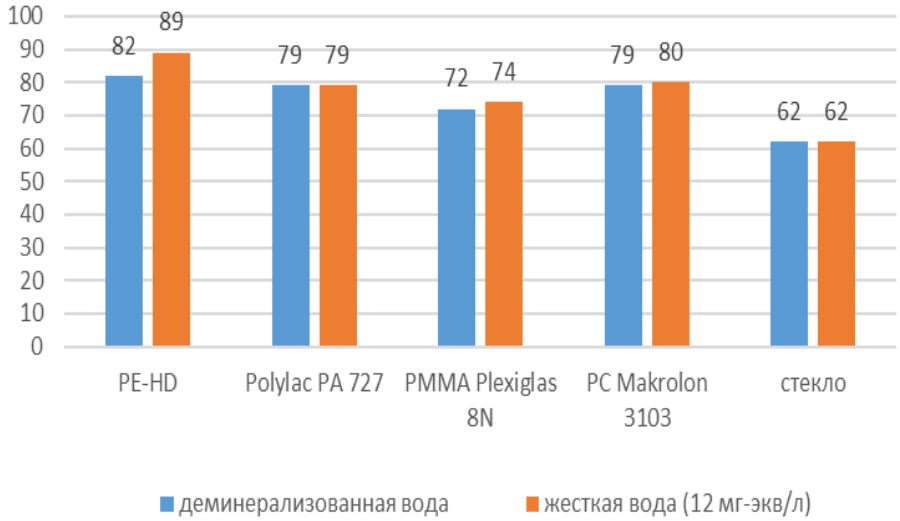


Рис. 1. Краевой угол смачивания пластиков и стекла деминерализованной водой и водой жесткостью 12 мг-экв/л

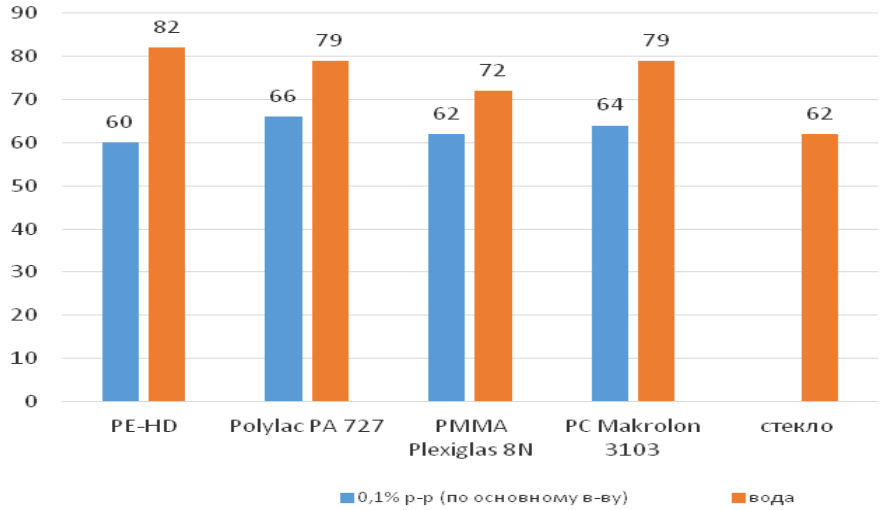


Рис. 2. Сравнительные результаты краевого угла смачивания пластиков и стекла деминерализованной водой и 0,1 %-ным раствором анионного ПАВ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бродский Ю.А., Будрик Г.В., Будрик В.Г. Современные виды технологического оборудования для предприятий молочной промышленности. // Сборник научных трудов "Научное обеспечение молочной промышленности (ВНИМИ-75 лет) // , 2004 г. с. 163–166.

2. Витовтов В.А. Исследование кинетики процесса выпадения молочных осадков на рабочих поверхностях емкостей из-под молока и молочных продуктов. Кн.: Интенсификация процессов и оборудования пищевых производств. – Л. 1975. С. 64–68.

3. Дегтярев Г.П. Механизм образования и классификация загрязнений, образующихся на поверхности молочного оборудования. / Молочная промышленность, № 6, 1999, с. 35–37.

4. Асафов В.А. и др. Соево-молочные продукты в лечебно-профилактическом питании. // Сборник научных трудов "Научное обеспечение молочной промышленности (ВНИМИ-75 лет) // , 2004 г. с. 14–17.

УДК 579.64

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НЕФТЕДЕСТРУКТОРА RHODOCOCCUS SP. ДЛЯ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ НА ЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВАХ

Ю.А. Маркова[1], М.С. Третьякова[1], М.В. Иванова[1], Л.А. Беловежец[2]

[1] СИФИБР СО РАН

[2] ИИХ им. А.Е. Фаворского СО РАН, г. Иркутск, Россия,

При попадании в почву микроорганизмы-нефтедеструкторы вступают в контакт с растениями, произрастающими на загрязненных территориях. Их взаимодействие может быть различным. С одной стороны, бактерии-нефтедеструкторы могут способствовать снижению воздействия нефти и нефтепродуктов на растение, стимулировать его рост за счет непосредственного выделения внеклеточных биологически активных веществ, таких как фитогормоны, ферменты и др. (Белимов, 2008). Опосредованное воздействие микроорганизмов проявляется при разрушении нефтяной пленки, обволакивающей корневую поверхность, что улучшает дыхание растений и доступность питательных веществ, заблокированной пленкой нефти. С другой стороны, не исключено подавление роста и развития растения за счет появления в непосредственной близости от корня токсичных низкомолекулярных продуктов распада нефти, образовывающихся вследствие деятельности бактерий-нефтедеструкторов (Запрометов, 1974).

Целью данного исследования было оценить протективное действие штаммов-нефтедеструкторов на разные виды растений и установить его механизм. В работе были использованы штаммы микроорганизмов-нефтедеструкторов, выделенные из эндо- и ризосферы пырея (Elytrigia repens) (Третьякова и др., 2015; Третьякова и др., 2017).

Оценивали защитное действие *Rhodococcus* sp. на однодольные и двудольные растения (кукуруза, райграс, горох, салат, редька). Предобработка семян исследуемым штаммом показала достоверное снижение токсического действия нефти на все исследуемые растения (рис. 1).



Рис. 1 Внешний вид исследуемых растений, выращенных в разных условиях: А) горох, Б) кукуруза. 1. Контрольные растения, выращиваемые в песке без добавления 2 % нефти; 2. Растения, выращенные из семян, обработанных взвесью клеток Rhodococcus sp. в песке без добавления нефти; 3. Растения, выращенные из необработанных семян в песке с 2 % нефти; 4. Растения, выращенные из обработанных Rhodococcus sp. семян в песке с 2 % нефти

Корни растений, выращенных в песке с добавлением нефти, отличались темным цветом, характерным для нефтяной пленки, и снижением количества боковых корешков. Предобработка семян взвесью микроорганизмов существенно улучшало развитие корневой системы.

Нефтезагрязнение снижает всхожесть семян всех исследуемых растений на 20 – 50 % в зависимости от вида растения. Проростки растений также страдают от действия нефти, их общая длина и масса, а также количество пигментов значительно снижаются. Это обусловлено недостаточным поступлением в прорастающее семя воды и кислорода, связанным с образованием нефтяной пленки на поверхности семени (табл. 1). Присутствие микроорганизмов нивелировало

Приём материалов статей по адресу: actbio@mail.ru

негативный эффект нефти, восстанавливая всхожесть практически до уровня контроля (табл. 1). Морфологические признаки таких растений также были близки к контрольным. Количество пигментов восстанавливалось до исходного уровня, а в некоторых случаях превышало. Скорее всего это связано с синтезом микроорганизмами биологически активных веществ аналогичных цитокининам растений.

Таблица 1. Морфо-физиологические параметры растений, в зависимости от обработки семян взвесью клеток *Rhodococcus* sp. и внесения 2 % нефти в песок

Культура	Всхожесть, %	Длина надземной части растения, см	Длина корней, см	Масса, г	Хлорофилл a	Хлорофилл b	Каротиноиды
Кукуруза							
Контроль	77	14,13	11,76	7,9	1,11±0,1[1]/14,42±1,67[2]	0,28±0,03/ 3,70±0,4	0,74±0,1/9,64±1,3
Обработка	83,3	13,3	11,9	4,8	1,25±0,1/12,98±1,7	0,35±0,04/3,59±0,4	0,80±0,1/8,23±1,1
Нефть	60,4	5,4	7,8	5,5	0,55±0,01/5,87±0,1	0,07±0,007/0,71±0,07	0,40±0,1/4,30±0,1
Нефть + обработка	62,4	9,63	12,6	9,01	0,85±0,08/8,79±0,9	0,29±0,01/3,01±0,07	0,60±0,06/6,10±0,1
Горох							
Контроль	29,7	10,35	6,75	4,45	1,2±0,1/10,36±1,6	0,54±0,07/3,95±0,6	0,77±0,1/7,53±1,1
Обработка	33,3	11,75	6,5	6	1,2±0,1/12,43±0,9	0,46±0,02/3,88±0,2	0,84±0,05/8,96±0,5
Нефть	11,7	6,27	4,17	3,35	0,84±0,1/7,00±0,8	0,32±0,04/2,89±0,2	0,62±0,07/5,20±0,5
Нефть + обработка	35,3	11,2	5,05	4,8	0,96±0,1/9,26±0,8	0,35±0,05/3,38±0,57	0,71±0,1/6,88±0,5

Содержание пигментов в растениях, мг/г сырого веса; 2. Содержание пигментов в растениях, мг хл / 1г сухого веса

Интересно, что при выращивании обработанных микроорганизмами растений в незагрязненной почве также наблюдался небольшой ростостимулирующий эффект, проявляющийся в увеличении всхожести семян и количества пигментов, особенно каротиноидов. Это позволяет надеяться на перспективы использования родококка в качестве биоудобрения.

Возможным механизмом положительного воздействия Rhodococcus sp. может быть выделение внеклеточных биологически активных веществ, таких как фитогормоны. С целью проверки этих предположений был изучен микробный синтез фитогормонов и биологически-активных соединений у всех выделенных нами штаммов бактерий-нефтедеструкторов. При оценке внеклеточных фитогормонов использовали метод биотестирования. Установлено, что исследуемый штамм Rhodococcus sp. синтезирует ауксин подобные вещества с высокой биологической активностью (число корешков и высота образования корней фасоли достигало 110 и 246 процентов от контроля, соответственно).

Таким образом, исследуемый нами нефтедеструктор Rhodococcus sp., проявил наилучшие фитозащитные свойства. Это выражалось в увеличении длины корней и проростков, а также массы растения, выращиваемых в условиях искусственного загрязнения нефтью. У всех растений наблюдалось увеличение содержания пигментов. Высокая стимулирующая активность родококка была связана с его способностью продуцировать вещества аналогичные фитогормонам растений. Из всего вышесказанного можно сделать вывод, что изученный нами штамм родококка является перспективным микроорганизмом для создания на его основе биоудобрения.

Работа проведена с использованием коллекций микроорганизмов, культур клеток, растений in vitro Центра коллективного пользования «Биоресурсный центр» СИФИБР СО РАН. Исследование поддержано грантом РФФИ и Правительства Иркутской области, проект № 17–45–388078 р_а.

ЛИТЕРАТУРА

Белимов А.А. Взаимодействие ассоциативных бактерий и растений в зависимости от биотических и абиотических факторов: Дис… д-ра биол. наук: 03.00.07. – Санкт-Петербург, 2008. – 46 с.

Запрометов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений. – М.: Высшая школа, 1974. – 214 с.

Третьякова М.С., Беловежец Л.А., Маркова Ю.А. Скрининг – бактерий, ассоциированных с растениями, по способности деструктировать компоненты нефти. Системы. Методы. Технологии, 2015, 4.: 138–142.

Третьякова М.С., Беловежец Л.А., Маркова Ю.А., Макарова Л.Е. Исследование способности бактерий-нефтедеструкторов снижать токсическое действие нефти на растения // Агрохимия. 2017. № 12. С. 56–61. DOI: 10.7868/S0002188117120079

УДК 615.322: 547.918

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ГИНСЕНОЗИДОВ В ЖЕНЬШЕНЕ *PANAX GINSENG C.A. MEYER*, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ СВЕРХКРИТИЧЕСКОЙ ЭКСТРАКЦИИ

М.П. Разгонова, Т.К. Каленик, А.М. Захаренко, Д. Кравотто*, К.С. Голохваст[a]

Дальневосточный федеральный университет, Владивосток
**Туринский университет, Турин, Италия*

ВВЕДЕНИЕ

Сверхкритическая флюидная экстракция (SFE) и сверхкритическая флюидная хроматография (SFC) стали применяться с конца 1970-х для анализа продовольствия и для определения содержания жира и уровней токсикантов. Коммерческие экстракты, полученные с помощью сверхкритической экстракции, содержат, в целом, все биологически активные компоненты наряду с инертными смесями экстрагированных составов (King *et al*., 2014; Brunner *et al*., 2010).

Использование сверхкритической флюидной экстракции представляет большой интерес особенно для естественной экстракции продукта. Процесс, сверхкритической экстракции имеет потенциальные преимущества перед обычными процессами извлечения, например: меньшее время экстракции, меньший объем органического растворителя, и возможность более селективной экстракции (Taylor *et al*., 2000).

Сверхкритический углекислый газ, является привлекательным растворителем биологически активных веществ из-за низких критических температур использования (30–40 ℃), его нетоксичности и инертности.

SFE используется в экстракции многих натуральных продуктов, например, плодов лимонника китайского (Choi *et al*., 1998), масла, богатого антиоксидантами и полиненасыщенными жирными кислотами, из микроводорослей (Gouveia *et al*., 2007), антиоксидантов из семян кориандра (Yepez *et al*., 2002), имбирного олеорезина (терпентин) из имбиря (Zancan *et al*., 2002) и многих других соединений, экстрагируемых из растительных матриц. Авторы данной статьи произвели успешную сверхкритическую экстракцию корней дальневосточного женьшеня при различных уровнях давлений, температуры и с разным содержанием сорастворителя (Razgonova *et al*., 2019).

Дальневосточный женьшень *Panax ginseng* C.A. Meyer является многолетним растением, используемым в течение тысячелетий в традиционной восточной медицине. Наиболее полностью исследованные активные компоненты женьшеня, известные как гинсенозиды, представляют из себя гомологический ряд тритерпеновых сапонинов с различным профилем гликолизирования (Stavrianidi *et al*., 2019). Гинсенозиды, как сообщали, имеют разнообразное положительное лекарственное действие: противоопухолевый, химиопрофилактический, иммуномодулирующий и антидиабетический эффекты (Ren *et al*., 1999; Surh *et al*., 2001).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования были использованы: дикий женьшень *Panax ginseng* C.A. Meyer (*P. ginseng*) из Лазовского района Приморья и культивированный женьшень из провинции Кэсон, Северная Корея.

Сверхкритическая CO_2-экстракция была осуществлена в Дальневосточном федеральном университете с помощью экстракционного аппарата сверхкритического давления Thar SFC, США.

В университете Турина (Италия) для процессов хроматографирования и идентификации использовался жидкостной хроматограф Waters Fraction Link, оснащенный детектором двойного поглощения 2487 и масс-детектором Micromass ZQ. Разделение образцов было выполнено при комнатной температуре с двойной мобильной фазой, состоящей из вода с 0,1 % муравьиной кислоты (растворитель A) и ацетонитрила (растворитель B) при скорости потока 1 мл / мин. Программа элюции градиента: (время, %) 0, 01, 2; 1,5, 2; 15, 100; 21, 100. Элюирующая колонка Kinetex C18 100 Å (3 x 150 мм, 2,6 мкм, Phenomenex). Масс-детектирование производили в режиме регистрации положительно заряженных ионов. Сравнительные хроматограммы сверхкритических экстрактов дальневосточного и корейского корней женьшеня представлены на *рисунках 2 и 3*.

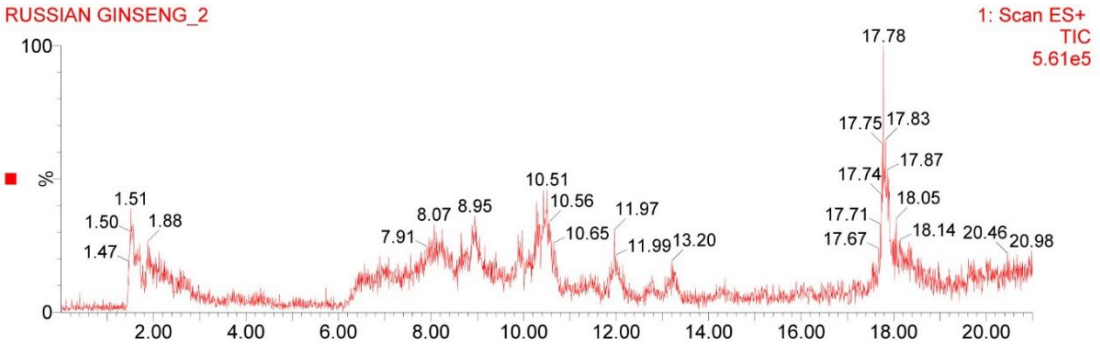


Рис. 2. – Хроматограмма сверхкритического экстракта корня дальневосточного женьшеня P. ginseng.

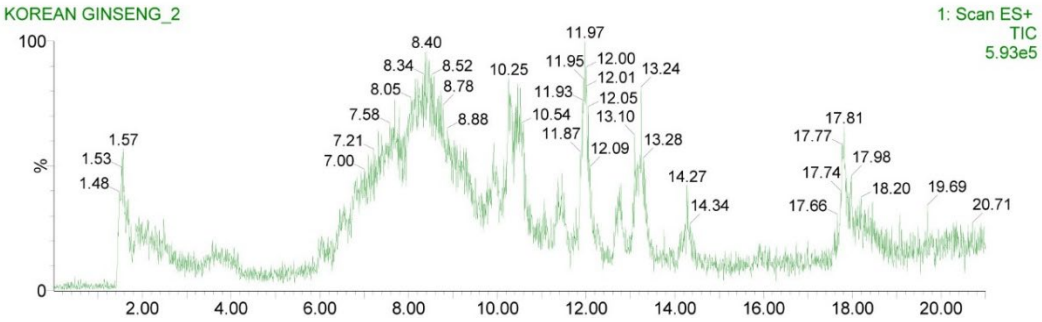


Рис. 3. – Хроматограмма сверхкритического экстракта корня корейского женьшеня P. ginseng (провинция Кэсон)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные масс-спектрометрии хорошо согласуются с известными структурными формулами гинсенозидов. Молекула любого гинсенозида состоит из сапогенина и сахаридных боковых цепей, которые также могут иметь более простые заместители (малонил). Конечные фрагменты соответствуют агликонам 20 (S) протопанаксадиолу (PPD), протопанаксатриолу (PPT) и октиллольным (OT) сапогенинам. На данный момент из всей группы растений рода *Panax* выделено более 620 соединений гинсенозидов (Yang *et al*., 2012). На *рисунке 4* представлены профили хроматограммы для некоторых гинсенозидов из дальневосточного дикого женьшеня.

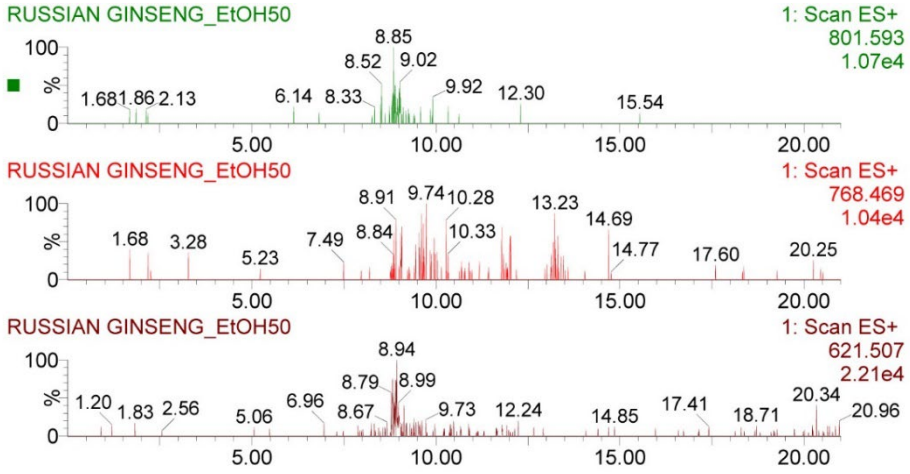


Рисунок 4 – Масс-спектры гинсенозидов Rg1, Rk3 и нотогинсенозида R2, выделенных из дальневосточного женьшеня P. ginseng

В *таблице 1* представлены данные масс-спектрометрии в положительном режиме регистрации масс-спектров высокого разрешения гинсенозидов дальневосточного женьшеня и корейского культивированного женьшеня, соответственно.

В масс-спектрах экстракта дальневосточного женьшеня обнаружились достаточно редко встречающиеся кориогинсенозид (KG-R2) и нотогинсенозид R2.

В экстракте корейского культивированного женьшеня был найден неизвестный гинсенозид с предполагаемой структурной формулой C_{48} H_{82} O_{17} *(рисунок 5)*. Гинсенозид с такой же структурной формулой был идентифицирован в работе H. – P. Wang (Wang et al., 2016).

Таблица 1 – Данные масс-спектрометрии по женьшеню дальневосточному *P. ginseng*.

Гинсенозиды	Данные МС, m/z	Структурная формула	Дальневосточный *P.ginseng*	Культивированный *P. ginseng* (провинция Кэсон)
Гинсенозид Rk3	621,507	C_{36} H_{60} O_8	+	+
Гинсенозид Rh1	639,396	C_{36} H_{62} O_9	-	+
Гинсенозид Rk1	767,459	C_{42} H_{70} O_{12}	+	+
Нотогинсенозид R2	768,469	C_{41} H_{70} O_{13}	+	-
Гинсенозид Rg3	785,565	C_{42} H_{72} O_{13}	-	+
Гинсенозид Rg1	801,593	C_{42} H_{72} O_{14}	+	+
Неизвестный гинсенозид	929,352	C_{48} H_{82} O_{17}	-	+
Гинсенозид Rd	947,555	C_{48} H_{82} O_{18}	+	+
Гинсенозид Rb2	1079,658	C_{53} H_{90} O_{22}	+	+
Гинсенозид Rb1	1109,606	C_{54} H_{92} O_{23}	+	-
Корио гинсенозид KG-R2	1122,142	C_{54} H_{92} O_{24}	+	-
Ацетил гинсенозид Rb1	1152,489	C_{56} H_{94} O_{24}	+	-
Гинсенозид Ra1	1209,98	C_{58} H_{98} O_{26}	+	-

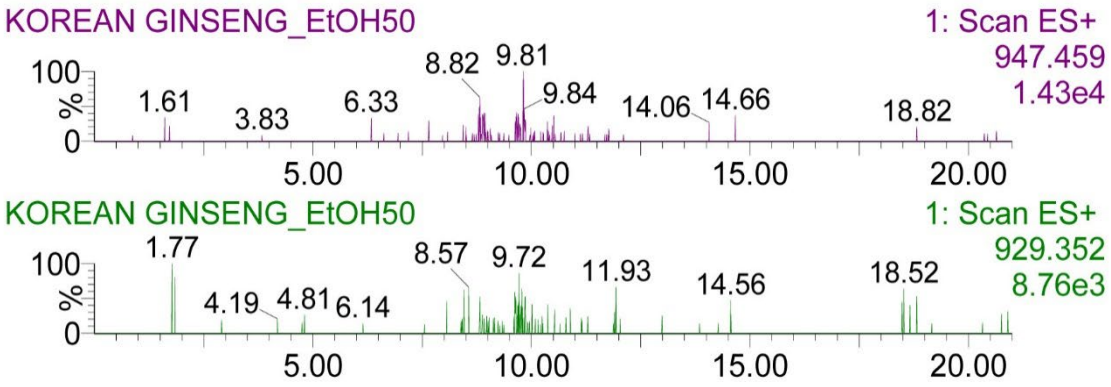


Рисунок 5 – Профиль молекулярных ионов гинсенозида Rd и неизвестного гинсенозида, выделенных из корейского культивированного женьшеня P. ginseng.

ВЫВОДЫ

Использование сверхкритической флюидной экстракции позволило выделить и проанализировать профили основных гинсенозидов из корней дальневосточного женьшеня *P. ginseng* культивированных в провинции Кэсон (Сев. Корея) и дикого женьшеня из Приморского края. Из корней корейского культивированного женьшеня с помощью этого метода был выделен неизвестный гинсенозид с предполагаемой структурной формулой C_{48} H_{82} O_{17}. Кроме того было показано, что данный метод экстракции позволяет выделить и все основные гинсенозиды, которые характерны для женьшеня. Методом масс-спектрометрии были подтверждены молекулярные массы гинсенозидов и последовательность сахаров. Было показано, что все они соответствуют ранее выделенным гинсенозидам, а метод SFE не приводит к химическим модификациям и может быть рекомендован для выделения гинсенозидов из сырья женьшеня.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brunner, G. Applications of supercritical fluids / G. Brunner // Annual Review of Chemical and Biomolecular engineering. 2010. № 1. P. 321–42.

2. Choi, Y.H. Optimum SFE condition for lignans of *Schisandra chinensis*. / Y.H. Choi, J. Kim, S.H. Jeon, K. P. Yoo, H. K. Lee // Chromatographia. Vol. 48. Issue 9. P. 695–699.

3. Gouveia, L. Functional food oil coloured by pigments extracted from microalgae with supercritical CO2. / L. Gouveia, B.P. Noble, F.M. Marcelo, S. Mrejen, M.T. Cardoso, A.F. Palavra, R.L. Mendes // food chemistry. -2007. Vol. 101. P. 717–723.

4. King, J.W. Modern supercritical fluid technology for food applications. // J.W. King / Annual review of food science and technology. 2014. № 5. P. 215–238.

5. Razgonova, M.P. Supercritical green technologies for obtaining ginsenosides from Far-Eastern wild *Panax ginseng C.A. Meyer* using SFE for applying in drug, food and cosmetic industries. / Razgonova M.P., Kalenik T.K., Veselov V.V., Zakharenko A.M., Ali Taghizadehghalehjoughi, Vita V., Barbuceanu F., Izotov B.N., Stratidakis A.K., Tsatsakis A.M., Golokhvast K.S. // Farmacia. 2019. Vol.67. Issue 1. P. 81–91.

6. Ren, G. Degradation of ginsenosides in American ginseng (Panax quinquefolium) extracts during microwave and conventional heating / G. Ren, F. Chen // J. Agric. Food Chem. 1999. № 47. P. 1501–1505.

7. Stavrianidi, A. New approaches to the determination and group identification of physiologically active compounds in plant materials and commercial products by HPLC–Mass spectrometry/A.N. Stavrianidi, T.M. Baygildiev, E.A. Stekolshchikova, O. Shpigun I. Rodin, // Journal of Analytical Chemistry. 2019. Vol. 74. P. 67–80.

8. Surh, Y. J. Molecular mechanism underlying anti-tumor promoting activities of heat-processed *Panax ginseng* C.A. Meyer // Y. J. Surh, H. K. Na, J. Y. Lee, Y.S. Keum / J. Korean Med. Sci. 2001. No. 16. P. 38–41.

9. Taylor, S.L. Enrichment and fractionation of phospholipid concentrates by supercritical fluid extraction and chromatography. // S.L Taylor, J.W. King, L. Montanari, P. Fantozzi, M.A. Blanco // Ital. J. Food Sci. 2000. № 12. P.65–76.

10. Wang, H. P. Rapid characterization of ginsenosides in the roots and rhizomes of Panax ginseng by UPLC-DAD-QTOF-MS/MS and simultaneous determination of 19 ginsenosides by HPLC-ESI-MS. / Hong-Ping Wang, You-Bo Zhang, Xiu-Wei Yang, Da-Qing Zhao, Ying-Ping Wang // Journal of Ginseng Research -2016. Vol. 40. P. 382–394.

11. Yang, W. Z.A strategy for efficient discovery of new natural compounds by integrating orthogonal column chromatography and liquid chromatography/mass spectrometry analysis: Its application in Panax ginseng, Panax quinquefolium and Panax notoginseng to characterize 437 potential new ginsenosides. / W. Z. Yang, M. Ye, X. Qiao, C.F. Liu, W.J. Miao, H. Y Tao, D. A. Guo // Analytica Chimica Acta 2012. Vol. 739. P. 56–66.

12. Yepez, B. Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by supercritical fluid extraction / B. Yepez, M. Espinosa, S. Lopez, G. Bolanos // Fluid Phase Equilib. 2002. № 194. P. 879–884.

13. Zancan, K.C. Extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin with CO_2 and co-solvents: a study of antioxidant action of extracts. / K.C. Zancan, M.O.M. Marques, A.J. Petenate, M.A.A. Meireles // Journal of Supercritical Fluids 2002. Vol. 24. P.57–76.

УДК 547.122:542.953

СИНТЕЗ ЗАМЕЩЕННЫХ АННЕЛИРОВАННЫХ ТРИАЗОЛЬНЫХ ГЕТЕРОЦИКЛОВ

О.В. Мазова, М.В. Глебова

Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Институт живых систем, Калининград, Россия

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия наблюдается большой интерес к классу триазолов, возникающему из-за их широкого использования в промышленности и сельском хозяйстве [1]. Поскольку микроорганизмы быстро претерпевают генетические изменения и развивают резистентность ко многим антибиотикам и терапевтическим агентам для различных заболеваний быстрее, чем появляются новые лекарства, война с инфекционными заболеваниями стала бесконечным процессом.

Производные бензотриазола представляют собой азотсодержащую бициклическую кольцевую систему, обладающую биологической активностью: противогрибковой, антибактериальной, противовоспалительной, противоопухолевой, анальгетической, противомалярийной и противотуберкулезной. Соединения на основе бензотриазола, также, обладают антигельминтным и антипротозойным действием. Они выступают в роли агонистов многих белков [2].

Наряду с этими активностями, бензотриазол используется в качестве предшественника в синтезе пептидов, азидов кислот, при получении 3-гидроксиметил–2,3–дигидробензофуранов и 3-гидроксиметилбензофуранов [3].

Производные на основе бензотриазола применяются для борьбы с нежелательными грибами при защите растений и материалов в качестве фунгицидных препаратов. Они индуцируют мутагенную активность и, таким образом, могут влиять на микроорганизмы, снижая их жизнедеятельность [4]. В настоящее время известны соединения бензотриазола, как гербициды системного и селективные действия. Все эти сведения стимулируют повышенный интерес к разработке простых и удобных методов функционализации триазолов.

Хиноны, как циклические непредельные дикетоны и обладающие способностью обратимо акцептировать электроны, проявляют разного рода биологическую активность. Различная степень биологической активности у них обусловлена наличием или отсутствием в их структуре определенных групп атомов, связанных с карбоциклом. Хиноны широко распространены в естественном мире и повсеместно в живых системах (растениях, членистоногих, бактериях). Хиноидные структуры выполняют ключевую роль в обменных процессах, включая окислительное фосфорилирование, участвуют в качестве переносчиков электронов в первичных метаболических процессах, таких как фотосинтез и дыхание. Многие природные биологически активные соединения, витамин К, коферменты, пластохиноны, стероиды и т. д. обладают хиноидной структурой и способностью к активному восстановлению до двухатомных фенолов [5]. Производные хинонов, как эффективные окислители, находят широкое применение в органической химии.

Интерес к хинонам, конденсированным с азотистыми гетероциклами, обусловлен как практической значимостью различных представителей этих классов веществ, так и их оригинальными химическими свойствами [6]. Известно, что азотсодержащие гетероциклические соединения, используются в синтезе биологически активных веществ. Можно ожидать, что соединения на основе бензотриазола и хиноидных структур, будут обладать биоцидной, фунгицидной, гербицидной и другими видами биологической активности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

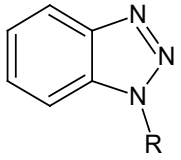
Для получения производных бензотриазола на основе хиноидных структур были получены промежуточные вещества по известным методикам тонкого органического синтеза: бензотриазол, п-бензохинон, антрахинон, малоилтиомочевина, тиоуреид п-бензохинона. Чистоту и индивидуальность полученных соединений контролировали методом ТСХ на пластинах *Sorbfil* UV-254, элюент толуол-ацетон-гептан. 4:1:1 (по объему), детектирование парами йода. В качестве растворителей применяли предварительно перегнанные этанол, толуол, анилин, пиридин. ИК-спектры регистрировались на спектрофотометре ИК-Фурье спектрометр VERTEX 70 с KBr, область записи спектров 4000–200 $см^{-1}$ (2,5–50 мкм). Смесь для приготовления таблетки: 800 мг KBr и 5 мг образца. В ЯМР-спектроскопии регистрировали[1] Н ЯМР-спектры на спектрометрах высокого разрешения H^1 ЯМР-спектрометр Varian MR-400 (рабочая частота 400 МГц, разрешение 0,01 Гц). Химические сдвиги приведены в шкале δ (м.д.) относительно внутреннего стандарта – дейтерированного растворителя. Для регистрации спектров ЯМР использовались ДМСО-d_6. Флуоресцентный анализ: спектры поглощения регистрировали на UV-VIS спектрофотометре UV-2600 SHIMADZU, область записи спектров 250–700 нм; спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре RF-5301pc SHIMADZU. В работе использовали стандартную кварцевую кювету с прозрачными стенками. Для измерения готовились растворы исследуемого вещества $0{,}05\times10^{-8}$ М в этаноле. Длину возбуждения устанавливали в зависимости от максимумов в спектрах поглощения исследуемых соединений. Спектр флуоресценции записывали в интервале длин волн 300–900 нм. Температуру плавления определяли стандартным капиллярным методом. (ГОСТ 18995.4–1973). Изображение кристаллов синтезированных соединений с 40 – кратным увеличением производили на микроскопе CarlZeiss AxioCamMRc 5. Использовались растворы исследуемых соединений $0{,}05\times10^{-8}$ М в этаноле.

Синтетическая стратегия. Разработанные методики относятся к получению производных бензотриазола. Мы предлагаем доступные малостадийные циклы без использования катализаторов с небольшой затратой энергии. Практическая значимость состоит в возможности непосредственного использования полученных соединений в дальнейших исследованиях. К раствору бензотриазола в этаноле (пиридине, анилине или толуоле) вводят медленно порциями реагенты до полного растворения. Механическое перемешивание и нагревание осуществляют в течение 2–3 часов. Затем реакционная масса отстаивается в течение суток до полного выпадения кристаллов производных бензотриазола.

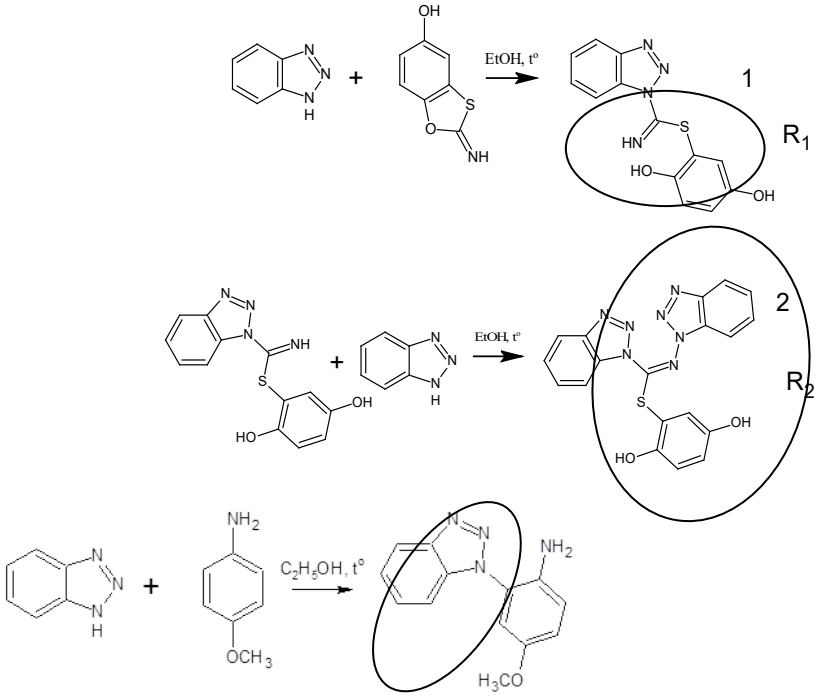
Из подходящих: ДМСО, ДМФА, пиридин, анилин, толуол, метанол, этанол, ацетон, варьируя в интервале температур от 15° С до 90° С, подобрали растворитель, опираясь на результаты выхода продуктов: этанол – для 2-N-бензотриазол-ил-3-S-п-гидроксихинонил-кетимина (выход 91 **%),** 2,2-(ди-N-бензотриазол-ил) – 3-S-п-гидроксихинонил-кетимина (выход 85 %) и 3-N-бензотриазол-ил-2-п-метоксианилина (выход 91 %); пиридин – для 1-S-3-(N-бензотриазол-ил) малоилтиомочевины (выход 77 %); толуол для 2,5 – ди-(N-анилино) – 3-(N-бензотриазол-ил) – 1,4–дигидроксибензола (выход 85 %) и Ag – 2,5 – ди-(N-анилино) – 3-(N-бензотриазол-ил) – 1,4–дигидроксибензола (выход 79 %); анилин для 3-N-бензотриазол-ил-10-дигидроксиантрила (выход 65 %).

Соединения (схема I): 2-N-бензотриазол-ил-3-S-п-гидроксихинонил-кетимин (1), 2,2-(ди-N-бензотриазол-ил) – 3-S-п-гидроксихинонил-кетимин (2) и 3-N-бензотриазол-ил-2-п-метоксианилин (3) получены в полярном растворителе этаноле при нагревании в интервале от 80° С до 90° С в течение 2 часов и постоянном перемешивании реагентов.

Схема I



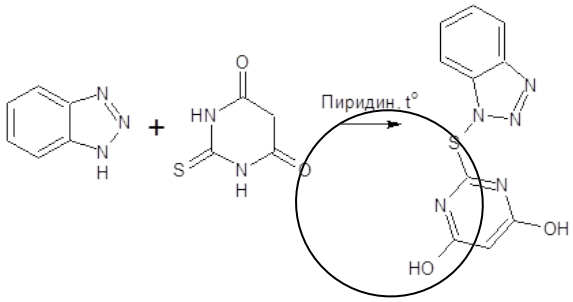
Где R_1, R_2, R_3



R_3 3

Для синтеза 1-S-3-(N-бензотриазол-ил) – малоилтиомочевины (4) использовали растворитель пиридин при перемешивании и нагревании в интервале от 75° С до 95° С в течение 2,5 часов (схема II).

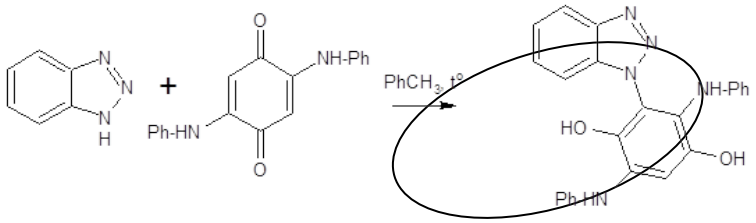
Схема II



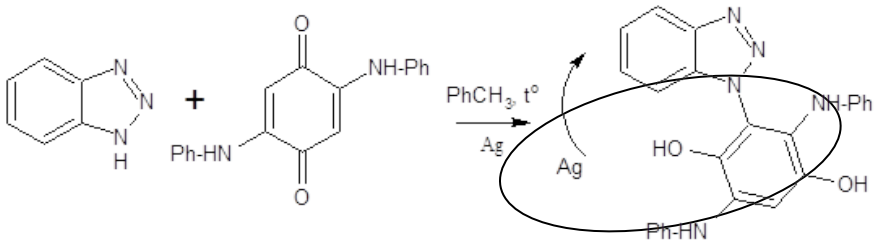
R_4 4

Для синтеза соединений: 2,5 – ди-(N-анилино) – 3-(N – бензотриазол-ил) – 1,4–дигидроксибензола (5) и Ag – 2,5 – ди-(N-анилино) – 3-(N-бензотриазол-ил) – 1,4–дигидроксибензола (6) использовали растворитель толуол при нагревании в интервале от 85° С до 95° С в течение 2 часов и механическом перемешивании (схема III).

Схема III



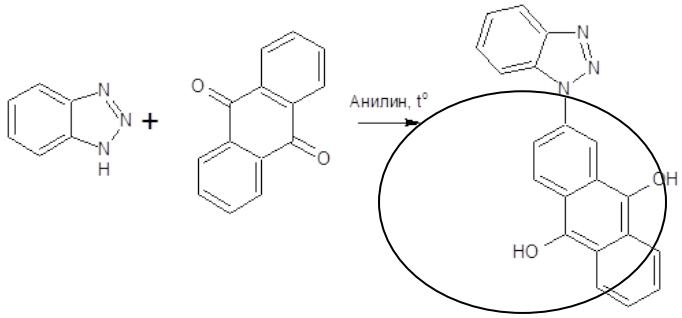
R_5 5



R_6 6

Для синтеза 3-N-бензотриазол-ил-10-дигидроксиантрила (7) использовали растворитель анилин при нагревании от 70° С до 90° С в течение 3 часов и механическом перемешивании (схема IV).

Схема IV

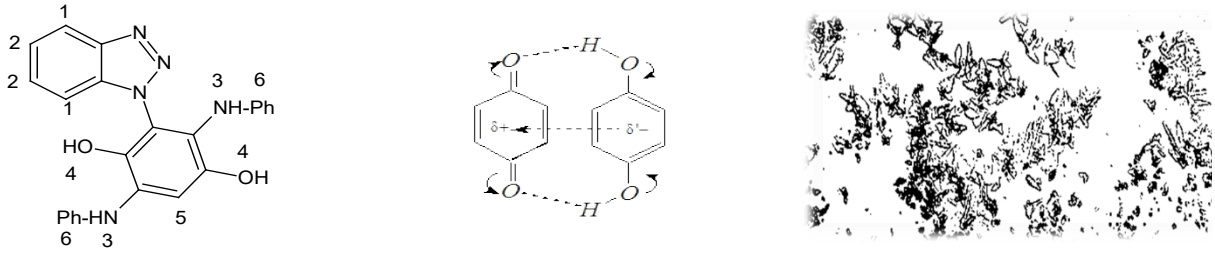


R_7 7

Бензотриазол получали из о-фенилендиамина с использованием нитрита натрия и CH_3 COOH при 45°С на льду. Т.пл. = 96°С. Выход 78 %. 1,4–Бензохинон получали в результате реакции окисления с $KBrO_3$ при pH < 7. Т.пл. = 116° С. Выход 95 %. При обработке п-бензохинона раствором тиомочевины в 2н HCl были получены светлые кристаллы тиоуреида п-бензохинона. Т.пл. = 156–157°С. Выход 65 %. Взаимодействием п-бензохинона с анилином в CH_3 COOH(лед.) были получены малиновые кристаллы 2,5–дианилино–1,4–бензохинона. Т.пл. = 140°С. Выход 85 %. 9,10 – Антрахинон получали в результате реакции окисления антрацена оксидом хрома (VI) в уксусной кислоте при нагревании. Т.пл. = 286°С. Выход 68,5 %. Малоилтиомочевину получали при взаимодействии малеинового ангидрид с тиомочевиной в CH_3 COOH (лед.) при 4-часовом нагревании. Т.пл. = 135°С. Выход 69 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Реакции бензотриазола с производными арилбензохинона и аминобензохинона проводят при нагревании реагентов в интервале 70-95°С в растворителе при постоянном перемешивании. 2,5–Ди-(N-анилино)–3-(N-бензотриазол-ил)–1,4–дигидроксибензол (рис. 1, а) был получен при взаимодействии бензотриазола с 2,5–дианилино–1,4–бензохиноном в толуоле. Высокая нуклеофильность аниона Nu в малополярных органических растворителях обусловлена тем, что он практически не сольватирован в этой среде. Т.пл. = 140 °С. Выход 85 %. N(теор.) = 17,11 % N(эксп.) = 17,12 ± 0,07 %. Соединение 2,5–ди-(N-анилино)–3-(N-бензотриазол)–1,4–дигидробензол представляет собой комплекс с переносом заряда (рис. 1, б), ассоциированность молекул подтверждается высокоразрешающей съемкой на микроскопе CarlZeiss AxioCamMRc5 (рис. 1, в) и данными ИКспектрометрии.



(а) (б) (в)

Рис. 1. Соединение 2,5–ди-(N-анилино)–3-(N-бензотриазол)–1,4–дигидробензол. Структурная формула (а); комплекс с переносом заряда (б); ассоциированность молекул при 40-кратном увеличении (в).

Наночастицы серебра вводились в супрамолекулу Ag–2,5–ди-(N-анилино)–3-(N-бензотриазол)–1,4–дигидробензола (рис. 2, а) вследствие обработки внутренней поверхности реакционной колбы реактивом Толленса и нанесением Ag-покрытия. Т.пл. = 110 °С. Выход 79 %. N(теор.) = 13,54 % N(эксп.) = 13,55 ± 0,03 % Влияние частиц серебра проявилось на снижении ассоциированности макромолекул на основе бензотриазола и хиноидных структур (б). На микроскопическом снимке (рис. 2) можно наблюдать темные вкрапления в виде частиц серебра



(а) (б)

Рис. 2. Соединение Ag–2,5–ди-(N-анилино)–3-(N-бензотриазол)–1,4–дигидробензола. Структурная формула (а) и молекулы при 40-кратном увеличении (б)

Данные, полученные ЯМР спектроскопией, выявили: химический сдвиг синглета (*δ*м.д. = 10,5) соответствует группе – ОН (4,4); химический сдвиг синглета (*δ*м.д. = 8,5) соответствует Ar-H. (6,6); химические сдвиги триплетов (*δ*м.д. = 6,9 и 6,7) и химические сдвиги дуплетов (*δ*м.д. = 6,8 и 6,6) соответствуют фрагментам Ar-H (1,1 и 2,2); химический сдвиг (*δ*м.д. = 6,5) соответствует фрагменту 6; химический сдвиг (*δ*м.д = 2,6) соответствует > NH группе (3,3). Химический сдвиг, равный 7,5 м.д, образуется из-за присутствия атомов серебра в комплексе. Ароматическим кольцом бензотриазола происходит удерживание атома серебра в молекуле. Это можно наблюдать на фрагменте ЯМР-спектра данного соединения (рис. 3)

При нагревании кристаллов Ag–2,5–ди-(N-анилино)–3-(N-бензотриазол-ил)–1,4-дигидробензола наблюдается флуоресценция вследствие внутримолекулярного возбуждения вещества в области от 325–620 нм, максимум флуоресценции достигается при 472,5 нм.

Нами синтезированы также соединения на основе бензотриазола и конденсированных хинонов: 3-N-бензотриазол-ил-2, п-метоксианилин. Т.пл. = 95 °С. Выход 91 %. 1-S-3-(N-бензотриазол-ил)–малоилтиомочевина. Т.пл. = 98 °С. Выход 77 %. 2-N-бензотриазол-ил-3-S-п-гидроксихинонил-кетимин. Т.пл. = 98 °С. Выход 91 %. 2,2-(ди-N-бензотриазол-ил) – 3-S-п-гидроксихинонил-кетимина. Т.пл. = 90° С. Выход 85 %. 3-N-бензотриазол-ил-дигидроксиантрил. Т.пл. = 98° С. Выход 60 %.

Функционально – групповой анализ был проведен с помощью характеристических полос поглощения в ИК-спектрах и ЯМР-спектрах. Данные спектрального анализа не противоречат предполагаемым структурам.

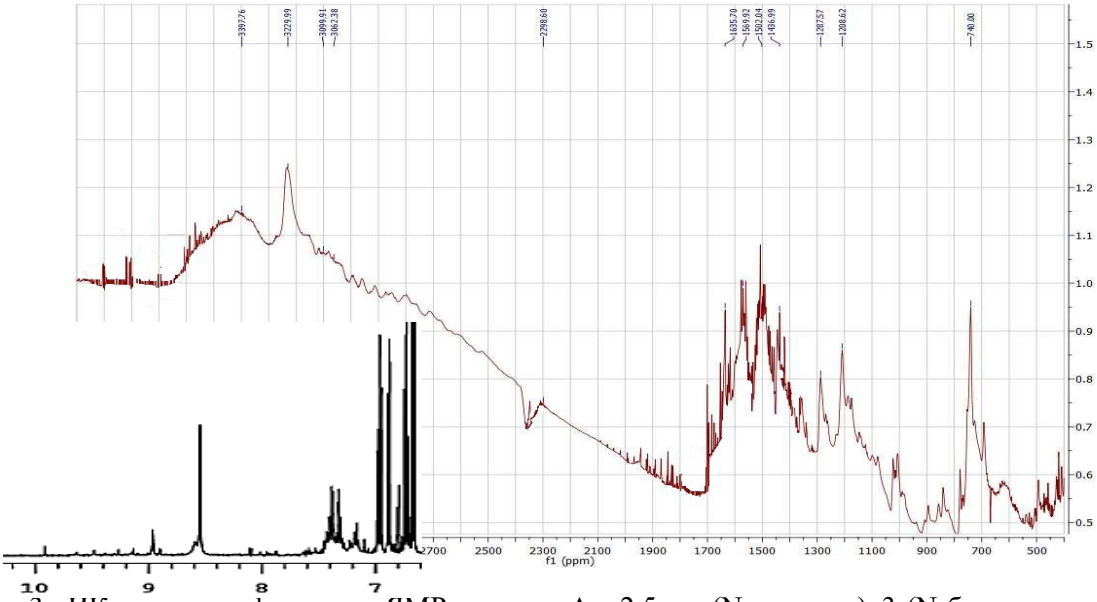


Рис. 3. ИК-спектр и фрагмент ЯМР-спектра Ag–2,5–ди-(N-анилино)–3-(N-бензотриазол-ил)–1,4-дигидроксибензола

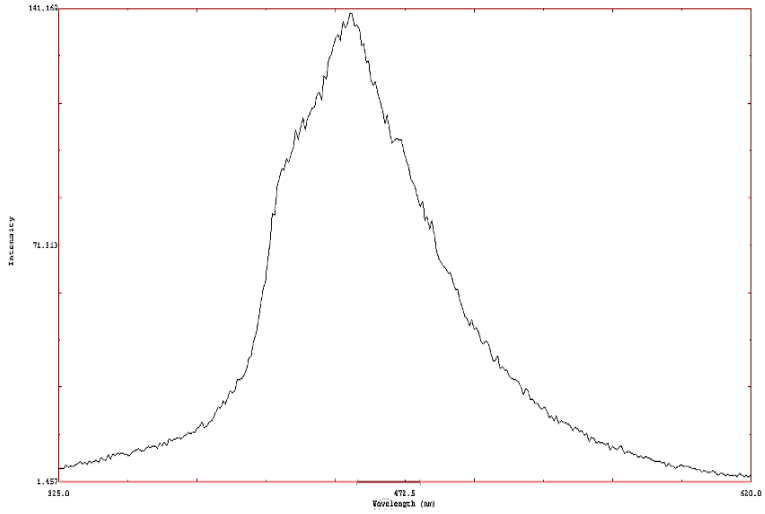


Рис. 4. Спектр – флуоресценции Ag–2,5–ди-(N-анилино)–3-(N-бензотриазолил)–1,4–дигидробензола

ЛИТЕРАТУРА

Benzotriazole: a heterocyclic molecule with diversified pharmacological activities / V.K. Singh, P. Rishishwar, P. Bhardwaj, S. Alok // International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. – 2017. – Vol. 8. – P. 446–456.

Synthesis and antimicrobial and activities of hybrid molecules containing benzotriazole and 1, 2, 4 – triazole / M. Chand, R. Kaushik, J.S. Chand // Turkish Journal of Chemistry. – 2018. – Vol. 42. – P. 1663–1677.

Monbaliu, J. – C.M. The Chemistry of Benzotriazole Derivatives: A Tribute to Alan Roy Katritzky / J-C.M. Monbaliu. – Switzerland: Springer. – 2016. – P. 285.

Benzotriazole in medicinal chemistry: an overview / B.V. Suma, N.N. Natesh, V. Madhavan // Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. – 2011. – Vol 3. – №. 6. – P. 375–380.

Substituent Effects in solid-state assembly of activated benzotriazoles / D.S. Wenholz, M. Bhadbhade, H. Kandemir, J. Ho, N. Kumar // Royal Socety of Chemistry. – 2019. – Vol. 21. – P. 835–842.

Глебова М.В., Мазова О.В. Синтез некоторых азотсодержащих гетероциклов на основе бензотриазола, бромзамещенных и конденсированных хинонов. // Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. Сер.: Естественные и медицинские науки. 2019. № 1, С. 57–62

УДК 615:581.176.045.

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ *CALLIGONUM LEUCOCLADUM BUNGE*

Г.Т. Есжанова, Д.Т. Рахимжанова

Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина, Нур-Султан, Казахстан

Лекарственные средства из растительного сырья могут служить основой рациональной терапии нового времени. Многовековой опыт изучения лекарственных растений послужил основой для научно-обоснованного применения лекарственных средств растительного происхождения. Научные достижения фармакологии и биотехнологии позволили внедрить в практику множество лекарственных препаратов. Расширение ассортимента лекарственных препаратов, их изготовление из лекарственного растительного сырья, отсутствие токсичности для организма человека и животного, вызвало увеличение интереса к фитотерапии в современных условиях [1].

Так, в обширном арсенале лекарственных средств, применяемых в медицинской и ветеринарной практике, в настоящее время около половины составляют препараты растительного происхождения и их производные. По прогнозам специалистов, их доля будет возрастать и 21 век будет веком фитотерапии, профилактики и щадящего лечения с помощью лекарственного сырья [2].

Фармакологическая активность лекарственных растений связана с содержанием в них не только органических биологически активных веществ, но и веществ неорганической природы – макро- и микроэлементов [3].

Ведется поиск новых природных соединений, лекарственных препаратов, пищевых добавок, выявление мишеней их воздействия, идентификация возможных механизмов действия. Многие вещества растений необходимы в самых различных областях промышленности и, кроме того, перспективны для использования в биотехнологии. Для пополнения ассортимента лекарственных растений, используемых для нужд фармацевтической, парфюмерной, пищевой и других отраслей промышленности и в сельском хозяйстве, необходимо глубокое и всестороннее изучение химического состава и биологических свойств отдельных соединений и фитокомплексов [4].

К таким перспективным растениям относится джузгун.

Джузгун (лат. Calligonum) – род многолетних листопадных ветвистых кустарников из семейства гречишные (лат. Polygonaceae). По некоторым данным в род входит до 158 растений, но определение входящих в него видов считается неточным. Наверняка это невозможно из-за множества морфологических различий в многочисленных видах джузгуна, при этом, не имеющих географической определенности. Внешний вид растений из рода джузгун зависит от экологических условий. Если они произрастают там, где грунтовые воды залегают неглубоко, растения рода джузгун принимают форму многоствольных древовидных кустарников, достигающих порой 5–7 метров в высоту. Там же, где вода лежит глубоко под песками, это невысокие кустарники, максимум 1,5 метра высоты (см. рис. 1) [5].



(а) (б)

Рисунок 1. (а) Внешний вид джузгуна белокорого в природе (б) Корень и стебель джузгуна

В сырье джузгуна обнаружено содержание флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, обладающих желчегонным действием, алкалоид каллигонин, выступающий в качестве гипотензивного средства.

Хамзина Г.С., Алижанов М.М., Сулейменов М.М., Рахмадиева С.Д. провели фитохимическое исследование *Calligonum tetrapterum*. Впервые выявлен минеральный состав растения, из растительного экстракта получены флавоноиды, выявлены качественные показатели сырья [6].

Абдыкаримовой Ш.А., Сулеймен Е.М. и др. были изучены анатомо-морфологические особенности строения растения джузгун белокорый (*Calligonum leucocladum*), произрастающего в аридной зоне Южного Казахстана и установлено соответствие диагностических признаков растениям данного вида, а также высокая антирадикальная активность его спиртового экстракта. Радиохимический анализ сырья джузгуна белокорого показал отсутствие радионуклидов. Анализ элементного состава *Calligonum leucocladum B*. методом атомно-эмиссионой спектрометрии обнаружил присутствие 32 химических элементов [7].

Jahromi, M.A.; Movahedin, M.; Mazaheri, Z.; Amanlu, M.; Mowla, S.J.; Batooli, H. установили, что экстракт растения *Escanbil Calligonum* можно использовать в качестве антиоксидантного компонента в клиническом исследовании [8].

Degheidy, N.S.; Sharaf, E.M.; Fathi, S.M. выявили, что этаноловый экстракт *Calligonum comosum* обладает терапевтическим эффектом при фасциолезе животных [9].

Ввиду того, что официальной медициной джузгун все еще недостаточно изучен в биологическом и фармакологическом отношении, на сегодняшний день, лекарственные препараты из него не изготавливаются. Однако растения из рода джузгун потенциально могут служить источником лекарственного сырья.

Целью наших исследований явилась разработка технологии получения из сырья *Calligonum leucocladum Bunge* фитопрепаратов для применения в ветеринарной практике.

Материалы и методы. Работа выполнена на базе лаборатории Института прикладной химии г. Нур-Султана.

В качестве сырья использовали стебли и корни джузгуна белокорого, предварительно измельченное и просеянное через сито диаметром отверстий 3,15 мм. Сухие корни *Calligonum leucocladum* замачивались в горячей воде и подвергались кипячению в 5 %-ном растворе гидроксида натрия, затем, после размягчения, выдерживались в глицерин-спирто-водной смеси, в соотношении 1:1:1. Сырье с помощью мельницы измельчали до порошкообразного состояния.

Таблица 1. Результаты определения товароведческих показателей лекарственного растительного сырья *Calligonum leucocladum Bunge*

Товароведческие показатели	Корни и стебли джузгуна белокорого	
	Стебли	Корень
Влажность, %	1,1	2,9
Общая зола, %	1,44	1,98

При фитохимическом анализе сырья джузгуна белокорого нами были обнаружены сапонины, алкалоиды, полисахариды, дубильные вещества, флавоноиды, кумарины.

Технология получения экстракта джузгуна белокорого. При изготовлении экстракта джузгуна в качестве извлекателя использовали этиловый спирт.

Для получения экстракта растения использовали метод экстракции на аппарате Сосклета. Для этого навеску образца помещали в гильзу, изготовленную из фильтровальной бумаги соответствующего размера и помещали в экстрактор Сосклета объемом 150 мл. Аппарат Сосклета устанавливали над круглодонной колбой объемом 1 л. В колбу заливали растворитель (этиловый спирт). Над аппаратом Сосклета устанавливали обратный холодильник. Колбу подогревали до кипения, причем в случае легколетучих испарителей использовалась водяная баня. Кипячение, соответственно, циркуляционную экстракцию на аппарате Сосклета, проводили в течение 5 часов. После этого колбу отсоединяли и растворитель отгоняли на роторном испарителе. Полученный густой экстракт взвешивали и переносили в емкости.

Из густого экстракта джузгуна методом разведения был получен жидкий экстракт. Жидкий экстракт готовили разведением 96 % этилового спирта водой до нужной концентрации, с последующей очисткой и фильтрованием.

Для получения настойки джузгуна белокорого использовали метод вихревой экстракции. Метод основан на интенсивном перемешивании (10000–5000 об/мин), сопровождающемся измельчением сырья с помощью быстроходных мешалок, снабженных острыми лопастями.

Размол сырья в среде экстрагента резко увеличивает поверхность контакта фаз за счет уменьшения размера частиц (измельчение лопастями мешалки), а также за счет возникновения конвекции как внутри, так и снаружи частиц, турбулизации потоков, пульсации жидкости.

Все это в значительной степени и способствует ускорению процесса экстрагирования основных действующих веществ.

Получение настоек состояло из следующих технологических стадий: подготовка сырья и экстрагента, получение извлечения, очистка от сопутствующих веществ, фасовка.

В качестве экстрагента при получении настоек джузгуна использовали спирто-водные смеси 40 %-ной концентрации. Настойки и жидкие экстракты джузгуна предназначаются для перорального применения (после предварительного разведения с водой) сельскохозяйственным животным при лечении незаразных болезней желудочно-кишечного тракта, при коррекции нарушений обмена веществ в организме.

Густой этанольный экстракт джузгуна использовался также для приготовления мазей, в 10 % концентрации, на основе полиэтиленгликоля 6000 (ПЭГ) и вазелина. Полученная мазь хорошо удерживается на поверхности тканей, устойчива, по степени однородности, по органолептическим свойствам, содержанию действующего вещества соответствует требованиям НД.

Мазь джузгуна обладает вяжущими, противовоспалительными, ранозаживляющими свойствами и предназначается для ветеринарии, с целью применения при лечении болезней копыт у животных.

Полученные этанольные лекарственные формы джузгуна белокорого были исследованы на антимикробную активность и цитотоксичность.

Антибактериальную активность определяли методом серийных разведений препарата и высевом на питательные среды: на среду Эндо для *Escherichia coli*, желточно-солевой агар для *Staphylococcus aureus*, и на среду Сабуро для *Candida albicans*.

Результаты исследования антимикробной активности свидетельствуют о том, что *Calligonum leucocladum B*. в отношении свежевыделенных клинических штаммов *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* обусловливает бактериостатический эффект, но не проявляет фунгистатического действия в отношении *Candida albicans*.

Анализ результатов исследования цитотоксической активности этанольных лекарственных форм джузгуна показывает, что *Calligonum leucocladum B*. во всех испытуемых концентрациях (1 мг/мл, 5 мг/мл, 10 мг/мл) не проявляет цитотоксичность.

Таким образом, густой этанольный экстракт *Calligonum leucocladum B*. может быть использован для получения жидких и мягких лекарственных форм и препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

Тегісбаев Е.Т., Темирғалиев Э.М., Ли Е.Л., Байназарова Г.М., Қайыржанова А.Н., Масимханов Р.Ш., Ефремова А.В. Фармакология саласында фитопрепараттардың маңызы // Журнал Фармация Казахстана. – Алматы, № 6, 2012.-с. 46–47.

Кукенов М.К. Ботаническое ресурсоведение Казахстана. – Алматы: Гылым. – 1999. – 160 с.

Введение в фитохимические исследования и выявление биологической активности веществ растений / Под ред. Л.К. Мамонова и Р.А. Музычкиной. – Алматы: «Школа XXI века», 2008. -216 с.

Самылина И.А., Баландина И.А. Пути использования лекарственного растительного сырья и его стандартизация // Фармация. – 2004. № 2. – С. 39–41.

Байтенов М.С. Флора Казахстана. – Алматы: «Гылым», 1999. – Т.2. – 280 с.

Хамзина Г.С., Алижанов М.М., Сулейменов Е.М., Рахмадиева С.Б. Фитохимическое исследование Calligonum tetrapterum // Международный научно-практическая конференция «Валихановские чтения-13». – Көкшетау, Т.7. – 2008. – С. 70–73.

Абдыкаримова Ш.А., Ишмуратова М.Ю., Искакова Ж.Б., Сулеймен Е.М., Есжанова Г.Т. Анатомическое строение Calligonum Leucocladum Bunge и антирадикальная активность его спиртового экстракта // XXXI Международная научно-практическая конференция «Наука вчера, сегодня, завтра», Россия, г. Новосибирск, № 2 (24). – 2016. – С.16–22.

Jahromi, M.A.; Movahedin, M.; Mazaheri, Z.; Amanlu, M.; Mowla, S.J.; Batooli, H. Evaluating the effects of Escanbil (Calligonum) extract on the expression level of Catsper gene variants and sperm motility in aging male mice\\Iranian Journal of Reproductive Medicine, 2014, 12, 7, P / 459–466.

Degheidy, N.S.; Sharaf, E.M.; Fathi, S.M. Field evaluation of anthelmentic efficacy of Calligonum comosum against fasciolosis in sheep at Taif, KSA \\ Global Veterinaria, 2013, 11, 4, P. 377–384

УДК 579.6: 543.94

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОЙ МЕТАНОЛДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ *METHYLOBACTERIUM EXTORQUENS* РСМ 160

Т.А. Кузнецова, Т.А. Белякова, А.В. Катыкина

Тульский государственный университет, Тула, Россия

Уникальный метаболизм метилобактерий позволяет использовать их клетки и ферменты в биоаналитике, что является доступной альтернативой дорогостоящим и сложным физико-химическим методам обнаружения [1, 2]. Клетки этих бактерий характеризуются высокой концентрацией периплазматических дегидрогеназ, основной из которых является пирролохинолинхинон (PQQ) – зависимая метанолдегидрогеназа (МДГ) – фермент, катализирующий окисление метанола до формальдегида, а также способный окислять первичные спирты и альдегиды, используя искусственные акцепторы электронов, такие как феназинметосульфат (ФМС) и 2,6–дихлорфенолиндофенол (ДХФИФ) [3–5]. Использование метилобактерий и выделенной из них МДГ при разработке биоаналитических систем является перспективным направлением развития аналитической биотехнологии. Изучение биокаталитических свойств метилобактерий играет важную роль в разработке и создании новых биосенсорных элементов для анализа C_1-соединений. Для повышения эффективности таких биосенсоров путем увеличения активности и стабильности фермента МДГ, необходимо подобрать оптимальные условия роста и культивирования метилобактерий, условия хранения, изучить влияние посторонних примесей в виде солей тяжелых металлов. Таким образом, целью работы явилось выявление влияния различных факторов на биокаталитические свойства рекомбинантной МДГ из *Methylobacterium extorquens* рСМ 160.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Микроорганизмы. В работе использовали рекомбинантный штамм метилобактерий *Methylobacterium extorquens* pCM160 [6].

Условия культивирования. Микроорганизмы выращивали на качалке (180 об/мин) при 29 ºС в колбах Эрленмейера с 200 мл среды Канеда, содержащей (г/л): $KH_2\ PO_4$ – 2, $(NH_4)_2\ SO_4$ – 2, NaCl – 0,5, $MgSO_4 \times 7H_2\ O$ – 0,025, $FeSO_4 \times 7H_2\ O$ – 0,002, pH 7,2. Метанол и канамицин вносили в стерильные среды до концентрации 0,5 % (по объему) и 50 мкг/мл, соотвественно. Клетки микроорганизмов отделяли центрифугированием при 10000 g в течение 20 минут и промывали 50 мМ калий фосфатным буфером, pH 7,2.

Получение бесклеточного экстракта. Клетки, собранные в разные дни роста ресуспендировали в 50 мМ калий фосфатном буфере (pH 7,2). Полученную суспензию разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе (УЗД) MSE150 (Англия) при охлаждении льдом: 12 циклов по 10 секунд с интервалом 60 секунд, центрифугировали при 30 000 g в течение 30 мин при 4 °С. Полученный бесклеточный экстракт использовали для дальнейших опытов.

Определение активности. Активность МДГ определяли спектрофотометрически при 30 ºС с ФМС и ДХФИФ в качестве акцепторов электронов. Анализируемая смесь содержала 1,5 мл 100 мМ Трис-HCl, pH 9,0, 300 мкл деионизованной воды, 50 мкл 10 мМ $CH_3\ OH$, 50 мкл 87 мкМ ДХФИФ, 50 мкл 1,1 мМ ФМС и фермент (10 – 50 мкл). Буфер готовили с добавлением $NH_4\ Cl$ и KCN. Смесь, содержащую буфер (Трис-HCl + $NH_4\ Cl$ + KCN), воду и метанол инкубировали в течение 5 минут, и затем добавляли акцепторы электронов ДХФИФ и ФМС, и измеряли тангенс неспецифической реакции ($\Delta ОП_{600}$ / *мин Контроль*). Реакцию инициировали добавлением экстракта, активность МДГ определяли путем измерения уменьшения поглощения ДХФИФ при 600 нм ($\varepsilon = 1{,}9 \cdot 10^4\ М^{-1}см^{-1}$) за 1 мин, реакция проходит в пределах 15–45 сек.

$$Активность(Ед./мл) = \frac{(\Delta ОП_{600} / мин\, Опыт - \Delta ОП_{600} / мин\, Контроль) \times Vреакц.смеси, мл \times f}{19 \times Vобразца, мл}$$

Удельная активность (Ед. / мг белка) = (Ед. / мл)×1/С

где *f* – коэффициент разбавления исходного раствора препарата фермента; 19 – коэффициент миллимолярной экстинкции ДХФИФ при 600 нм, pH 9,0, $М^{-1}см^{-1}$; $V_{образца}$ – объем образца в мл; С – концентрация белка в исходном растворе, мг/мл. За единицу активности принимали количество МДГ, которое катализирует за минуту превращение 1 мкмоль метанола в формальдегид при pH 9,0 и 30° С.

Приём материалов статей по адресу: actbio@mail.ru

Белок в экстрактах определяли методом Лоури, в качестве стандартного белка использовали раствор БСА.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Зависимость активности МДГ от времени роста метилобактерий.

Предполагается, что максимальная активность МДГ в бесклеточном экстракте должна приходиться на 1–3 сутки роста метилобактерий, что соответствует фазе ускорения роста и экспоненциальной фазе, в которых наблюдается максимальная скорость деления клеток и клеточная популяция считается наиболее жизнеспособной. Для выявления зависимости активности фермента от времени роста бактерий были отобраны 5 образцов биомассы на разные сутки роста бактерий. Биомассу разрушали на УЗД как описано в методике и определяли активность и концентрацию белка. Результаты измерений представлены на рис. 1.

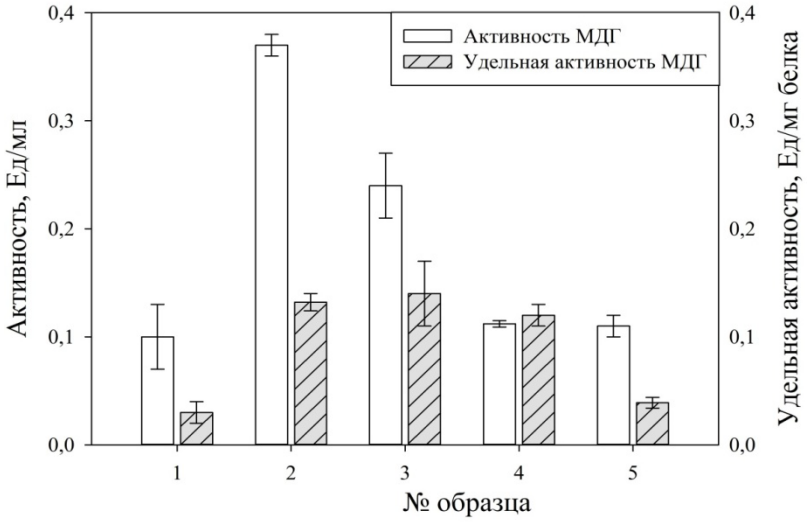


Рис. 1. Изменение активности и удельной активности МДГ бесклеточном экстракте M. extorquens pCM160 в зависимости от времени роста бактерий.

Результаты эксперимента показали, что наивысшая активность МДГ в бесклеточном экстракте *M.extorquens* pCM160 приходится на вторые сутки (0,37 ± 0,01 Ед./мл), а удельная активность на третьи сутки (0,1 4 ± 0,03 Ед./мг белка). В первые, четвертые и пятые сутки активность фермента ниже, что характерно для стационарной фазы и фазы отмирания микроорганизмов, когда лимитирующим фактором является нехватка питательных ресурсов, а процент погибших клеток превышает процент выросших. На основе полученных результатов предлагается для получения биоматериала с наивысшей активностью фермента МДГ проводить сбор биомассы не позднее третьих суток, когда клетки находятся в экспоненциальной фазе роста.

Определение кинетических параметров фермента МДГ в бесклеточном экстракте M. extorquens pCM160.

Из литературных данных известно, что фермент МДГ не является высокоспецифичным и окисляет многие первичные соединения и небольшую часть вторичных, но проявляет повышенную окислительную активность по отношению к метанолу [7]. При изучении субстратной специфичности МДГ в бесклеточном экстракте *M.extorquens* pCM160 было показано, что максимальная активность и удельная активность приходится на такие субстраты, как метанол (1,33 ± 0,05 Ед./мл и 1, 2 ± 0,1 Ед/мг белка), этанол (1,1 ± 0,1 Ед/мл и 0,99 ± 0,05 Ед./мг белка) и бутанол-1 (1,12 ± 0,07 Ед./мл и 1,0 ± 0,1 Ед/мг белка). Поэтому данные субстраты использовали для определения кинетических параметров ферментативной реакции (рис. 2).

Полученные зависимости аппроксимировали к уравнению Михаэлиса-Ментен для описания кинетики ферментных реакций в гомогенных условиях, значения кинетических параметров для всех используемых в работе субстратов приведены в таблице 1.

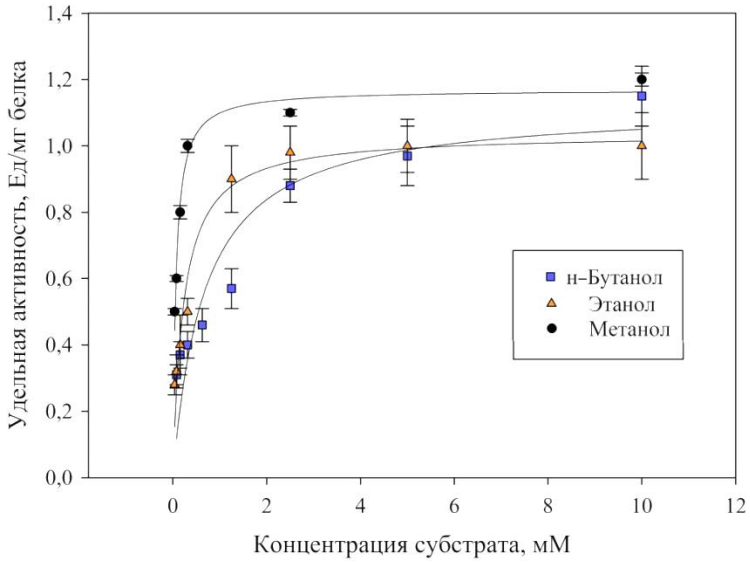


Рис. 2. Зависимость удельной активности МДГ в бесклеточном экстракте M.extorquens pCM160 от концентраций спирта.

Таблица 1. Параметры уравнения Михаэлиса-Ментен для МДГ из бесклеточного экстракта *M.extorquenspCM160*

Параметр	метанол	этанол	н-бутанол
V_{max}, Ед./мг белка	1,17 ± 0,03	1, 04 ± 0,05	1,04 ± 0,06
Кажущиеся K_M, мМ	0,0 64 ± 0,008	0,23 ± 0,05	0 ,5 ± 0,1
R	0,9894	0,9786	0,9899

Анализируя полученные данные, можно выявить зависимость уменьшения K_M с увеличением длины углеводородного радикала, максимальная скорость (V_{max}) для трех субстратов находится практически на одинаковом уровне. Наименьшая K_M характерна для метанола (0,064 ± 0,008 мМ), что свидетельствует о высшем сродстве фермента МДГ *M.extorquens* pCM160 к данному субстрату и согласуется с литературными данными (0,01–0,45 мМ [8]).

Влияние солей металлов на активность фермента МДГ в бесклеточном экстракте M. extorquens pCM160

Скорость ферментативной реакции, как и активность фермента, в значительной степени определяется присутствием в среде активаторов и ингибиторов, которые могут ускорять или тормозить протекание реакции. В ряде случаев ионы металлов (Co^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{2+}) выполняют функции простетических групп ферментов, могут служить акцепторами или донорами электронов, или выступать в качестве электрофилов либо нуклеофилов, сохраняя реакционные группы в необходимой ориентации. В других случаях они способствуют присоединению субстрата к активному центру и образованию фермент-субстратного комплекса. Ионы же тяжелых металлов (Cu^{2+}, Pb^{2+}, Hg^{2+}, Cd^{2+}) могут являться неспецифичными ингибиторами и приводить к необратимой денатурации белковой части фермента. Поэтому было решено проверить влияние ионов металлов на биокаталитические свойства фермента МДГ в бесклеточном экстракте *M. extorquens* pCM160. Измерения проводили по стандартной методике определения активности фермента с использование метанола в качестве субстрата и с добавлением растворов солей металлов в конечной концентрации в кювете 1 мМ. Значения удельных активностей МДГ в присутствии солей металлов выразили в процентах по отношение к контрольному раствору (табл. 2).

Эксперименты показали, что незначительное увеличение активности МДГ в бесклеточном экстракте наблюдается при внесении раствора соли Ca^{2+} (на 13 %), что может быть связано с наличием данного иона металла в активном центре фермента [9]. Из литературных данных известно, что ион Ca^{2+}, благодаря своим координационным связям с кислородом на карбонильном атоме C_5 в молекуле PQQ, стабилизирует его для атаки оксианионом или гидрид-ионом в механизме прямого гидридного переноса [10]. Поэтому добавление раствора данного иона может способствовать лучшей стабилизации активного центра и, как следствие, повышению активности МДГ.

Таблица 2. Влияние солей металлов на активность МДГ в бесклеточном экстракте *M.extorquenspCM160*

Вещество	Активность МДГ, %
Контроль	100,00± 0,02
NaCl	103,6± 0,9
$CaCl_2$	113± 2
$CoSO_4 \cdot 7H_2O$	45,1± 0,8
$Pb(CH_3COO)_2$	93± 2
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	90,51± 0,07
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	94± 2
$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	91± 1
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0

Незначительное снижение активности наблюдается при добавлении растворов солей Pb^{2+}, Zn^{2+}, Mg^{2+}и Mn^{2+}. Стоит отметить сильное ингибирование фермента раствором соли Co^{2+} (на 55 %) и полное подавление активности раствором соли Cu^{2+}. Случаи сильного ингибирования ферментов солями меди описаны во многих литературных источниках [11,12], в том числе и снижение активности МДГ) [13].

Стабильность фермента в бесклеточном экстракте M.extorquens pCM160 при различных условиях хранения.

Для изучения стабильности МДГ были подготовлены 2 образца бесклеточного экстракта *M.extorquens* pCM160, хранение которых проводили двумя способами – при + 4 ºС и -20 ºС. При этом провели мониторинг изменения активности фермента МДГ (рис. 3).

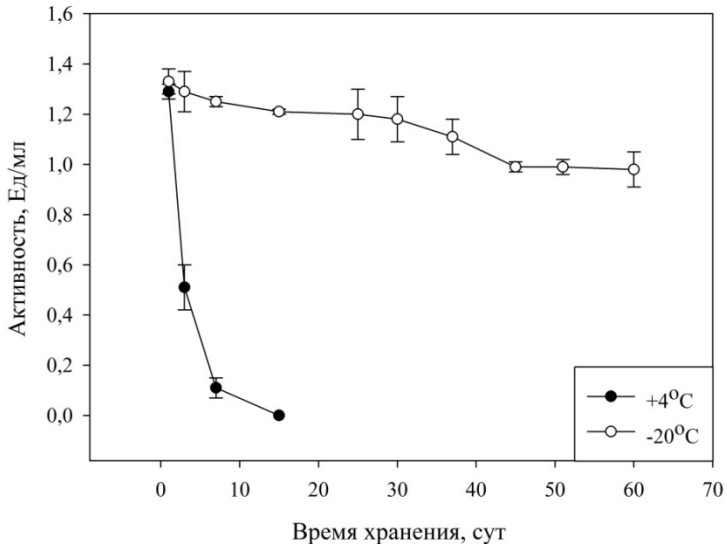


Рис. 3. Удельная активность МДГ в бесклеточном экстракте M.extorquens pCM160 при хранении.

Эксперименты показали, что образец бесклеточного экстракта *M.extorquens* pCM160, хранившийся при -20° С, за 60 суток потерял 26 % активность, что позволяет использовать данный биоматериал для дальнейших измерений. Хранение экстракта при +4° С не позволяет использовать биоматериал в биосенсорном анализе в долгосрочной перспективе, т. к. за 6 суток активность фермента снизилась на 90 %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе полученных результатов предлагается для получения биокатализатора с наивысшей активностью фермента МДГ, проводить сбор биомассы не позднее третьих суток, бесклеточный экстракт хранить при 20 °С и ниже. В ходе работы была подтверждена зависимость уменьшения удельной активности МДГ в бесклеточном экстракте *M.extorquens* pCM160 с увеличением длины и разветвленности углеводородного радикала (в ряду метанол (1 , 2 ± 0,1 Ед./мг белка) > этанол (0,99 ± 0,05 Ед./мг белка) > н-бутанол (1,0 ± 0,1 Ед./мг белка). Наименьшая K_M соответствует метанолу (0,064 ± 0,008 мМ), что свидетельствует о более высоком сродстве фермента МДГ к данному субстрату.

Анализ влияния растворов солей металлов на активность МДГ показал, что внесение раствора соли Ca^{2}+ повышает активность фермента на 13 %, что может быть связано с наличием данного иона металла в активном центре. Незначительное изменение активности наблюдается при добавлении растворов солей Na^{+}, $Pb2^{+}$, Zn^{2+}, Mg^{2+}и Mn^{2+}, в то время как под действием раствора соли Co^{2+} происходит сильное ингибирование фермента (на 55 %), а при внесении раствора соли Cu^{2+} – полное подавление активности.

ЛИТЕРАТУРА

Aerobic methylobacteria as promising objects of modern biotech-nology (Review) / Doronina N.V. [et al] // Applied Biochemistry and Microbiology. 2015. Vol. 51. № 2. P. 125–134.

Троценко Ю.А., Доронина Н.В., Торгонская М.Л. Аэробные метилобактерии / Ред. В.Ф. Гальченко. Пущино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2010. 325 с.

Доронина Н.В., Кудинова Л.В., Троценко Ю.А. *Methylovorus mays* – новый вид аэробных облигатных метилобактерий, ассоциированных с растениями // Микробиология. 2000. Т. 69. № 5. С. 712–716.

Моделирование биодеградации метана / Казаков Д.А. [и др.] // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2008. Т. 150, кн. 3.С. 91–97.

Троценко Ю.А., Доронина Н.В., Хмеленина В.Н., Понаморева О.Н. Биология и биотехнология аэробных метилотрофов: учебное пособие // Тула: Изд-во ТулГУ. 2010. 227 с.

Кузнецова Т.А., Троценко Ю.А. Конструирование рекомбинантной плазмиды для экспрессии гена метанолдегидрогеназы // Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов: Всероссийский симпозиум с международным участием. Москва, МГУ им. М.В. Ломоносова. Биологический факультет. 24–27 декабря 2014 г.: Материалы. М.: Макс Пресс, 2014. С. 137.

Гвоздев А.Р., Тухватуллин И.А., Гвоздев Р.И. Хиноновые алкогольдегидрогеназы и FAD-алкогольоксидазы // Биохимия. 2012. № 8. С. 1017–1032.

BRENDA – The Comprehensive Enzyme Information System. URL: https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php? ecno=1.1.2.7

The atomic resolution structure of methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* / Williams P.A. [et al] // Acta Cryst. 2005. V.61. P. 75–79.

A systems biology approach uncovers cellular strategies used by *Methylobacterium extorquens* AM1 during the switch from multi – to single-carbon growth / Skovran E. [et. al] // PLoS ONE. 2010 № 5: e14091. doi:10.1371/journal.pone.0014091.

Effects of copper on wild and tolerant strains of the lichen Photobionttrebouxiaerici (Chlorophyta) and possible tolerance mechanisms / Backor M. [et al] // Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 2003. V. 45. P. 159–167.

Faixová Z., Faix Š. Influence of metal ions on ruminal enzyme activities // ActaVeterinaria Brno. 2002. V. 71. P. 451–455.

Purification and properties of methanol dehydrogenase from *Methylosinus sp*. WI 14 / Grosse S. [et al] // J. Basic Microbiol. 1998. V. 38. № 3. P. 189–196.

УДК 328

ИННОВАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ ИЗ БУРЫХ ВОДОРОСЛЕЙ РОДА *LAMINARIA (SACCHARINA)*: ИХ ПРОИЗВОДСТВО

А.В. Подкорытова[1], И.А. Шашкина[2]

[1] Всероссийский НИИ рыбного хозяйства и океанографии, Москва, Россия
[2] ООО НПК «Вита-Ли, г. Дмитров, Россия

Специализированное питание и специализированные пищевые продукты – это обширное понятие, затрагивающее различные области, такие как спортивное, геродиетическое, питание при вредных условиях труда, питание беременных и кормящих матерей, детей раннего возраста, детское и школьное питание, интеральное и парентеральное питание, а также диетическое лечебное профилактическое. В последние десятилетия получили особое распространение различные заболевания у людей: сердечнососудистой системы, желудочно-кишечного тракта, нарушения деятельности щитовидной железы, диабет, онкозаболевания, ожирение и другие метаболические нарушения, вызывающие особую озабоченность и внимание со стороны представителей лечебной и профилактической медицины.

Национальные проекты в сфере здравоохранения поддерживают развитие профилактических мер в медицине и, в связи с этим, особенно актуальны разработки новых высокотехнологичных процессов производства специализированных пищевых продуктов, в том числе из водорослей, для диетического лечебного и профилактического питания.

Особое значение имеют всесторонние исследования СПП, а также клинические испытания, являющиеся доказательной базой для применения этих продуктов в специализированном питании в комплексной терапии различных заболеваний и их профилактике.

Актуальность разработки технологии специализированных пищевых продуктов (СПП), обладающих диетическими лечебными и профилактическими свойствами, определяется не только состоянием здоровья и качеством питания современного человека, но и экологией территорий проживания, зачастую катастрофически влияющей на здоровье населения. Но при этом необходимо для достижения высокого социального эффекта сотрудничество между наукой и бизнесом. Т.е. должно быть предприятие, заинтересованное во внедрении разработанных технологий и, в промышленных масштабах, производить СПП на высокотехнологичном современном оборудовании.

Научными исследованиями доказано, что бурые водоросли и их биокомпоненты играют значительную роль в питании и оздоровлении населения прибрежных морских регионов, а в настоящее время уже они становятся неотъемлемой частью лечебно-профилактического питания населения, проживающего в центральных регионах России и других стран. Биологическое действие бурых водорослей на организм обусловлено разнообразными природными химическими веществами, которые в наземных растениях не обнаруживаются, но играют значительную роль в деле профилактики и лечения различных органов и систем организма человека. В связи с этим очевидно, что организация производства лечебно-профилактических продуктов и биологически активных добавок из бурых водорослей актуальна.

Как правило, возникает вопрос о выборе места для размещения предприятия, что всегда является очень важным и влияющим на эффективность его работы. Еще в 20-ом веке стремились разместить подобные предприятия в непосредственной близости от сырьевой базы. Но в мировой практике и в России также, это уже не является обязательным в связи с существующей технологией заготовки и первичной обработки водорослей, их высушивания в местах добычи или выращивания. Сушеные водоросли доставляются к месту переработки любым доступным транспортом, так как логистика в настоящее время хорошо отработана. Предприятие, как правило, привязывают к месту с хорошо развитой инфраструктурой, обеспеченному транспортной развязкой, электроэнергией и водой, а также кадрами, без которых невозможна организация высокотехнологичного производства.

Следует отметить, что технология производства биогелей из бурых водорослей была разработана ещё вначале 90-тых (Патент № 2041656, Подкорытова А.В. и др., 1995), а затем был разработан «Способ получения функциональных продуктов питания из морских водорослей» с производством не только биогелей, но и йод- и фукоидансодержащих экстрактов, напитков, десертов, паштетов, соусов – т. е. широкого ассортимента функциональных пищевых продуктов (Патент № 2385654, Подкорытова А.В. и др., 2009). Для осуществления проекта взаимодействия науки и бизнеса был заключён договор между ФГБНУ «ВНИРО» и НПК «Вита-Ли». Специалистами ФГБНУ «ВНИРО» был подготовлен пакет документов, содержащий ТУ и ТИ на производство продуктов диетического лечебного профилактического питания, исходные требования (ИТ) к проектированию предприятия, содержащие спецификацию оборудования его расстановку и многие другие документы необходимые для строительства предприятия, соответствующего требованиям Российских ГОСТов и СНиПов (строительные, санитарные, противопожарные нормы, а также международным требованиям GMP – "Надлежащая производственная практика" – "Good Manufacturing Practice».

Сотрудничество между ФГБНУ «ВНИРО» и НПК «Вита-Ли» было также скреплено лицензионным договором на неисключительное право использования патента № 2385654 «Способ получения функциональных продуктов питания из морских водорослей». Договор зарегистрирован в Федеральной службе по интеллектуальной собственности. В рамках договора специалисты ФГБНУ «ВНИРО» ведут авторский надзор и осуществляют научную поддержку при разработке новых форм биогелей и другой продукции из ламинарии и фукуса. К настоящему времени в рамках лицензионного договора разработаны новые технологические решения, применяемые при получении альгинатсодержащих водорослевых биогелей с разнообразным функциональными свойствами, катионным составом, обладающих свойствами и статусом диетических лечебных и профилактических СПП из водорослей, защищенные патентами Российской Федерации.

Биогели из ламинарии – это альгинатсодержащие продукты. В настоящее время альгиновая кислота и её соли – альгинаты рассматриваются как важнейшие адсорбенты с точки зрения медицины. В отличие от других сорбентов, альгинаты связывают тяжелые металлы, радионуклиды и другие токсины в организме человека без нарушения кальциевого обмена.

Разнообразные формы альгинатов применяются в медицине. Растворимые в воде альгинаты и альгинатсодержащие продукты широко применяются для лечения ЖКТ. С другой стороны на основе альгинатсодержащих биогелей существовала реальная возможность создания минеральных комплексов с целью использования их как источник жизненно необходимых элементов в органически связанной форме.

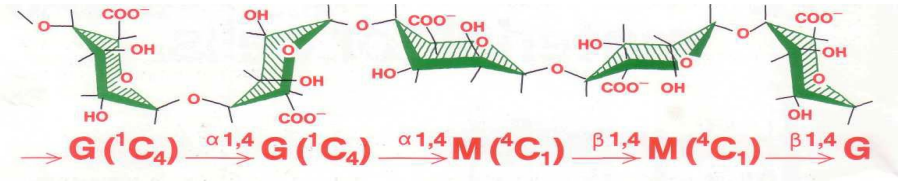


Рис. 1 Структурная формула альгиновой кислоты. G – блоки L – гулуроновой кислоты; M – блоки D – маннуроновой кислоты

Известно, что недостаток тех или иных микроэлементов сказывается на состоянии и жизнедеятельности организма:

Железо (Fe) – составная часть протеиновых соединений, гемоглобина (важнейшего элемента клеток крови). Железо обеспечивает клетки и ткани кислородом, участвует в процессах синтеза ДНК и АТФ и физиологической детоксикации тканей и органов, поддерживает в функциональном состоянии иммунную систему. Дефицит железа вызывает тяжелую анемию.

Медь (Cu) – участвует в синтезе коллагена, ферментов кожи, красных кровяных телец. Дефицит меди вызывает задержку роста, дерматозы, облысение, истощение организма.

Хром (Cr) – регулирует углеводный обмен, стимулирует проницаемость клеток для усвоения глюкозы. Дефицит хрома способствует развитию сахарного диабета (особенно у беременных).

Селен (Se) – катализатор витамина Е, входит в состав мышечной ткани, защищает клетки от патологических (злокачественных) мутаций, улучшает репродуктивную функцию.

Йод (I) – регулирует работу щитовидной железы (является компонентом тироксина и трийодтиронина), гипофиза. Особенно необходим для людей, занимающихся интеллектуальным трудом. При дефиците йода развиваются нарушения нормальной деятельности щитовидной железы. В детском возрасте недостаток йода приводит к задержке умственного развития.

Альгинаты биогелей – это природные ионообменники и способны образовывать ионные связи с минеральными элементами. На основе этого свойства альгинатов разработаны способы, механизмы и технологии создания на основе ламинариевых гелей органически связанных форм элементов, таких как Cr, Se, Fe, Cu и их минерального комплекса.

В качестве базы для создания новых биогелей из ламинарии с минеральными элементами в их концентрации 40 % допустимой суточной дозы использовали биогель Витальгар, предназначенный для применения в качестве диетического лечебного средства при заболеваниях ЖКТ и как источника органического йода и пищевых волокон.

В результате проведения технологического процесса образуются бигели из ламинарии, содержащие микроэлементы Cu, Fe, Cr, Se или их комплекс в органически связанной форме с альгиновой кислотой. Ассортимент биогелей «Витальгар» значительно расширен. Разработана технология и техническая документация на производство биогеля из ламинарии с микро-элементами и технические условия ТУ 9284–003–42233132–15, которые введены в действие с 30.04.2015 г. Новые продукты прошли экспертизу в НИИ питания РАМН и получили Государственную регистрацию как СПП.

В настоящее время Биогели с микроэлементами Se, Cr, Fe, Cu и их комплексом выпускает предприятие ООО НПК «Вита-Ли» в следующем ассортименте:

– «Альгокуприн» – биогель из ламинарии с медью;
– «Ферромарин» – биогель из ламинарии с железом;
– «Хромомарин» – биогель из ламинарии с хромом;
– «Селеномарин» – биогель из ламинарии с селеном;
– «Витальгар минеральный комплекс» – биогель из ламинарии с комплексом минеральных элементов. Области применения биогелей значительно расширены вследствие содержания в них от 10 до 40 % суточной потребности организма в этих микроэлементах.

Ещё один важнейший аспект обеспечения организма жизненно необходимыми макроэлементами, такими как Ca, K, Na, Mg. Естественное их получение организмом человека – это из повседневной пищи. Но все-таки дефицит в этих важнейших макроэлементах испытывают отдельные группы населения в России (в 20–55 % случаях), что приводит к развитию различных и широко распространенных заболеваний: анемии, остеопороза, дефектам сердечнососудистой деятельности, нарушениям функции щитовидной железы и замедлению физического и умственного развития и др. Калий и магний – важнейшие микроэлементы необходимые для нормальной деятельности сердечнососудистой системы. *Магний* участвует во многих физиологических процессах, обеспечивающих нормальное функционирование организма. Это один из основных участников процесса формирования костей, энергетического и углеводного обменов, регулирования работы нервной ткани, оказывает влияние на ритм сердечных сокращений. Участвует в регуляции артериального давления, препятствует образованию тромбов, предотвращает стенокардию, усиливает действие калия, благодаря чему поддерживается нормальное состояние мышечной ткани. Суточная доза потребления магния 300–450 мг. *Калий* – важнейший строительный материал клеток, регулирует кислотно-щелочной баланс крови и принимает активное участие в передаче нервных импульсов, положительно влияет на нервную и сердечно-сосудистую системы, нормализует давление, повышает выносливость всего организма. Суточная норма потребления 2000–2500 мг калия. Дефицит макроэлементов калия и магния, потребность которых в организме особенно велика, приводит к серьёзным последствиям.

К настоящему времени ФГБНУ «ВНИРО» и НПК «Вита-Ли» закончили разработки технологии биогелей с K и Mg, а также калий-магниевые биогели с флавоноидами боярышника для профилактики сердечнососудистых заболеваний и как дополнительный источник растворимых пищевых волокон (альгинатов), йода. Калий-магниевые соли альгиновой кислоты, образующиеся в биогеле, хорошо растворимы в воде, обладают вязкостными и обволакивающими свойствами. В связи с этим они обладают в полной мере лечебно-профилактическими свойствами относительно ЖКТ, не перевариваются в желудочно-кишечном тракте и не всасываются, являются источниками калия и магния, и выводятся из организма естественным путём вместе адсорбированными токсинами различной этиологии.

Вторая форма биогеля Витальгар® Кардио, кроме калия и магния, содержит экстракт боярышника обладающего, так называемым, кардиотоническим действием. Экстракт боярышника получают прямым водным экстрагированием биологически активных веществ из сушеных плодов боярышника. В процессе экстракции в экстракт переходят биологически активные вещества, свойственные боярышнику: флавоноиды, органические кислоты (каротиноиды, дубильные вещества, жирные масла, тритерпеновые и флавоновые гликозиды, бета-ситостерин, холин, сахара, витамины и пектины). Экстракт из цветков и плодов боярышника оказывает статистически достоверное гипогликемическое воздействие, улучшает состояние органов (почек, печени) при сахарном диабете, и обладают богатым антидиабетическим потенциалом. Прием экстрактов, наряду с медикаментозным лечением положительно воздействует на артериальное давление у больных сахарным диабетом. Экспериментальные исследования на животных показали, что экстракты боярышника защищают от повреждения клетки головного мозга, при искусственно вызванной ишемии. Таким образом, экстракты из боярышника широко применяется в практике лечения кардиологических заболеваний. Плоды боярышника оказывают антиаритмическое, кардиотоническое действие, улучшают коронарное кровообращение, оказывают гипотензивное воздействие. Препараты из боярышника обладают антиоксидантной активностью, благодаря чему проявляются кардиопротекторные, нейропротекторные, противовоспалительные, противоопухолевые, радиопротекторные, противоаллергические свойства.

Принято считать, что кардиотоническое действие экстракта боярышника является результатом расширения венечных сосудов сердца, возникающего под влиянием содержащихся в растении тритерпеновых кислот. Экстракт содержит антиоксиданты – тритерпеновые кислоты, которые активизируют кровоток, они обладают антирадикальным действием, укрепляют стенки сосудов.

Кроме того, Витальгар Кардио с боярышником содержит еще и пектин, содержащийся в плодах боярышника и переходящий в водный экстракт. Затем пектин с экстрактом направляют в биогель. Это дополнительный адсорбент, выводящий из организма токсины различного происхождения.

Пектины – это водорастворимые полисахариды, содержатся в яблоках, цитрусовых, свекле, во многих ягодах, в боярышнике и др. плодах и овощах. Пектинам характерно гелеобразование в присутствие органических кислот и сахара. Это свойство широко используется в пищевой промышленности при изготовлении желе и мармеладов.

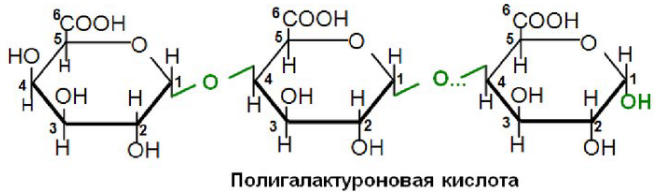


Рис. 2. Структурная формула пектинов плодов наземных растений

Пектиновые вещества применяются в медицине как лечебное и профилактическое средство. Они способствуют выведению из организма токсичных тяжелых и радиоактивных металлов. Пектин снижает содержание холестерина на 17 % у наблюдаемых здоровых людей и на 35 % у больных с врожденной гиперхолестеринемией. Пектин обладает антисептическими свойствами. Действуя на бактерии строго индивидуально, он обладает антибактериальной активностью по отношению к дизентерийным бактериям, стафилококкам и несколько слабее к кишечной палочке. Пектины используют в лечебном питании.

На базе ФГБУ «Государственный научный центр РФ, Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» проведены клинические исследования с целью установления эффективности применения биогелей из ламинарии «Витальгар® Кардио» с калием и магнием и «Витальгар® Кардио» с калием, магнием и боярышником в комплексном терапевтическом лечении кардиологических больных с нарушениями сердечного ритма.

Результаты клинических испытаний показали, что обе формы биогеля «Витальгар® Кардио» одинаково хорошо переносились всеми без исключения пациентами (в обеих экспериментальных группах, независимо от гендерного признака).

На фоне комплексной терапии у пациентов с нарушениями сердечного ритма различного генеза и морфологии отмечено улучшение переносимости физических нагрузок, снижение показателей BNP, снижение функционального класса сердечной недостаточности. Заметно лучшая динамика была отмечена в группе пациентов, получавших биогель с боярышником. Применение в комплексной терапии у пациентов с нарушениями сердечного ритма различного генеза коктейлей, приготовленных из «Витальгара® Кардио» с калием и магнием и «Витальгар® Кардио» с калием, магнием и боярышником, дважды в день в течение 30 календарных дней привело к улучшению общего самочувствия, некоторой потере массы тела, улучшению деятельности пищеварительной и выделительной систем, улучшению состояния кожи.

На фоне комплексной терапии в обеих группах отмечалась положительная динамика психоэмоционального состояния при оценке уровня качества жизни. Не было зарегистрировано отрицательной динамики, как по нарушениям ритма сердца, так и по основному и сопутствующему заболеваниям; не потребовалось прекращения приема биогеля по медицинским показаниям.

На основании результатов проведённых клинических исследований разработаны рекомендации по применению: СПП биогели из ламинарии «Витальгар® Кардио» с калием, магнием и «Витальгар® Кардио» с калием, магнием и боярышником рекомендовано применять в виде водных коктейлей в комплексной терапии у кардиологических больных с нарушениями сердечного ритма различного генеза дважды в день по 200 мл в течение 30 календарных дней. По рекомендации врача курс приёма продолжить до 3 месяцев.

Биогель Витальгар® Кардио рекомендуется применять для ускоренного выведения токсичных веществ из организма, таких как свинец, ртуть, кадмий, кобальт, метанол, для адсорбции избыточного количества липидов (жиров), а также для выведения радионуклидов.

Биогели Витальгар рекомендуется применять: как диетический лечебный в комплексной терапии гастроэнтерологических заболеваний – это гастриты, язва желудка и двенадцатиперстной кишки, колиты, гастродуоденальный эзофагит с кислотным рефлюксом (выброс содержимого желудка в пищевод), при йоддефицитных состояниях, при железодефицитной анемии, заболеваниях

диабетом 2-го типа, при ожирении, при недостатке микроэлементов – селена, меди, хрома, железа, калия, магния, с целью устранения последствий недостатка этих микроэлементов; в комплексной терапии у кардиологических больных с нарушениями сердечного ритма различного происхождения, при необходимости проведения энтеросорбции (детоксикации, очищении организма) при заражении токсинами различного происхождения.

Научные разработки в области создания новых специализированных пищевых продуктов обеспечиваются лицензионным договором с ФГБНУ «ВНИРО», а также разработкой научно обоснованных процессов и их проведением научной группой ФГБНУ «ВНИРО».

ЛИТЕРАТУРА

Разумов А.Н., Бобровницкий И.П., Михайлов В.И., Мостовой С.М., Подкорытова А.В. и др.) Влияние геля из бурых морских водорослей на иммунитет, функцию внутренних органов. Технология изготовления, использование для диетического и лечебно-профилактического питания/М.: Изд-во "Медицина для всех". 2004. 239 с.

Подкорытова А.В. 2005. Морские водоросли – макрофиты и травы. М.: Изд-во ВНИРО. – 174 с.

Патент РФ № 2041656 Способ получения пищевого полуфабриката из ламинарии японской/ А.В., Подкорытова, Н.М. Аминина, Е.А. Ковалева. – Опубл. 27.12.96. – БИПМ № 36.

Патент № 2385654. Способ получения функциональных продуктов питания из морских водорослей и функциональные продукты / Подкорытова А.В., Вафина Л.Х., Игнатова Т.А. Опубл. 10.04.2010. БИПМ № 10.

Патент RU 2629975 с 1. Пищевой диетический и профилактический продукт на основе водорослевого геля с минеральным комплексом / Подкорытова и др., Опубл. 05.09.2017, Бюл. № 25

Патент RU 2620639 с 1. Способ получения геля из ламинарии с экстрактом боярышника для диетического лечебно-профилактического питания/ Подкорытова и др., Опубл. 29.05.2017, Бюл. № 16

Tadić V.M., Dobrić S., Marković G.M., Dordević S.M., Arsić I.A., Menković N.R., Stević T. Anti-inflammatory, gastroprotective, free-radicalscavenging, and antimicrobial activities of hawthorn berries ethanol extract – J. Agric. Food. Chem. 2008, Sep 10, 56(17), 7700–7709.

Zhou C.C., Huang X.X., Gao P.Y., Li F.F., Li D.M., Li L.Z., Song S.J. Two new compounds from Crataegus pinnatifida and their antithrombotic activities – J. Asian. Nat. Prod. Res. 2014, 16(2), 169–174.

Wen L., Guo X., Liu R.H., You L., Abbasi A.M., Fu X. Phenolic contents and cellular antioxidant activity of Chinese hawthorn "Crataegus pinnatifida" – Food Chem. 2015, Nov 1, 186, 54–62.

УДК 328

ОПТИИЗАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВРОВАНИЯ БИФИДОБАКТЕРИЙ

И.Д. Поздняков

Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления технологий, Улан-Удэ, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Желудочно-кишечный тракт является одним из наиболее важных органов человеческого тела и уязвим к различным заболеваниям. Доступные лекарства часто имеют низкую эффективность или связаны со многими неблагоприятными последствиями. Поэтому альтернативные препараты необходимы для лечения желудочно-кишечных с целью избежание осложнений.

Нормальная микрофлора слизистых оболочек является одним из ключевых регуляторов иммунной системы организма.

Функциональные расстройства пищеварения являются наиболее важными, и от них страдают около 50 % пациентов. Лекарственные растения способны уменьшать воспаление и выражение болевые синдромы, оказывать спазматическое и секретостимулирующие действие. Желудочно-кишечный тракт является одним из наиболее важных органов в организме человека, и уязвим для большого разнообразия заболеваний.

Выделение желчной кислоты, основная причина повреждения слизистой оболочки желудка, которая может вызвать атрофию слизистой оболочки и кишечную метаплазию. Способность лекарственных растений оказывать кровоостанавливающие, седативное и обволакивающие действие уже давно вызывает интерес ученых.

Цель работы – разработка питательной среды с использованием растительного экстракта Арура – Тан для культивирования бифидобактерий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура молочнокислых бактерий Bifidobacterium longum штамм B379M.

Экстракт сбора растений Арура-Тан ТУ 9370–005–03533369–10, ЗГР 77.99.11.3.У2755.4.10 от 28.04.10.

Состав Аура-тан: Цветки ноготков – 25 %, плоды шиповника – 20 %, плоды боярышника -15 %, корневища и корни девясила – 10 %, листья подорожника 10 %, плоды кориандра – 5 %, плоды подорожника – 10 %, плоды облепихи 10 %, корни солодки – 5 %, трава сушеницы топяной 5 %.

1) Наращивание биомассы судили по оптической плотности, которую определяли на спектрометре. Определение количества клеток в среде (концентрация клеток), используя светопоглощающие (абсорбция) свойства клеточной культуры. Клеточная культура обладает определенными оптическими свойствами, определяющими ее состояние, плотность и т. д.

2) Капилярный электрофорез. Метод основан на разделении компонентов сложной смеси в кварцевом капилляре под действием приложенного электрического поля. Микрообъем анализируемого раствора вводят в капилляр, предварительно заполненный подходящим буфером – электролитом. После подачи к концам капилляра высокого напряжения (до 30 кВ), компоненты смеси начинают двигаться по капилляру с разной скоростью, зависящей в первую очередь от заряда и массы (точнее – величины ионного радиуса) и, соответственно, в разное время достигают зоны детектирования [1].

На первом этапе исследования изучали влияние различных концентраций экстракта Арура – Тан на рост биомассы Bifidobacterium longum B379M, в качестве контроля использовали питательную среду без добавления растительного экстракта. Питательная среда представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Питательная среда для культивирования молочнокислых бактерий.

Контроль		Растительный экстракт Аура-Тан
Сыворотка твороженная	1000	Концентрация растительного экстракта 20 % 30 % 50 %
Закваска бифидобактерий	50	
Натрий лимоннокислый трехзамещенный	1	
Калий фосфорнокислый однозамещенный	0,5	
Аскорбиновая кислота	0,1	
Агар пищевой	1,3	
Натрий углекислый	0,5–1	

Для проведения анализа использовали систему капиллярного электрофореза «Капель-105М» предназначенную для количественного и качественного определения состава проб веществ в водных и водно-органических растворах методом капиллярного электрофореза

В таблице 2 представлены результаты исследования химического состава экстракта лекарственного растения Арура-Тан.

Таблица 2 – Химический состав экстракта Арура-Тан.

N	Время	Компонент	Конц., мг/л
1	3.510	Хлорид-ионы	104
2	3.718	Сульфат-ионы	11.1
3	3.943	Нитрат-ионы	1.51
4	4.310	Фторид-ионы	2.56
5	4.740	Фосфат-ионы	6.22
6	2.850	Br-	0.184
7	3.342	K	541
8	3.917	Na	128
9	4.395	Li	0.515
10	4.743	Mg	27.2
11	5.870	Ca	149
12	3.118	щавелевая	0.788
13	3.515	винная	4.22
14	3.958	лимонная	40.6

Из таблицы 2 видно, что в экстракте растения Аура – Тан содержатся органические кислоты: щавелевая, винная, лимонная 0788, 4,22 и 40,6 мг/л соответственно; минеральные вещества: калий, натрий, литий, магний, кальций в концентрации 541, 128, 0,515, 27,2 149, 11,5 и 149, мг/л соответственно; а также ионы: брома 0,184 мг/л, хлорида, сульфата, нитрата, фторида и фосфата – 104, 11,1, 1,51, 2,56, 6,22 мг/л соответственно. Известно содержание кислоты аскорбиновой (не менее 0,1 %), каротин (0,6–8 мг %), витамины В1, В2, РР, К, вещества пектиновые (1,6–3 %), сахара (0,7–8,1 %).

В дальнейших исследования изучали влияние различных доз концентрата в питательной среде на рост биомассы бифидобактерий, полученные результаты представлены на рисунке 1.

Анализ данных рисунка 1 показывает, что с увеличением дозы экстракта интенсифицируется процесс наращивания биомасс, при дозе концентрата 30 % оптическая плотность составляет 0,653, а дальнейшее увеличение дозы до 50 % не вызывает значительных изменений оптической плотности в сравнении с контролем.

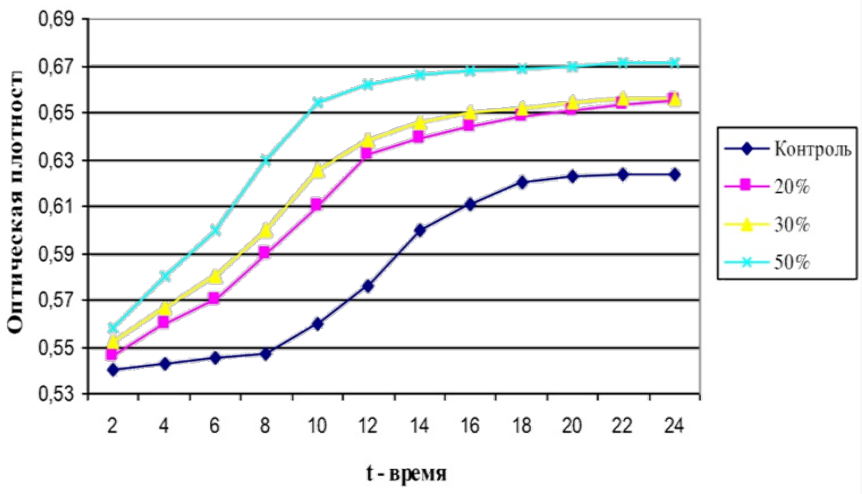


Рисунок 1 – Влияние различных доз растительного экстракта Арура – Тан на рост биомассы Bifidobacterium longum B379M.

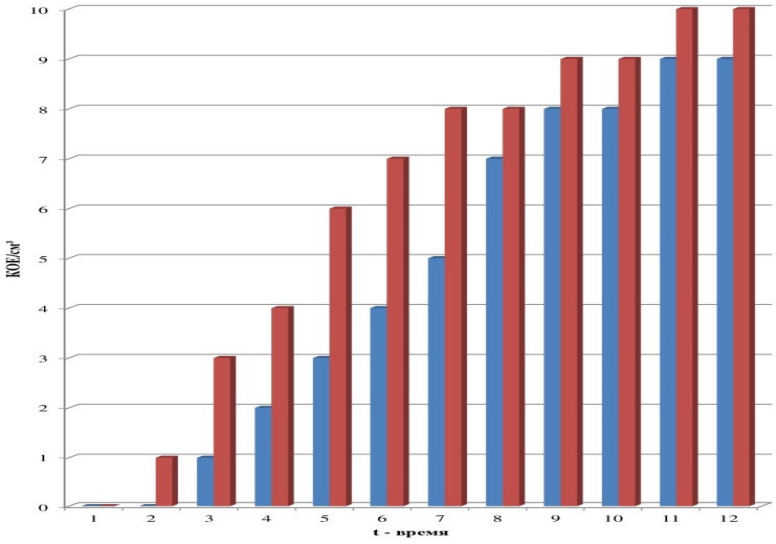


Рисунок 2 – Влияние растительного экстракта Арура – Тан на культуру молочнокислых бактерий Bifidobacterium longum штамм B379M.

Оптимальная доза внесения экстракта растительного сбора Арура – Тан 30 %. По результатам эксперимента (рис. 2) можно сделать вывод, что растительный экстракт Арура – Тан положительно влияет на культуру Bifidobacterium longum штамм B379M.

Количество клеток в образце, содержащим 30 % растительного экстракта Арура – Тан, к концу культивирования составило $10\times10^{1\circ}$ КОЕ/см^3.

ВЫВОДЫ

Таким образом внесение экстракта Арура – Тан стимулирует рост биомассы бифидобактерий. Вероятно биологически активные вещества: органические кислоты, минеральные вещества, витамины, а так же слизь и большое содержание полисахаридов в том числе инулина, создают благоприятные условия для роста бифидобактерий.

В результате проведенных исследования разработана питательная среда содержащая экстракт лекарственного растения Арура–Тан.

ЛИТЕРАТУРА

1. Видмер Г.М., Кельнер Р., Мерме Ж. – М., Отто М. Аналитическая химия. Проблемы и подходы. Том 2: учеб. пособие. Москва: МИР. 2004 г., с 646.

УДК 66.047

НОВОЕ В БИОТЕХНОЛОГИИ ЛИЗОЦИМА ИЗ ЖИВОТНОГО СЫРЬЯ

Г.П. Шуваева, П.А. Ворон, Т.В. Свиридова, О.Л. Мещерякова

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Разработка биотехнологии и изучение свойств лизоцима для использования его как препарата широкого антимикробного действия является актуальной задачей.

Лизоцим – природный белок-фермент, синтезируемый животным организмом. Благодаря ему, в компоненте клеточной стенки бактерий пептидогликане (муреине), происходит гидролиз гликозидной связи между N-ацетилглюкозоамином и N-ацетилмурамовой кислотой, что приводит к разрушению структуры клеточной стенки и, как следствие, гибели бактериальной клетки. Защитная функция мурамидазы используется для разработки новых компонентных препаратов на основе лизоцима, как консервирующей добавки натурального происхождения для применения в пищевой промышленности, в том числе, в технологии производства продуктов детского питания, в медицине как противомикробное средство. Современный рынок располагает лизоцимсодержащими добавками импортного производства – «Клеризима» и «Delvozyme», которые используют вместо искусственных консервантов или совместно с ними, однако доля отечественного лизоцима на ранке ферментных препаратов весьма незначительна, не более 20 %.

На сегодняшний день для промышленного производства мурамидазы чаще всего используют яичный белок, который по содержанию мурамидазы превосходит другие источники, но это производство имеет высокую стоимость и недостатки, связанные с сопутствующими примесями, вызывающими аллергические реакции. В связи с этим, перспективным является разработка методов получения лизоцима из другого сырья – слюнных желез крупного рогатого скота.

В связи с этим, цель исследования состояла в разработке технологии лизоцима из отходов мясоперерабатывающего производства – слюнной железы крупного рогатого скота, рациональное использование которой создает дополнительные резервы для успешной реализации безотходных технологий и импортозамещения.

Слюнные железы крупного рогатого скота, собрали в парном состоянии до или после отделения голов на подвесных путях конвейера Воронежского мясокомбината в соответствие с общими требованиями, предусмотренными при заготовке эндокринно-ферментного сырья.

Хранили слюнные железы в холодильных камерах при температуре 18–20° С ниже нуля.

Выделение околоушной слюнной железы – gl. parotis осуществляли после рассечения околоушной фасции и иссечения основания железы, которое находится в углублении под корнем ушной раковины и крыльями атланта, прикрывающими задний край железы. Иссечение вентральнай части нижнечелюстной железы – gl. mandibularis делали в области межчелюстного пространства, рассекая массетер.

После изъятия слюнных желез проводили процесс экстракции фермента, предварительно измельчив железы на волчке до диаметра частиц (0,1–0,3) мм.

Было изучено влияние природы экстрагента и времени экстракции на количество и активность выделяемого фермента. Для этого равный объем фарша слюнных желез заливали 5 кратным количеством экстракционной жидкости. Полученную суспензию оставляли стоять в течение 5 – 6 часов при комнатной температуре, после чего жидкость отфильтровывали через асбестовый фильтр. Учитывая физико-химические и биологические свойства лизоцима, в качестве экстрагентов были выбраны вода, 0,15 М раствор NaCl, 0,1 М уксусная кислота и 1 %-ный раствор лимонной кислоты .

В полученном фильтрате проверяли активность лизоцима нефелометрическим методом. Наиболее эффективным оказался хлорид натрия (рис. 1). При экстракции 0,15 М раствором данной соли, активность лизоцима была наиболее высокой.

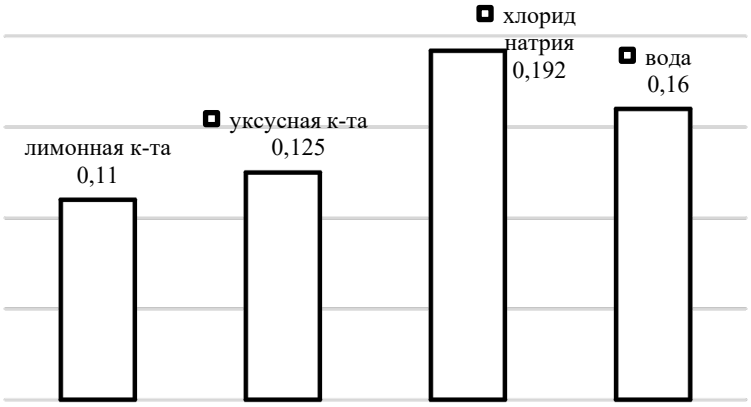


Рисунок 1 – Активность мурамидазы в зависимости от экстрагента

Для оценки влияния времени экстракции на активность мурамидазы экстрагирование вели в течение 10 часов, каждые 2 часа определяя активность лизоцима (рис. 2). Как видно из рисунка, наибольшей активностью обладает экстракт, полученный при экстракции в течение 6 часов. Уменьшение времени экстракции до 4 часов или увеличение до 8 ч снижает активность фермента в экстракте.

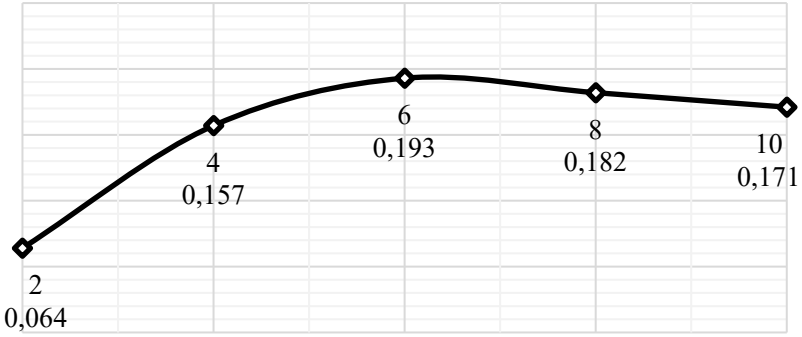


Рис. 2 – Влияние времени экстракции на активность фермента

Полученный фильтрат, содержащий лизоцим, смешивали в равных пропорциях с раствором желатина, который предварительно растворяли в воде в соотношении 1 : 10 при при температуре (35 – 40)° С, способного образовывать при охлаждении студень, После тщательного размешивания полученную смесь разливали в формы и охлаждали до температуры 10° С.

Полученный после охлаждения студень разрезали на пластины толщиной около 0,5 см, и высушивали методом лиофилизации. После высыхания листы желатина представляют собой сухой препарат лизоцима, включенного в высохший коллоид. В таком виде он хорошо сохраняется, так как защищен от внешних воздействий и не соприкасается с воздухом [2].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Уникальные антимикробные свойства мурамидазы, ее участие в неспецифической защите организма и широкое распространение в природе, свидетельствуют о перспективе применения в различных отраслях пищевой промышленности, животноводства и медицины.

Установлено, что мурамидаза, полученная из слюнных желез КРС, обладает высокой антимикробной активностью в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Благодаря отсутствию посторонних примесей и балластных белков, от которых тяжело избавиться при производстве мурамидазы из куриного белка, лизоцим из слюнных желез КРС не вызывает аллергических реакций.

Использование слюнных желез КРС, позволит увеличить эффективность переработки отходов мясного производства, так как ранее слюнные железы не использовались самостоятельно и направлялись на переработку вместе с головами.

Были подобраны условия экстракции лизоцима из слюнных желез КРС: температура – (20 ± 2)° С, время – 6 ч, экстрагент – 0,15 М хлорид натрия. Для желирования фермента предлагается использовать желатин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Солецкая А.Д. Перспективы применения лизоцима при производстве мясных продуктоВ / А.Д. Солецкая // Хімія харчових продуктів і матеріалів. Нові види сировини. – Харчова наука і технологія **65** 2(23) 2013

2. Ворон П.О. Совершенствование биотехнологии получения фермента мурамидазы из животного сырья / П.О. Ворон, доцент Шуваева Г.П. // Молодой исследователь: вызовы и перспективы: сб. ст. по материалам CXXIII Международной научно-практической конференции «Молодой исследователь: вызовы и перспективы». – № 23(123). – М., Изд. «Интернаука», 2019

УДК 66.047

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛОЧНОГО ЛАКТОЗОСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ГИГИЕНИЧЕСКИХ МОЮЩИХ СРЕДСТВ

М.А. Чикатуева, Е.А. Абрамова, А.Г. Храмцов

Северо-Кавказский федеральный университет, г. Ставрополь, Россия

В настоящее время основными направлениями использования молочного лактозосодержащего сырья являются: без обработки (в натуральном виде); переработка в концентраты; выделение наиболее ценных компонентов; биологическая переработка. Но есть и другие направления использования молочной сыворотки, например, в косметологии при производстве гигиенических моющих средств.

Шампуни для волос относятся к косметологии, а именно к ее разделу гигиенических косметических средств.

Для получения шампуня особо высокого качества нами был разработан следующий состав:

Молочная сыворотка – главный компонент шампуня – специально обработанная на предмет не аллергенности («ноу–хау»). Молочная сыворотка является ценным пищевым сырьем, включающее все компоненты молока. В молочную сыворотку переходит около 50 % сухих веществ молока, в том числе (88–94)% молочного сахара, (20–25)% белковых веществ, (61–62)% молочного жира, (59–65)% минеральных веществ.

Инновационная составляющая наших исследований основана на использовании нижеперечисленных ингредиентов.

Сусло – водный раствор водорастворимых сухих веществ, извлеченного сырья, применяемого для получения пива.

β – галактозидаза Лактаза) – фермент, катализирующий расщепление лактозы на глюкозу и галактозу. Лактаза относится к группе адаптивных ферментов, то есть его синтез не происходит при отсутствии субстрата (лактозы) во внешней среде.

Панкреатин – пищеварительное ферментное средство, представляющее собой экстракт содержимого поджелудочной железы. Входящие в его состав панкреатические ферменты – амилаза, липаза, протеаза – участвуют в переваривании углеводов, жиров и белков.

Пивные дрожжи являются превосходным натуральным белково-витаминным продуктом, который назначают в целях лечения и профилактики многих заболеваний кожи и органов пищеварения, а также для восполнения недостатка полезных веществ.

Мыльная основа для шампуня изготовлена из растительных компонентов. Содержит злаковые протеины ржи, овса, пшеницы, D – пантенол.

Молочные протеины – источник силы и энергии волос. Молочные протеины останавливают повреждение волосяных луковиц, а также восполняют недостаток белков, делают волосы эластичными и упругими.

Витамины – питательные вещества, которые нужны организму для нормального функционирования. Вместе с минералами и другими питательными веществами они участвуют в жизненно важных процессах, которые происходят в нашем организме – дыхание, питание, очищение и регенерация тканей организма.

Репейное масло, полученное методом масляной экстракции. Рекомендуется при выпадении волос, сухости кожи головы и зуде.

С целью обеспечения выпуска высококачественной продукции, безвредной для потребителя была проведена тщательная оценка санитарно-химических и токсикологических свойств шампуня в аккредитованной лаборатории центра гигиены и эпидемиологии г. Ставрополь (таблица 1)

Таблица 1. – Результаты исследований определения токсичных элементов шампуня на основе молочной сыворотки и кожно – раздражающего действия.

Определяемые показатели, единицы измерения	Результаты исследований и допустимая погрешность измерения	Гигиенический норматив ПДК	НД на методы исследований	НД, регламентирующий объем исследований и их оценку
Санитарно – химические исследования				
Свинец, мг/кг	<0,03	5,0	ГОСТ 30178 – 96	ТР ТС 009/2011
Ртуть, мг/кг	<0,01	1,0	МУК 4.1.1472 – 03	
Мышьяк, г/дм^3	<0,001	5,0	ГОСТ Р 51766 – 2001	
pH, ед.	6,8 ± 0,1	3,0 – 9,0	ГОСТ 29188.2 – 91	
Токсикологические исследования				
Кожно-раздражающее действие, баллы (Сразу по окончании экспозиции. Через 24, 48 и 72 часа после окончания экспозиции)	0	0 баллов (отсутствие)	МУ № 05 РЦ / 3140 – 91	ТР ТС 009/2011

Проведен эксперимент по сравнительной оценке аминокислотного состава молочной сыворотки и основы для шампуня в центре биотехнологического инжиниринга при ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет»

Отчет по проведению аминокислотного анализа

Проба	Кодирование в лаборатории
1.молочная сыворотка	050
2.основа для шампуня	051

Гидролиз данных образцов в лаборатории не предусмотрен. При проведении пробоподготовки использовались рекомендованные производителем методики осаждения белковых молекул, с последующим центрифугированием для удаления осажденных белковых преципитатов.

Хроматографический анализ белковых гидролизатов проводился с использованием ионообменного разделения при элюировании шаговым градиентном и фотометрического детектирования с послеколоночной реакцией с нингидрином на аминокислотном анализаторе ARACUS (Abacus, Германия). Детектирование 17 аминокислот проводилось при 570 нм.

В отчете приведены хроматограммы образцов и количественные характеристики отдельных аминокислот в пробе.

Время печати	Thu Apr 13 16:57:12 2017
Длительность анализа	112.27 минут,
серийный номер запуска	000001
Метод	Li based AminoAcid
Программа	гидролизат
Название пробы	сыворотка подсырная (050)
Номер виалы	RA1
Вводимый объем (100 %= 1)	1.0000
Повторы	1 (1)
Пользователь	supervisor (Superv.)
Время начала	2017 03 16 18:39:14
Общее время	1:27:30
Время анализа	1:02:16
Разведение	1
число инжекций	1
вес пробы	1

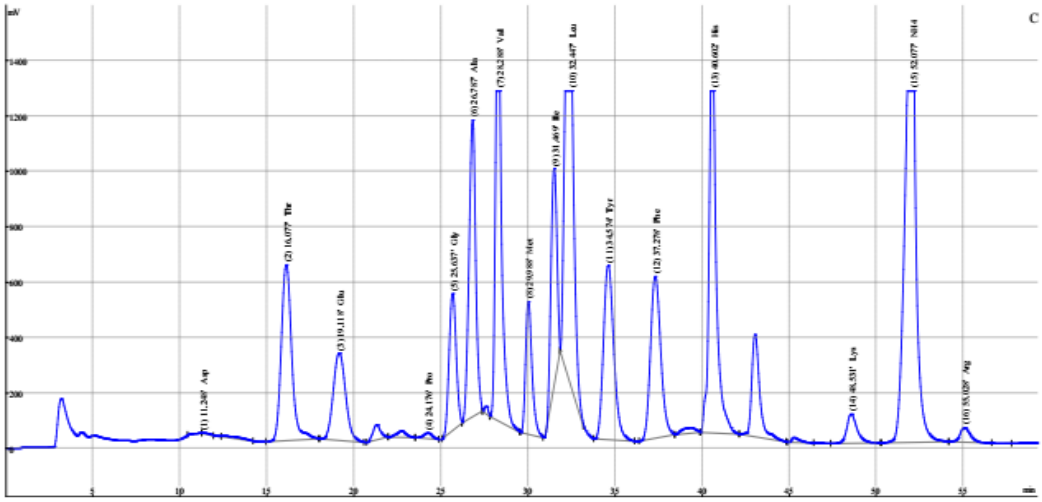


Рисунок 1 – Аминокислотный анализ молочной сыворотки

Таблица 2 – Результаты содержания аминокислот в молочной сыворотке

Номер	Время выхода	Название	нмоль	результат нг/мл
1	11.248	Аспарагиновая кислота (ASP)	1.32	175.639
2	16.077	Треонин (Thr)	718.8	85605.081
3	17.417	Серин (Ser)	0	0.000
4	19.118	Глутаминовая кислота (Glu)	348.5	51268.972
5	24.176	Пролин (Pro)	612.1	70454.444
6	25.637	Глицин (Gly)	283.8	21313.567
7	26.787	Аланин (Ala)	1072	95471.106
8	28.288	Валин (Val)	565.3	66247.325
9	29.988	Метионин (Met)	269.4	40196.113
10	31.469	Изолейцин (Ile)	819	107450.900
11	32.477	Лейцин (Leu)	1292	169555.275
12	34.574	Тирозин (Tyr)	503.9	91308.500
13	37.278	Фенилаланин (Phe)	449	74182.269
14	40.602	Гистидин (His)	675.2	104783.794
15	48.531	Лизин (Lys)	92.63	13542.844
16	52.077	NH4	3623	61586.063
17	55.028	Аргинин (Arg)	44.76	7798.044
Общее количество			1.137e + 004	1.06 1e + 006

Время печати	Thu Apr 13 16:57:12 2017
Длительность анализа	112.27 минут, серийный номер запуска
Метод	Li based AminoAcid
Программа	гидролизат
Название пробы	основа для шампуня (051)
Номер виалы	RB1
Вводимый объем (100 %= 1)	1.0000
Повторы	1 (1)
Пользователь	supervisor (Superv.)
Время начала	2017 03 16 20:06:46
Общее время	1:27:30
Время анализа	1:02:16
Разведение	1,
число инжекций	1,
вес пробы	1

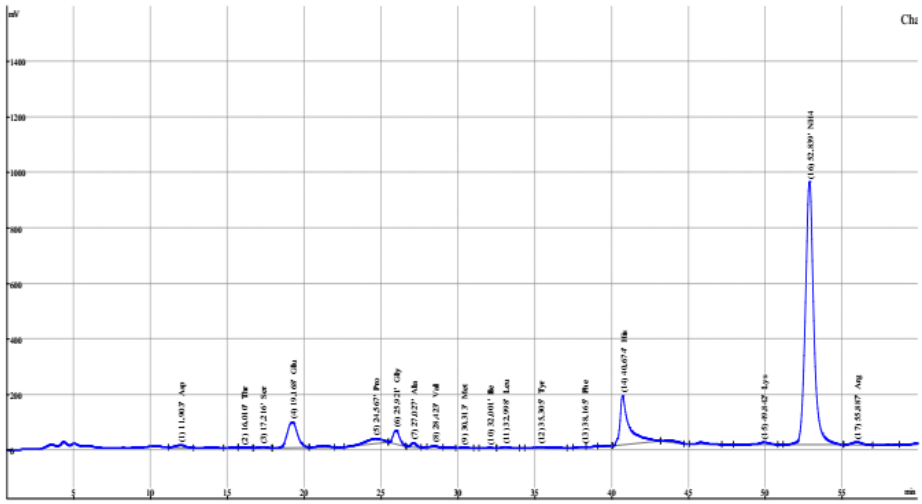


Рисунок 2 – Аминокислотный анализ основы для шампуня

Таблица 3 – Результаты содержания аминокислот в основе для шампуня

Номер	Время выхода	Название	нмоль	результат нг/мл
1	11.903	Аспарагиновая кислота (ASP)	12.36	1645.336
2	16.010	Треонин (Thr)	0.8941	106.488
3	17.216	Серин (Ser)	5.837	613.435
4	19.168	Глутаминовая кислота (Glu)	141.6	20828.975
5	24.567	Пролин (Pro)	1830	210599.075
6	25.921	Глицин (Gly)	42.95	3225.609
7	27.027	Аланин (Ala)	19.21	1711.870
8	28.423	Валин (Val)	3.421	400.911
9	30.313	Метионин (Met)	1.501	223.914
10	32.001	Изолейцин (Ile)	2.371	311.043
11	32.998	Лейцин (Leu)	5.941	779.421
12	35.305	Тирозин (Tyr)	8.092	1466.269
13	38.165	Фенилаланин (Phe)	1.223	202.040
14	40.674	Гистидин (His)	187.3	29064.291
15	49.842	Лизин (Lys)	12.5	1826.772
16	52.839	NH4	2501	42513.969
17	55.887	Аргинин (Arg)	13.93	2427.327
Общее количество			4790	3.179e + 005

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

После проведения исследования сделан вывод – общее количество аминокислот в готовой жидкой основе для шампуня больше чем в молочной сыворотке. Рост произошел за счет аспарагиновой кислоты, серина, пролина.

Экологичность проекта заключается в том, что в качестве основы для шампуня используется молочная сыворотка, которую многие предприятия утилизируют, несмотря на то, что существует множество направлений её использования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зайко С.В. Тезисы докладов IX Всесоюзного съезда дермато-венерологов. – 1991 г. – С. 15 – 17.

2. Маликина А.М. и др. "Получение и использование продуктов микробного синтеза на молочной сыворотке" Сборник информации АГРОНИИТЭИММП, М., 1991 г. – С. 14 – 19.

3. Храмцов А.Г. и др. Рациональная переработка молочной сыворотки // Молочная промышленность. – 1996. – № 4.

4. Свириденко Ю.Я., Смурыгин В.Ю. Гидролиз лактозы: мировой опыт // Молочная промышленность. – 1996 г. – № 7.

5. Рилелиус К. Максилат – ферментная обработка молока решает проблему переработки лактозы // Молочная промышленность. – 1995 г. – № 5.

6. Линд А.Н., Соколова А.Г. Медико-биологические аспекты использования молочной сыворотки в питании. – 1995 г. – № 6.

7. Морозкина Т.С. Витамины: Краткое руководство для врачей и студентов медицинских, фармацевтических и биологических специальностей. – 2002 г. – С. 112.

УДК 328

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭКСРАКТА ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТЕНИЯ SANGUISORBA OFFICINALIS L. НА КУЛЬТУРУ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТРИЙ BIFIDOBACTERIUM LONGUM B379M

И.Д. Поздняков

Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления технологий, Улан-Удэ, Россия

ВВЕДЕНИЕ

С учетом тех задач, которые стоят перед комплексной терапией болезней органов пищеварения, спектр фармакологических действий лекарственных растений должен быть достаточно широким. Каждое растение имеет не одно, а несколько различных биологических свойств.

Естественно, что одни из них являются преобладающими, а другие менее выраженными. Впрочем, такие оценки весьма условны, ибо в составе лекарственных растений даже слабая биологическая активность может во много раз возрасти.

Желудочно-кишечный тракт является одним из наиболее важных органов человеческого тела и уязвим к различным заболеваниям. Доступные лекарства часто имеют низкую эффективность или связаны со многими неблагоприятными последствиями. Поэтому альтернативные препараты необходимы для лечения желудочно-кишечных заболеваний с целью избежание осложнений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура молочнокислых бактерий Bifidobacterium longum штамм B379M.

Клетки штамма Bifidobacterium longum B379M представляют собой грамположительные полиморфные палочки с бифуркацией или утолщением на 1–2-х концах, склонные к образованию скоплений. В жидких питательных средах растут по всей высоте объема, кроме зоны аэробиоза.

Неподвижные, не образующие споры анаэробы. Оптимальная температура выращивания 37,5–38° С, pH питательных сред 6,7–6,8. Каталазу не образуют, желатину не разжижают. Сбраживают глюкозу с образованием уксусной и молочной кислот без образования газа, закисляя среду выращивания до pH.

Экстракт лекарственного растения Sanguisorba officinalis L. ГОСТ 2979–45.

3. Обезжиренное молоко, продукт, получаемый при отделении на сепараторе сливок от цельного молока. Содержит около 3,2 % белков, 4,8 % молочного сахара, 0,05 % жира, 0,7 % минеральных веществ. ГОСТ 31658–2012.

1. Ионометрический метод определения pH основывается на измерении милливольтметром-ионометром ЭДС гальванической цепи, включающей специальный стеклянный электрод, потенциал которого зависит от концентрации ионов H^+ в окружающем растворе [2].

2. Капилярный электрофорез. Метод основан на разделении компонентов сложной смеси в кварцевом капилляре под действием приложенного электрического поля. Микрообъем анализируемого раствора вводят в капилляр, предварительно заполненный подходящим буфером – электролитом. После подачи к концам капилляра высокого напряжения (до 30 кВ), компоненты смеси начинают двигаться по капилляру с разной скоростью, зависящей в первую очередь от заряда и массы (точнее – величины ионного радиуса) и, соответственно, в разное время достигают зоны детектирования [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Был определен химический состав растения Sanguisorba officinalis L.

В таблице 1 представлены результаты исследования химического состава экстракта лекарственного растения Sanguisorba officinalis L.

Таблица 1 – Химический состав Sanguisorba officinalis L.

Компонент	Концентрация, мг/л
Br Бром	0,181
I Йод	0,447
Хлорид-ионы	27,3
Сульфат-ионы	73,3
Нитрат-ионы	12,1
Фторид-ионы	0,307
Фосфат-ионы	2,83
B1 Тиамин	11,4
B2 Рибофлавин	10,3
B6 Пиридоксин	4,82
B3 Ниацин	159
B5 Пантотеновая кислота	28,9
Bc Фолиевая кислота	7,18
K Калий	120
Na Натрий	40,2
Li Литий	0,343
Mg Магний	26,3
Si Кремний	2,61
Ba Барий	11,5
Ca Кальций	34,9
Муравьиная	12,8
Винная	15,7
Яблочная	13,6
Лимонная	244
Уксусная	12,3
Сорбиновая	6,90
Фруктоза	1020
Глюкоза	1070
Сахароза	3760

Из таблицы 6 видно, что в экстракте лекарственного растения Sanguisorba officinalis L. содержатся витамины группы B, такие как, тиамин, рибофлавин, пиридоксин, ниацин, пантотеновая, фолиевая кислоты в концентрации 11,4 10,3, 4,82, 159 28,9 и 7,18 мг/л соответственно; органические кислоты: муравьиная, винная, яблочная, лимонная, уксусная, сорбиновая в концентрации 12,8, 15,7, 13,6, 244, 12,3 и 6,90 мг/л соответственно; углеводы: фруктоза, глюкоза и сахароза в концентрации 1020, 1070 и 3760 мг/л соответственно; минеральные вещества: калий, натрий, литий, магний, кремний, барий кальций в концентрации 120, 40,2, 0,343, 26,3, 2,16, 11,5 и 34,9, мг/л соответственно; а также ионы: брома и йода концентрация которых составляет 0,181 и 0,447 мг/л соответственно, хлорида, сульфата, нитрата, фторида и фосфата – 27,7, 73,3, 12,1, 0,307, 2,83 мг/л соответственно.

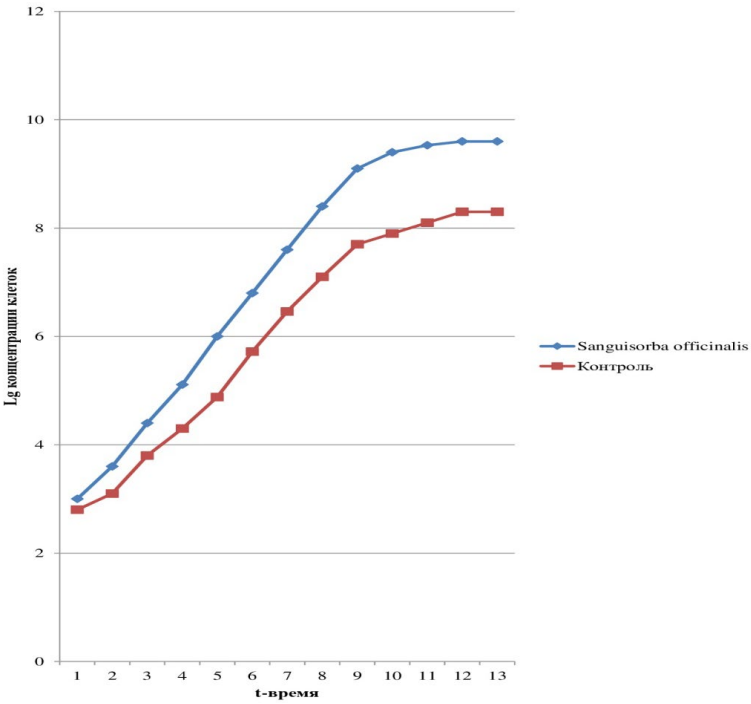


Рисунок 1 – Динамика изменения lg концентрации культуры Bifidobacterium longum B379M от объема внесения экстракта лекарственного растения Sanguisorba officinalis L.

Для исследования влияния экстракта лекарственного растения в концентрации 0,5 мл на культуру молочнокислых бактерий Bifidobacterium longum штамм B379M был поставлен ряд опытов. В ходе экспериментов исследовали следующие показатели: lg концентрации клеток Bifidobacterium longum штамм B379M. Результаты представлены на рисунке 1.

Из рисунка 1 видно, что максимальное значение lg концентрации клеток Bifidobacterium longum B379M составляет 8,3, с добавлением экстракта лекарственного растения Sanguisorba officinalis L. 9,6 к 13 часам культивирования.

Изучена динамика изменения активной кислотности обезжиренного молока при культивировании штамма Bifidobacterium longum штамма B379M в присутствии экстракта лекарственного растения Sanguisorba officinalis L. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Динамика изменения pH при культивировании штамма Bifidobacterium longum B379M в присутствии экстракта лекарственного растения Sanguisorba officinalis L. и ее чистой культуры

Образец	Значения pH									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Чистая культура	7,12	7,00	6,80	6,60	6,40	6,30	5,60	5,40	5,20	5,00
Sanguisorba officinalis L. 0,5 мл	7,22	7,18	7,16	7,00	6,84	6,60	6,30	6,14	5,84	5,60

ВЫВОДЫ

Исследован химический состав экстракта лекарственного растения Sanguisorba officinalis L. Эксперимент показал, что в растительном экстракте Sanguisorba officinalis L. содержится большое количество фруктозы, глюкозы, сахарозы 1020, 1070, 3760 мг/л соответственно.

Исследовано изменение концентрации клеток культуры Bifidobacterium longum B379M при добавлении 0,4 мл экстракта лекарственного растения Sanguisorba officinalis L.: увеличение значения lg концентрации клеток культуры Bifidobacterium longum B379M до 9,6 едениц.

Химический состав изученных экстрактов лекарственных растений содержит необходимые для бифидобактерий питательные вещества и факторы роста, что позволяет судить о возможном стимулировании роста и размножения данных бактерий.

Изучена динамика изменения активной кислотности обезжиренного молока при культивировании штамма Bifidobacterium longum штамма B379M в присутствии экстракта лекарственного растения Sanguisorba officinalis L. и ее чистой культуры с 7,22 до 5,60 и 7,12 до 5 соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Видмер Г.М., Кельнер Р., Мерме Ж. – М., Отто М. Аналитическая химия. Проблемы и подходы. Том 2: учеб. пособие. Москва: МИР. 2004 г., с 646.

2. Ионометрический метод определения pH [электронный ресурс] – Режим доступа: https://studopedia.ru/19_369450_metodi-opredeleniya-znacheniya-pH.html дата обращения 21.07.2019.

Актуальная биотехнология

№3 (30), 2019

УДК 615.1; 664.162

ИННОВАЦИОННЫЕ РЕШЕНИЯ В ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА КРИСТАЛЛИЧЕСКОЙ ГЛЮКОЗЫ

Л.С. Хворова, Л.В. Баранова

Всероссийский научно-исследовательский институт крахмалопродуктов – филиал Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова, РАН, Московская обл., Россия

ВВЕДЕНИЕ

Кристаллическая глюкоза вырабатывается крахмалопаточной отраслью для применения в медицинской и пищевой промышленности, здравоохранении и ветеринарии. В России во ВНИИ крахмалопродуктов проводятся работы по совершенствованию технологий фармакопейной кристаллической глюкозы: гидратной, качество которой характеризуется ФС.2.1.0092.18 «Глюкоза гидратная», и ангидридной ФС ФС.2.1.0091.18 «Глюкоза безводная» [1], а также пищевой глюкозы, отвечающей требованиям ГОСТ 975–88 «Глюкоза кристаллическая».

Главным назначением кристаллической глюкозы является приготовление из неё инфузионных и инъекционных растворов [2]. Кроме того глюкоза кристаллическая используется для получения сорбита, аскорбиновой, гликолевой, глюкуроновых кислот, в качестве наполнителя при таблетировании лекарственных препаратов. Широко применяется глюкоза в ветеринарии, для лечения больных животных [3]. Новые исследования по использованию в питании: сахарозы, глюкозно-фруктозного сиропа, меда, патоки показали практически одинаковый метаболизм в организме. Лучшие условия при обмене веществ показала сахароза, отличающаяся меньшим гликемическим индексом из-за необходимости её расщепления на глюкозу и фруктозу в процессе метаболизма [4], а продукты гидролиза крахмала с глюкозой оказались наименее кариогенными [5] и востребованы в диетическом и спортивном питании [6].

Целью данной работы является анализ современных научных достижений для разработки высокоэффективных технологий получения разных видов кристаллической глюкозы.

Глюкозу получают из крахмала, расщепляя его молекулу до глюкозы с помощью кислоты или ферментов. Гидролизаты очищают активным углем, ионообменными смолами, концентрируют выпариванием воды под вакуумом, затем подвергают кристаллизации [7].

Анализ инновационных решений в технологии кристаллизации глюкозы

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО РЕЖИМА КРИСТАЛЛИЗАЦИИ ГЛЮКОЗЫ ВТОРОГО ПРОДУКТА В АНГИДРИДНОЙ ФОРМЕ

Для повышения выхода глюкозы кристаллизацию сиропов, полученных ферментативным способом гидролиза крахмала, проводят по двухпродуктовой схеме, получая оба продукта в гидратной форме или первый продукт в ангидридной, а второй в гидратной форме [8]. Кристаллизация глюкозы в гидратной форме продолжается от 30 до 80 ч в зависимости от чистоты сиропов, процесс требует большого количества (до 15 %) затравочных кристаллов, а температурный режим кристаллизации (45–25°С) является благоприятным для размножения микроорганизмов, ухудшающих качество глюкозы. Ангидридная глюкоза кристаллизуется при температуре 80–55° С с высокой скоростью – 7 ч в вакуум-аппарате и 16 ч в кристаллизаторе, благодаря чему получаемая глюкоза обладает высокой микробиологической чистотой. В связи с этим, одной из основных инноваций технологии явилась разработка режима кристаллизации и второго продукта (из оттеков от центрифугирования первого продукта) тоже в ангидридной форме [9]. Оттёки имеют глюкозный эквивалент (ГЭ) около 97 %, что позволило проводить кристаллизацию второго продукта в ангидридной форме. Процесс кристаллизации осуществляли при уваривании утфеля в вакуум-аппарате.

Режим кристаллизации представлен на рис. 1.

Из рисунка следует, что процесс кристаллизации продолжался 10 ч, при этом содержание кристаллов в утфеле достигло максимально допустимого значения – 52,5 %. Период нуклеации-«заводки» кристаллов проводился также, как и для первого продукта в течение 5–10 мин с затравкой 15–20 г. на тонну сиропа с СВ 84 %. Наращивание кристаллической массы проводилось при уваривании утфеля с подкачками сиропа до достижения СВ утфеля 91–92 % в течение 10 ч, после чего утфель подвергали центрифугированию, сушке, упаковке.

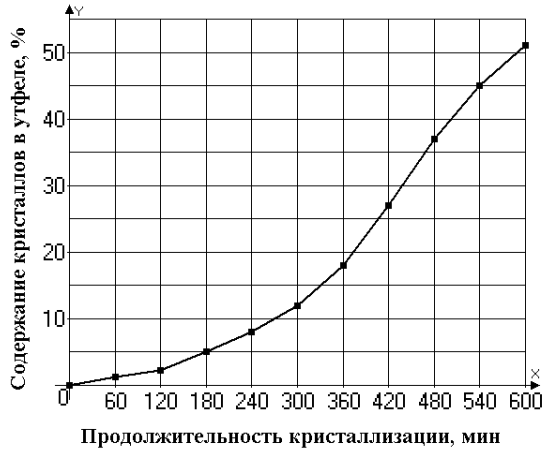


Рис. 1 – Кинетика наращивания кристаллов ангидридной глюкозы из сиропов 2-го продукта

Таким образом, разработанный инновационный режим кристаллизации второго продукта в ангидридной форме продолжается 10 ч, что в 5 раз короче в сравнении с кристаллизацией глюкозы в гидратной форме. Получаемая глюкоза имела высокое качество и предназначена для использования в пищевой промышленности [10].

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО РЕЖИМА КРИСТАЛЛИЗАЦИИ АНГИДРИДНОЙ ГЛЮКОЗЫ В КРИСТАЛЛИЗАТОРЕ

Процесс кристаллизации ангидридной глюкозы можно проводить и в кристаллизаторе при снижении температуры. При этом сироп для кристаллизации концентрируют выпариванием в вакуум-аппарате, а затем сливают в кристаллизатор, где проводят «заводку» кристаллов и их наращивание при снижении температуры от 80 до 55°С. Однако «Заводка» кристаллов при этом довольно длительная, продолжается до 4 ч, из-за чего получаются утфели с неравномерными кристаллами [11].

Суть инновации состоит в проведении «заводки» кристаллов не в кристаллизаторе, а в выпарном вакуум-аппарате, одновременно с концентрированием сиропа [12]. Для этого в концентрированный сироп, перед сливом его в кристаллизатор, добавляют затравку 15–20 г. кристаллов на тонну сиропа. Через 5–10 мин после образования необходимого количества кристаллов сироп с зародышами можно сливать в кристаллизатор или продолжить подваривать в вакуум-аппарате не более 3 ч, во избежание снижения подвижности продукта и закристаллизовывания в трубках поверхности теплообмена малого диаметра, не предназначенных для уваривания утфелей. Режим кристаллизации представлен на рис. 2.

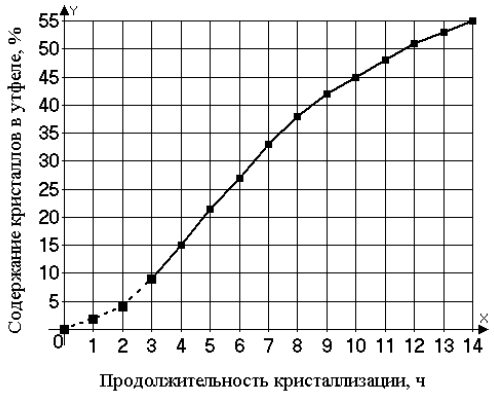


Рис. 2. Кинетика кристаллизации глюкозы с «заводкой» кристаллов в вакуум-аппарате (– – –) и наращиванием их в кристаллизаторе (–)

Предложенный способ кристаллизации позволил сократить общее время кристаллизации на 2–3 ч и улучшить качество утфелей по однородности кристаллов.

Значительным прогрессом в технологии кристаллизации глюкозы является применение кристаллизаторов вертикального типа [13], которые обеспечивают благоприятные условия и для «заводки» кристаллов и для их роста. Процесс кристаллизации можно проводить периодическим и непрерывным способами. Значительно возрастает производительность кристаллизаторов, снижается потребность в производственныой площади.

ПРИМЕНЕНИЕ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ДЛЯ АКТИВАЦИИ НУКЛЕАЦИИ

Существенным достижением в вопросе активации нуклеации является применение поверхностно-активных веществ в виде алифатических спиртов [14]. Проведены испытания различных видов затравок с целью выбора наиболее эффективных. В качестве затравочных испытаны крупные (> 200 мкм) и мелкие (<60 мкм) кристаллы товарной гидратной и ангидридной глюкозы и такие же кристаллы, смоченные в спирте. Дозировка затравки в опытах составляла 0,15 % по массе сиропа, избыточная концентрация соответствовала метастабильной зоне пересыщений. Процесс нуклеации контролировали по изменению прозрачности растворов с течением времени.

Полученные данные представлены на рис. 3.

Исследования показали, что для ангидридной глюкозы самыми эффективными в качестве затравок являются кристаллы гидратной глюкозы (крупнее 200 мкм) и мелкие (< 60 мкм), смоченные пропанолом или другим алифатическим спиртом (Патент RU2 662 192 13.03.2017), что подтверждается самой низкой прозрачностью растворов, а следовательно наиболее активной нуклеацией для указанных кристаллических затравок.

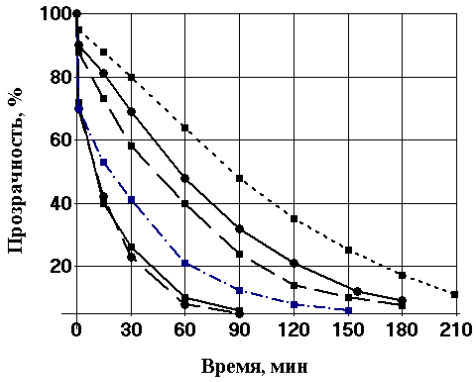


Рисунок 3 – Прозрачность растворов в зависимости от вида затравочных кристаллов при температуре 600 С и избыточной концентрации ΔС = 60 г./100 г. воды (сверху вниз): – – затравка из крупных (> 200 мкм) товарных кристаллов гидратной глюкозы; — затравка из мелких (<60 мкм) товарных кристаллов ангидридной глюкозы; — – затравка из мелких (<60 мкм) кристаллов ангидридной глюкозы с пропанолом; — · – затравка из мелких (<60 мкм) товарных кристаллов гидратной глюкозы; —— –затравка из крупных (> 200 мкм) кристаллов гидратной глюкозы с пропанолом; — – затравка из мелких (<60 мкм) кристаллов гидратной глюкозы с пропанолом.

При размешивании с сиропом крупных гидратных кристаллов, смоченных пропанолом, происходит их расщепление на мелкие частицы 1–2 мкм, которые становились центрами кристаллизации и начинали быстро расти в виде ангидридной глюкозы. Масса требуемой затравки сокращается в сотни раз.

РАЗРАБОТКА КРИСТАЛЛИЧЕСКОГО ГЛЮКОЗНОГО ПРОДУКТА С ХЛОРИДОМ НАТРИЯ

Жизненно важным лекарственным препаратом является «Раствор глюкозы 2,5 % + натрия хлорид 0,8 %» и «Раствор глюкозы 5 % + натрия хлорид 0,9 %», при импортировании которых из-за рубежа большие затраты приходятся на транспортирование воды растворов. Нами разработана кристаллическая форма двойного соединения глюкозы с хлоридом натрия (ДС), соответствующая химическому составу растворов [15]. Процесс кристаллизации ДС проходит из растворов глюкозы с хлорида натрия в течение 8 ч при снижении температуры от 65 до 29° С. Кроме медицины продукт востребован в пищевой промышленности для посола мяса и рыбы, в качестве напитка для рабочих горячих цехов и спортсменов (Патент RU 2546286 10.04.2015).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Иинновационные решения в технологии производства глюкозы ферментативным способом заключаются в:

– разработке способа кристаллизации второго продукта в ангидридной форме в изотермических условиях уваривания утфеля в вакуум-аппарате;

– «заводке» кристаллов в выпарном вакуум-аппарате с последующим наращиванием кристаллической массы при снижении температуры в кристаллизаторе;

– применении вертикального кристаллизатора для кристаллизации глюкозы;

– активации «заводки» кристаллов ангидридной глюкозы с применением в качестве поверхностно-активных веществ алифатических спиртов, позволяющих значительно снизить потребность в затравочных кристаллах при использовании гидратных кристаллв (крупнее 200 мкм), смоченных, например, пропанолом;

– разработке технологии получения глюкозного продукта с хлоридом натрия в кристаллическом виде для использования в качестве фармацевтической субстанции лекарственных растворов глюкозы с хлоридом натрия, в качестве посолочного средства для посола мясных и рыбных изделий, а также получения специализированных напитков для работников горячих цехов и спортсменов.

ЛИТЕРАТУРА

Государственная фармакопея РФ. XIV изд. 2018. Т.3.

Губин М.М. Производство инфузионных растворов в России: особенности и перспективы. Ремедиум. 2009. № 3. С. 55–59.

Пламб Дональд К. Фармакологические препараты в ветеринарной медицине. М: Аквариум-Принт, 2016. 1060 с.

Edwards W.P., Caramels, fondants and jellies as centres and fillings. Science and Technology of Enrobed and Filled Chocolate, Confectionery and Bakery Products, 2009.

T.H. Grenby and M. Mistery. Properties of maltodextrins and glucose syrups in experiments in vitro and in the diets of laboratory animals, relating to dental health. British Journal of Nutrition. 2000. V.84. Iss.4. pp 565–574. DOI: https://doi.org/10.1017/S0007114500001884

Андреев Н.Р., Хворова Л.С., Фонин В.С. Новый продукт для спортсменов – глюкозо-витаминная помадка. Пищевая промышленность. 2011. № 5. С. 40–41.

Gnielinski V., Mersman A., Thurner F. Verdampfung, Kristallisation, Trocknung. Springer-Verlag, 2013. 262 p.

Андреев Н.Р., Хворова Л.С. Ангидридная глюкоза: технология производства и применение. Фармация. 2012. № 3. С. 43–45.

Хворова Л.С. Трехпродуктовая технологическая схема получения глюкозы с кристаллизацией двух продуктов в ангидридной форме. Пищевая промышленность. 2017. № 9. С. 44–46.

Лукин Н.Д., Ананских В.В., Лапидус Т.В., Хворова Л.С. Технологический контроль производства сахаристых крахмалопродуктов. Методическое пособие. М.: Россельхозакадемия, 2007. 261 с.

Фиданко Сталиянов Сретенов. Метод получения кристаллической агидридной глюкозы. АС Болгария № 15427. 03.06.73.

Способ получения кристаллической ангидридной глюкозы. Хворова Л.С., Селезнева О.Н., Лукин Н.Д. Патент на изобретение RUS 2521510 29.12.2012.

Способ непрерывного получения моногидрата декстрозы. Ж. Бодель, П. Дюфло, Б. Валентэн и М. Юретт. Патент SU 1452485. 15.01.89.

ХворроваЛ.С., Андреев Н.Р., Лукин Д.Н. Влияние поверхностно-активных веществ на кинетику кристаллизации глюкозы. Техника и технология пищевых производств. 2017. Т. 44. № 1. С. 81–86.

Андреев Н.Р., Хворова Л.С. Новый пищевой продукт, лекарственное средство, ветеринарный препарат. Вестник российской сельскохозяйственной науки. 2013. № 6. С. 73.

УДК 633.16:575.224.234

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГАЛАКТОМАННАНОВ РАСТЕНИЙ *CROTALARIA ALATA* И *GLEDITSIA TRIACANTHOS* В КАЧЕСТВЕ ЗАКРЕПИТЕЛЕЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

Р.П. Закирова

Институт химии растительных веществ им. акад. С.Ю. Юнусова АН РУз, Ташкент, Республика Узбекистан

В биотехнологических процессах для культивирования микроорганизмов общепринято использование агар-агара в качестве уплотняющей основы питательных сред. Он служит инертным носителем и обеспечивает осмотический потенциал среды. В настоящее время агар-агар и агароподобные вещества получают, как правило, из красных морских водорослей [1]. Известно, что галактоманнаны, растворяясь в воде образуют вязкие коллоидные растворы. Это свойство позволяет использовать их в качестве загустителей, эмульгаторов, стабилизаторов дисперсных систем, а в бинарных смесях – как геле- и структурообразователи [2]. В семенах растений вещества выполняют резервную, водоудерживающую, защитную и энергетическую функции.

Целью работы было изучение возможности использования в качестве закрепителя питательной среды галактоманнанов из семян *Crotalaria alata* и *Gleditsia triacanthos* для культивирования микроскопических грибов и клеточной растительной культуры.

Полисахариды были выделены из семян растений, произрастающих на территории Ташкентской области Республики Узбекистан. Галактоманнан *C. alata* – растворим в воде с образованием вязких растворов с относительной вязкостью – 49,86 при концентрации 0,75 %. Моносахаридный состав галактоманнана представлен галактозой и маннозой в соотношении 1:3 [3]. Галактоманнан *G. triacanthos*, растворяясь в воде, образует вязкий раствор и имеет относительную вязкость 101.5 при концентрации 0.5 %. Моносахаридный состав галактоманнана состоит из галактозы и маннозы в соотношении 1:4 [4].

Для исследования возможности замены агар-агара полисахаридами изучен 2-х компонентный состав, где в качестве закрепителя были испытаны композиции состоящие из агар агара и одного из исследуемых галактоманнанов: *Crotalaria alata* (ГМ1) или *Gleditsia triacanthos* (ГМ2) (Табл. 1).

При внесение агар-агара 50 % от нормы – 10 г./л с добавлением ГМ-1 20 г./л среда по твердости соответствовала контрольному варианту. При уменьшении содержания агар-агара до 6 г/л с той же концентрацией галактоманнана наблюдалось снижение жесткости среды. При увеличение содержания галактоманнана ГМ-1 до 30 г./л и внесения агар-агара в количестве 2 г/л, а также при этой же концентрации ГМ-1 с полным исключением агар-агара питательная среда представляла собой густой клейстер, с трудом разливалась после автоклавирования и не равномерно распределялась по поверхности чашек Петри. Использование в качестве закрепителя среды галактоманнана ГМ-2 в концентрациях 30 г./л и 20 г./л с добавлением агар-агара 10 г./л среда была мягкой по консистенции, а при снижении содержания агар-агара до 6 г/л среда оставалась в вязкотекучем состоянии.

Различие в гелеобразующей способности позволили предположить возможность частичной замены агар-агара сочетанием полисахаридов ГМ-1 и ГМ-2 для получения питательной среды с необходимыми параметрами. Для исследования этой возможности была изучена 3-х компонентная система с различным их соотношением. При соотношении ГМ-1 и ГМ-2 1:1 в концентрации каждого 10 г./л с добавлением агар-агара 6 г/л, среда имела мягкую консистенцию, не позволяющую проводить посев на ее поверхности. Внесение в среду на один литр среды агар-агара 6 г/л, полисахаридов – 16 г. ГМ-1 и 4 г ГМ-2 (соотношение компонентов 1,5:4:1) приводило к резким изменениям по качественным показателям студня. Готовая стерильная среда хорошо разливалась по чашкам и после застывания образовала эластичные гладкие студни, которые по консистенции и по цвету соответствовала 2 % агаризованной среде.

Таблица 1. Влияние состава закрепляющей основы на качественные характеристики питательной среды

Состав загустителей, (г/л)			Характеристика среды
агар-агар	Галактоманнан Crotalaria alata (ГМ-1)	Галактоманнан Gleditsia triacantos (ГМ-2)	
20	–	–	Твердая однородная
10	20	–	Твердая однородная
6	20	–	Мягкая однородная
2	30	–	Твердая со сгустками
–	30	–	Твердая со сгустками
10	–	30	Мягкая
10	–	20	Мягкая
6	–	20	Вязкотекучая
6	10	10	Мягкая
6	16	4	Твердая однородная

С целью установления качественной характеристики состава среды в качестве тест объектов были использованы микроскопические грибы *Stachybotrys alternans* (род Stachybotrys Corda) и *Fusarium oxisporum Schr f. vasinfectum Bilai* (род *Fusarium*). Методом точечного посева на поверхность среды по прописи Чапика внесли споры *S. alternans*, на основе картофельного отвара – *Fusarium oxisporum* и на 5 и 7 сутки проводили замер диаметра колоний [5].

В результате проведенных работ было установлено, что частичная замена агар-агара полисахаридами обеспечивает активный рост микроскопических грибов. Диаметр колоний гриба *S. alternans* на среде с использованием галактоманнанов опережал контрольный вариант (агар-агар в 2 % концентрации) на 5 сутки на 37,2 %, на 7 – на 8,7 %, колоний гриба *F.oxisporum* соответственно, на 31,5 и 11,1 %.

Таким образом, показана возможность замены агар-агара галактоманнанами семян *Crotalaria alata* и *Gleditsia triacanthos* для культивирования микроскопических грибов.

ЛИТЕРАТУРА

Кизеветтер И.В., Грюнер В.С., Евтушенко В.А. Переработка морских водорослей и других промысловых водных растений. М.: Пищевая промышленность, 1967, с. 416.

Щербухин В.Д., Анулов О.В. Галактоманнаны семян бобовых (обзор). Прикладная биохимия и микробиология. 1999, т. 35, № 3, с. 257–274.

Кадиралиева Ф., Рахманбердыева Р.К. Полисахариды *Crotalaria alata*. Химия природных соединений. 2011, № 1, С. 10.

Рахманбердыева Р.К., Талипова М., Газизов Ф., Рахимов Д.А. Углеводы и липиды семян *Gleditsia triacanthos*. Химия природных соединений. 2002, № 1, с. 19–21.

Н.А. Красильников. Методы изучения почвенных микроорганизмов и их метаболитов. 1966. МГУ. С 216.

УДК 661.73

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ АЦИЛИРОВАНИЯ САХАРОЗЫ ТЕРЕФТАЛЕВОЙ КИСЛОТОЙ

А.В. Протопопов, Е.Ю. Шумилова, Е.А. Нещадимова

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

Эфиры сахарозы и высших жирных кислот относятся к классу неионогенных поверхностно-активных веществ (ПАВ), в которых гидрофильной частью является фрагмент молекулы сахарозы, а гидрофобной – радикал жирной кислоты. При растворении жиросахаров происходит накопление их молекул на поверхности жидкости, что приводит к снижению поверхностного натяжения.

Сложные эфиры сахарозы и высших жирных кислот принадлежат к тем немногим неионным ПАВ, которые обладают рядом ценных свойств. Они не имеют вкуса и запаха, не ядовиты, не оказывают раздражающего действия на кожный покров и слизистые человека, проявляют поверхностную активность в широком интервале pH. Кроме того, в зависимости от состава жиросахара при обычных условиях они могут иметь как твердую консистенцию, так и воскообразную и жидкую. Перечисленные особенности в сочетании с поверхностно-активными свойствами жиросахаров обуславливают их применение в фармации, косметике, пищевой промышленности и других областях народного хозяйства в качестве солюбилизаторов, эмульгаторов и стабилизирующих веществ.

В чистом виде жиросахара представляют собой бесцветные кристаллические вещества, не имеющие запаха и вкуса. Устойчивы до температуры 100 0 С, при 120 0 С начинают плавиться. В организме распадаются на жирные кислоты, глюкозу и фруктозу. Не оказывают сенсибилизирующего или аллергического действия на кожу, не удаляют полную липоидную кожную пленку, сохраняют постоянное значение pH кожи и нормальный водный баланс.

Введение в структуру сахаров принципиальных биологически-активных фрагментов позволит создать новые фармацевтические препараты.

Нами были проведены опыты по синтезу жиросахаров с терефталевой кислотой в присутствии тионилхлорида. За основу были взяты ранее разработанные методики ацилирования растительного сырья в присутствии тионилхлорида. Синтез проводили в мольном соотношении терефталевая кислота: сахароза как 2:1. Полученные продукты исследовались на содержание связанной кислоты методом потенциометрии и рассчитывали степень замещения в полученных жиросахарах.

Таблица 1 – Степень замещения в сложных эфирах сахарозы

Время синтеза, час	Температура, °С	
	50°	60°
2	0,20	0,35
3	1,80	2,20

При увеличении продолжительности синтеза с двух до трех часов наблюдается возрастание степени замещения до дизамещенных эфиров.

Также, проведена серия синтезов при мольном соотношении терефталевая кислота: сахароза как 1,5:1. Рассчитанная степень замещения в полученных продуктах представлена в таблице 2.

Таблица 2 – Степень замещения в сложных эфирах сахарозы

Время синтеза, час	Температура, °С			
	30°	40°	50°	60°
3	0,50	0,80	1,0	1,2

При данном мольном соотношении в тех же условиях были получены монозамещенные сложные эфиры сахарозы.

Исследование методом ИК-спектроскопии показало образование сложноэфирной связи (рисунок 1). На полученном ИК-спектре появляются полосы поглощения в области 2500–2600 $см^{-1}$, ответственные за колебания карбоксильной группы в кислотах, а также интенсивная полоса поглощения в области 1730 $см^{-1}$, ответственная за колебания сложноэфирной связи.

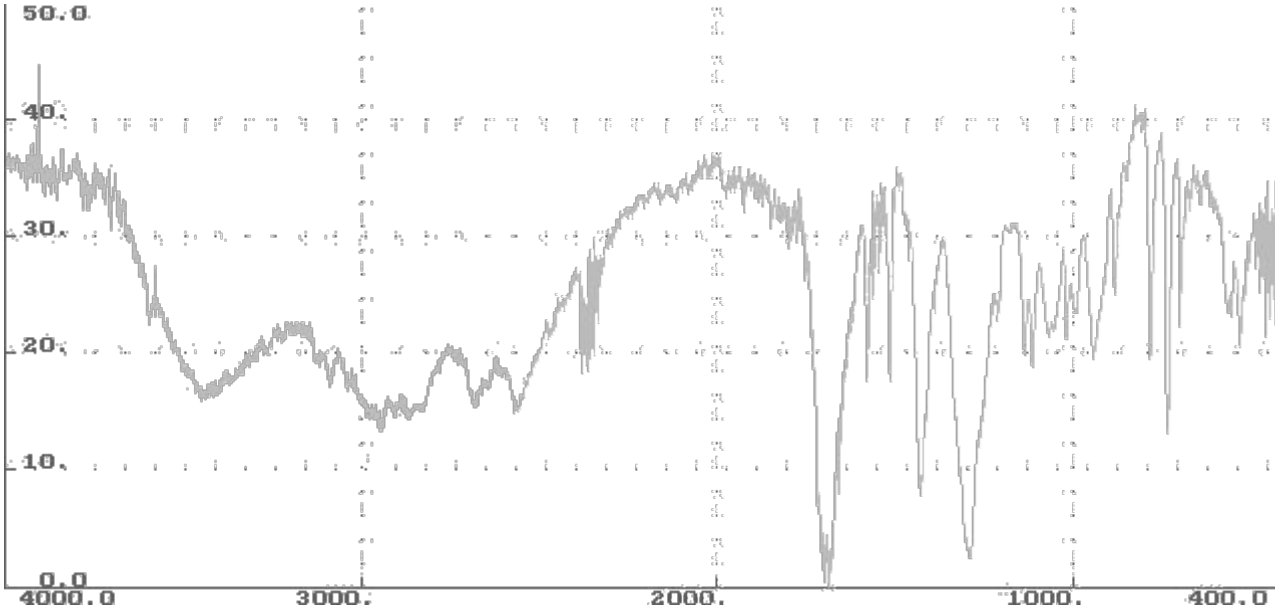


Рисунок 1 – ИК-спектр полученных жиросахаров

ЛИТЕРАТУРА

1. Жогло, Ф.А. Жиросахара [Текст] : (Получение, свойства, применение) / Ф.А. Жогло. – Москва: Медицина, 1975. – 112 с.

2. Протопопов А.В. Сложные эфиры целлюлозы с ароматическими оксикислотами из плодовой оболочки овса / Протопопов А.В., Ворошилова А.В., Клевцова М.В., Бобровская С.А. // Ползуновский вестник. – Барнаул: Изд-во Алт ГТУ, 2016. № 2. С. 171–176.

УДК 328

ИЗУЧЕНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ФЕРМЕНТАЦИИ СКОРЛУПЫ КЕДРОВЫХ ОРЕХОВ В ТВОРОЖНОЙ СЫВОРОТКЕ ПРОПИОНОВОКИСЛЫМИ БАКТЕРИЯМИ

Ф.П. Балдынова, А.В. Бызгаева, С.В. Олоев

Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления, Улан-Удэ, Россия

Целью данной работы являлось исследование микробиологических и физико-химических свойств ферментации творожной сыворотки чистой закваской *Propionibacterium Shermani* при внесении скорлупы кедровых орехов.

Основную часть скорлупы кедровых орехов составляют углеводы, главным образом клетчатка [1]. Наличие минеральных веществ и большое содержание углеводов характеризует скорлупу кедровых орехов как источник углеводно-минерального комплекса и различных органических веществ.

Для определения влияния экстрагируемых веществ скорлупы кедрового ореха на динамику роста пропионовокислых бактерий в творожной сыворотке проводили подсчет количества клеток через определенные промежутки времени в процессе ферментации. Скорлупу кедровых орехов вносили в количестве 20 % от объема творожной сыворотки. В качестве контроля использовали творожную сыворотку с чистой культурой пропионовокислых бактерий *Propionibacterium shermanii* без добавления скорлупы кедровых орехов.

Культивирование проводили в течение 120 часов при температуре 30° С. При этом культура сначала размножается в условиях избытка питательных веществ, которые за время выращивания постепенно снижаются. Результаты исследования представлены на рисунке 1.

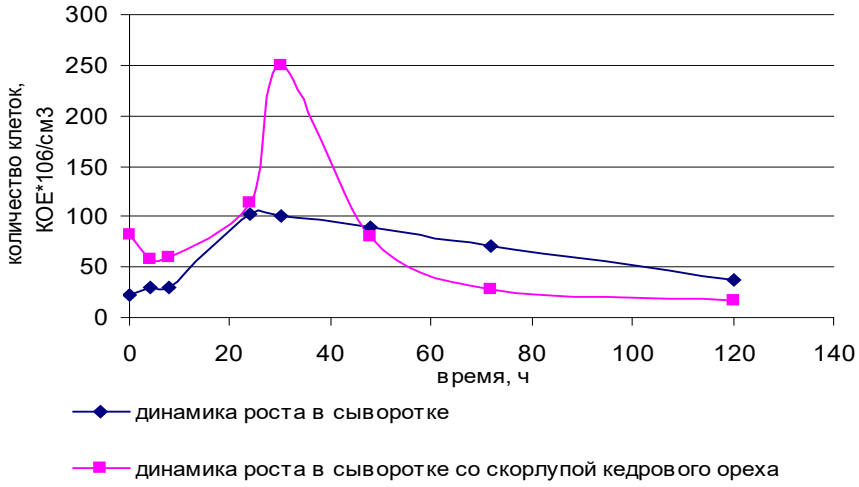


Рис. 1. Динамика роста Propionibacterium shermanii в творожной сыворотке

Анализ динамики роста *Propionibacterium shermanii* показал, что максимальный прирост биомассы наблюдается после 30 часов культивирования. При этом наиболее хороший рост бактерий наблюдается в среде с добавление скорлупы кедровых орехов.

Исследование физико-химических показателей показало, что активная кислотность в процессе роста культуры в опытной и контрольной пробах понижается, так как в процессе ферментации накапливается пропионовая кислота, как продукт метаболизма пропионовокислых бактерий. Активная кислотность в опытной пробе ниже, чем в контрольной пробе. Это можно объяснить высоким уровнем биомассы в опытной пробе, КОЕ составляет 250×10^6 , тогда как в контрольной пробе – $100 \cdot 10^6$.

Данные по изменению физико-химических показателей в творожной сыворотке с добавлением скорлупы кедровых орехов представлены на рисунке 2.

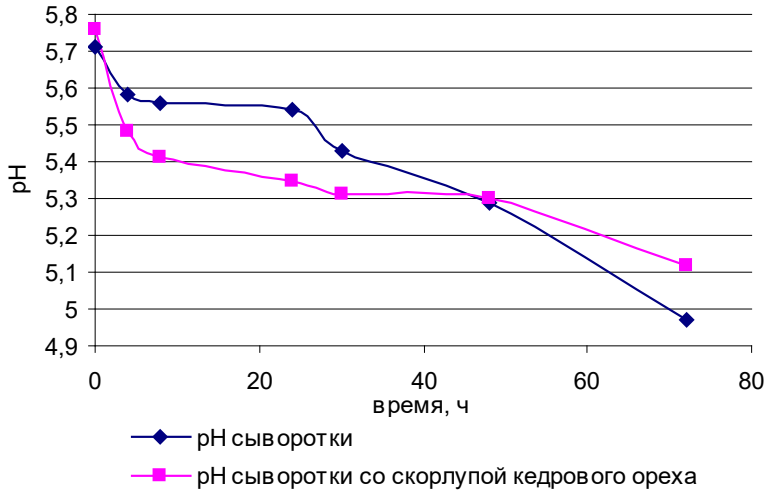


Рис. 2. Изменение активной кислотности творожной сыворотки при ферментации пропионовокислыми бактериями

Таким образом, результаты исследования позволяют сделать заключение, что присутствие скорлупы кедровых орехов в количестве 20 % от объема творожной сыворотки благотворно влияет на рост пропионовокислых бактерий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ефремов А.А., Павлова Е.С., Оффан К.Б., Кротова И.В. Получение целлюлозосодержащих продуктов из скорлупы кедровых орехов в условиях органосольвентного способа в среде уксусной кислоты // Химия растительного сырья. 1998. № 3. С. 87–91.

УДК 637.1/.3

СОЗДАНИЕ МОЮЩЕГО СРЕДСТВА ДЛЯ УДАЛЕНИЯ ОТЛОЖЕНИЙ РАСТИТЕЛЬНО-ЖИРОВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ СПРЕДОВ

Е.И. Орлова, Б.В. Маневич, Ж.И. Кузина, Т.В. Косьяненко

ОАО «Мытищинский молочный завод, Московская обл., Россия
Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности, Москва, Россия.

Рост объемов производства продуктов переработки молока на эмульсионной жировой основе с комбинированным составом в виде различных топленых смесей и спрэдов обуславливает повышенное внимание к их качеству и безопасности. Производство этих продуктов регламентировано требованиями национального стандарта ГОСТ 34178–2017 «Спреды и смеси топленые. Общие технические условия» и ТР ТС 024/2011 «Технический регламент на масложировую продукцию». Для производства молокосодержащих функциональных продуктов сложного сырьевого состава используются жиры на основе оптимально подобранной смеси растительных масел и их модификаций, произведенных методом переэтерефикации.

По окончании технологического процесса и ополаскивания водой от остатков продукта на внутренних поверхностях оборудования остаются отложения с высокой адгезионной способностью. В связи с этим следующий этап мойки оборудования требует использования эффективных моющих средств со специально подобранным составом химических компонентов, при помощи которых достигаются необходимые гигиенические нормативы. При этом остаточные количества моющих средств не должны оказывать негативного воздействия на качество и безопасность выпускаемой продукции [1].

Кроме щелочных агентов, гидролизующих белковую фракцию отложения и частично жировую, необходимы поверхностно-активные вещества, способствующие смачиванию и глубокому проникновению в высокомолекулярную основу используемых растительных жиров. Поэтому начальным этапом создания моющего средства является выбор ПАВ по результатам определения их поверхностного натяжения, которое в определенной степени характеризует их эмульгирующие и смачивающие свойства [2, 3].

Для удобства интерпретации результаты исследований выявленных рациональных ПАВ представлены на рисунке 1.

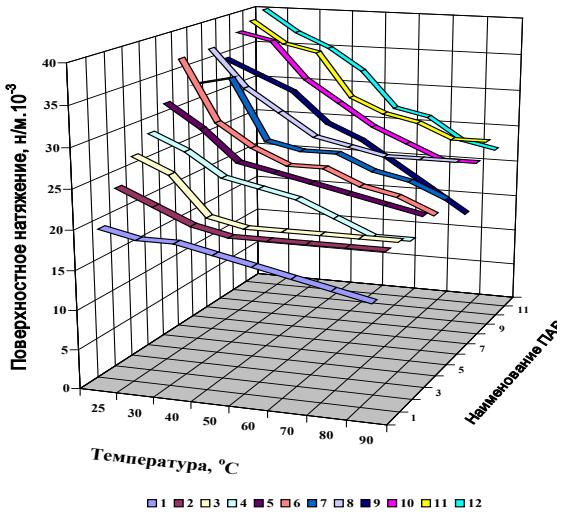


Рис. 1. Зависимость поверхностного натяжения различных видов ПАВ от температуры при концентрации растворов 0,03 % по основному веществу. **1** – этоксилат Гэрбе (6ЕО); **2** – алкоксилат Гэрбе (7ЕО); **3** – лаурилдиметиламина оксид; **4** – алкоксилат Гэрбе (4ЕО); **5** – смесь АПАВ и аминоксида; **6** – алкилбензиламмоний хлорид; **7** – натриевая соль вторичного алкансульфоната; **8** – 2-этилгексил сульфат натрия; **9** – C_8-C_{14} октилполиглюкозид; **10** – C_8-C_{14} алкилполиглюкозид; **11** – диалкилдиметиламмоний хлорид; 12 – C_8-C_{10}-октилглюкозид

В экспериментах по подбору ПАВ–эмульгаторов были использованы такие жировые субстанции, как ЗМЖ Oiblend 1003–36, ЗМЖ Oiblend 1503–33, ЗМЖ Эколакт 1403–33, ЗМЖ Эколакт 1403–35 и ряд других. Судя по полученным результатам рациональными видами ПАВ следует признать композицию «ВНИМИ», 2-этилгексил сульфат натрия и C_8-C_{10}-октилглюкозид. Количественное содержание этих ПАВ в моющей композиции соответствует виду ЗМЖ, на эмульгирование которого установлен наивысший расход. Учитывая, что анионные ПАВ не стабильные в высокощелочной среде и обладают устойчивым пенообразованием, в составе моющей композиции должен присутствовать со-ПАВ [4], обеспечивающий и стабильность композиции, и отсутствие пены в её рабочих растворах при рециркуляционном способе мойки. Для пенных моющих композиций в её рецептуру достаточно введения к анионному ПАВ алкилполиглюкозида. Рациональные концентрации моющих композиций, обеспечивающих полноту удаления загрязнений, устанавливаются в процессе апробации в производственных условиях. Такие виды оборудования, как резервуары, теплообменники, жироплавители, мойка которых осуществляется

рециркуляционным способом, композиционный состав моющего средства должен быть непенным. В результате предварительной апробации в производственных условиях установлено, что в составе моющей композиции необходимо присутствие гидроксида натрия от 32 до 42 %, анионного ПАВ, обладающего высокой эмульгирующей способностью. Однако при введении анионных ПАВ в высокощелочную среду происходит расслоение фаз и продукт становится некондиционным. Поэтому требуется введение в состав моющей композиции ПАВ с выраженным солюбилизирующим действием. В процессе производства жировой продукции с использованием ЗМЖ на поверхности оборудования образуются жировые отложения, обладающие мажущей консистентностью и сильной адсорбционной способностью. За счет высокой молекулярности удаление их с поверхности оборудования является очень трудоемким процессом, требующим применения ПАВ с определенной степенью эмульгирования [5].

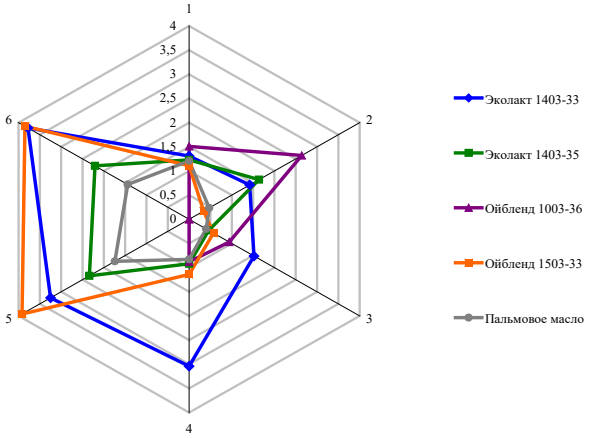


Рис. 2. Степень эмульгирования ЗМЖ рядом ПАВ в виде соотношения г ПАВ/г ЗМЖ, где1. Композиция «ВНИМИ»; 2. 2-этилгексил сульфат натрия; 3. C_8-C_{10} – октилглюкозид; 4. Лаурилдиметиламина оксид; 5. Этоксилат Гербэ (6ЕО); 6. Алкоксилат Гербэ (7ЕО).

На ООО «Мытищинский молочный завод» была проведена производственная апробация высокощелочной моющей композиции непенного характера с целью определения эффективности её моющей (обезжиривающей) способности по отношению к жировым фракциям, образующимся на внутренних поверхностях линии производства спреда на основе заменителей молочного жира (ЗМЖ) фирмы «ЭФКО». Трудоемкой частью мойки этой линии является «труба покоя» длиной около 2 м. и диаметром 20–22 см, которая установлена после маслоизготовителя. В процессе мойки линии происходит снижение скорости потока моющих жидкостей, при этом не обеспечивается полнота заполнения «трубы покоя» моющими растворами, что усложняет доступ моющего раствора к жировым отложениям. В связи с этим по окончании мойки необходимо вскрывать «трубу покоя», промывать ее вручную и вновь проводить цикл мойки. Процесс мойки удлиняется, моющие средства и энергозатраты возрастают.

Для осуществления процесса мойки линии маслоизготовителя была приготовлена 1 тонна рабочего раствора новой щелочной моющей композиции непенного характера с использованием в качестве ПАВ – частично нейтрализованной олеиновой кислоты отечественного производства. Концентрация щелочи в рабочем растворе составляла 1,5 %, количество активных веществ в виде комплексоната и ПАВ – 0,07 %. Температура раствора поддерживалась на протяжении всего времени мойки (30 мин) в пределах 78–80 °С. По окончании процесса мойки раствор был сброшен в канализационные стоки. Сбрасываемый раствор представлял собой полупрозрачную жидкость с невысоким пенообразованием, не мешающим сливу в сток. Ополаскивание оборудования водой от остатков щелочного раствора до нейтральной реакции составило 15 минут. При визуальном осмотре специалистами завода было отмечено полное отсутствие жирового отложения.

Таким образом, рекомендуемая ФГАНУ «ВНИМИ» моющая композиция может быть использована для мойки линии маслоизготовителя на предприятиях, производящих масложировую продукцию, в том числе спреды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Производство молока и молочных продуктов: Санитарные правила и нормы. – 2-е изд. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России. – 2000. – 80 с.

2. Ланге К.Р. Поверхностно-активные вещества: синтез, свойства, анализ, применение / К.Р. Ланге; под науч. ред. Л.П. Зайченко. – Спб.: Профессия, 2004. – 240 с.

3. Плетнёв М.Ю. Поверхностно-активные вещества и моющие композиции. – М.: Химия, 2000. – 273 с.

4. Патент 4131877.3 Германии. 01.04.93. МКИ[5] С 11 D 1/722. Применение полиалкиленгликолевых эфиров спиртов жирного ряда с близкими по составу гомологами в очищающих составах, образующих незначительный объем пены.

5. Ушакова В.Н. Мойка и дезинфекция. Пищевая промышленность, торговля, общественное питание. – СПб.: Профессия, 2009. – 288 с.

УДК 636.52/.58.083:636.085.16

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ХИТОЗАНА ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В МЕДИЦИНЕ, ВЕТЕРИНАРИИ И АГРОБИОЛОГИИ

А.И. Албулов, В.П. Варламов, М.А. Фролова, А.Я. Самуйленко, А.В. Гринь

Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности, Щелково, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Хитозан – деацетилированное производное хитина – обладает многочисленными полезными свойствами, основными из которых являются сорбционные, иммуномодулирующие, антисептические, радиопротекторные, антиоксидантные и другие, что делает перспективным применение его в различных областях народного хозяйства. В настоящее время все больше расширяются такие сферы применения хитозана, как медицина и ветеринария, где он используется в составе биологически активных добавок для людей и препаратов для животных, а также агробиология в практике защиты растений от патогенов [1, 3, 4, 5].

Хитозан, как природный полисахарид, имеет достаточно широкое молекулярно-массовое распределение. Входящие в его состав фракции обладают различными физико-химическими характеристиками, с чем связано разнообразие свойств хитозана. В то же время применение хитозана в отдельных областях требует от него строго специфического действия, которое определяется такими физико-химическими характеристиками, как молекулярная масса и степень чистоты продукта [2].

Целью работы явилось получение хитозана, с узким молекулярно-массовым распределением, оценка его биологически активных свойств и применение в составе препаратов для человека, животных и растений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве исходного сырья для получения низкомолекулярного хитозана использовали хитозан с ММ 270 кДа. Ферментативный гидролиз хитозана проводили с использованием фермента Целловеридин Г20 при pH 5,2–5,6 и температуре 52–54° С. Гидролиз останавливали добавлением 10 %-ного раствора гидроокиси натрия до значения pH в смеси 9,5.

Раствор хитозана фильтровали, промывали деминерализованной водой до pH 8,0–8,4, растворяли в соляной кислоте при pH 6,0–6,3 и сушили на установке для распылительной сушки.

Показатель активности водородных ионов pH определяли потенциометрически, остаточную влажность методом высушивания пробы при 105° С, вязкость методом ротационной вискозиметрии на вискозиметре фирмы «Brookfild».

Ультрафильтрацию образцов низкомолекулярного хитозана осуществляли на установке ФМ 02–1000 через полисульфонамидные и ацетатцеллюлозные мембраны с размером пор 5, 10, 20 и 50 кДа. Молекулярную массу полученных фракций определяли методом ВЭЖХ.

Суммарную антиоксидантную емкость (АОЕ) хитозана определяли кулонометрическим методом на кулонометре «Эксперт–006».

Испытание хитозана в качестве энтеросорбента и иммуномодулятора при желудочно-кишечных заболеваниях молодняка сельскохозяйственных животных проводили в хозяйствах Тульской, Московской, Курской и Брянской областей в период массовых отелов и опоросов. Контролем служили группы телят и поросят, которым вводили антибиотики или не назначали лечебный препарат.

Оценку лечебного эффекта хитозана осуществляли по клиническому состоянию, среднесуточному привесу массы тела и биохимическим показателям сыворотки крови опытных животных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из перспективных методов снижения молекулярной массы хитозана является его ферментативная деструкция, как наиболее химически чистый и экологически безопасный способ. Применение ферментов позволяет до минимума сократить использование токсичных реактивов, избежать модификации полисахарида, регулировать молекулярную массу полученных полимеров. Низкомолекулярный водорастворимый хитозан получали по технологии, включающей в себя стадии растворения хитозана, создания оптимальных условий для проведения гидролиза, освобождения от нерастворимых примесей, переосаждения, фильтрации с последующей промывкой и лиофильной сушкой.

В результате гидролиза был получен хитозан со средневязкостной молекулярной массой 28,7 кДа. Дальнейшее фракционирование проводили на ацетат-целлюлозных мембранах производства «Владисарт» с размером пор 5, 10, 20, 50 кДа.

Таблица 1. Средневязкостная молекулярная масса гидролизованного хитозана

Размер пор мембран, кДа	Молекулярная масса хитозана, кДа	Содержание фракции в гидролизованном хитозане, %
5	2,8	0,3
5–10	7,8	27,9
10–20	17,4	37,2
20–50	30,8	32,3
> 50	42,8	2,3

Исследованиями, проведенными совместно с МГАВМиБ, Институтом проблем химической физики РАН, Брянской государственной сельскохозяйственной академией, было показано, что фракция хитозана массой 7,8 кДа проявляет радиопротекторную и адаптогенную активность, фракция с молекулярной массой 17,4 кДа обладает иммуномодулирующей активностью, препарат с молекулярной массой 30,8 кДа оказывает стимулирующее действие на кишечную микрофлору.

Антиоксидантная активность, определенная окислительным галогенированием электрогенерированными галогенами в пересчете на кверцетин составляла 554.42 ± 41.99 мг кверцетина на 100г абсолютно сухого образца, относительная ошибка определения составляла 1–3 %. В результате проведенных нами исследований установлено, что хитозан представляет интерес как антиоксидантный компонент различных лечебно-профилактических препаратов, влияющих на окислительные процессы организма.

Испытание препаратов на основе хитозана в животноводческих хозяйствах Московской, Курской, Тульской и Брянской областей показало, что применение хитозана с профилактической целью в дозе 2 мл 2 %-ного раствора на 1 кг живого веса 2 раза в день за 30 минут до еды в течение 2 дней дает профилактический эффект в 75–100 % случаев, применение хитозана с лечебной целью в дозе 3 мл 3 %-ного раствора на 1 кг живого веса 3 раза в день за 30 минут до еды в течение 3 дней дает лечебный эффект в 50–80 % случаев.

Отмечено увеличение среднесуточного привеса массы тела у телят и поросят опытных групп до 50 % по сравнению с контрольными группами животных.

Биохимические показатели сыворотки крови у телят и поросят опытных групп по содержанию фосфора, резервной щелочности, белковых фракций крови соответствовали физиологическим нормам, а у животных контрольных групп эти показатели были несколько ниже.

Таким образом, проведенные испытания показали, что хитозан является эффективным средством для поддержания жизнеспособности молодняка сельскохозяйственных животных, может быть применен для профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний телят и поросят.

В настоящее время на лекарственное средство «Хитозан» производства ВНИТИПБ утверждены в установленном порядке Технические условия, Инструкция по применению и Свидетельство о госрегистрации.

На основе низкомолекулярного водорастворимого хитозана получен препарат «Агрохит», регулирующий рост и индуцуцирующий болезнеустойчивость растений. Разработчиком этого препарата является Центр «Биоинженерии» РАН Низкомолекулярные фракции хитозана способны индуцировать биосинтез защитных белков и фитоалексинов растения, а также повышать прочность клеточных стенок, что делает растение более устойчивым к неблагоприятным воздействиям внешней среды. Проведенные исследования показали, что применение препарата на яблонях стимулирует рост побегов и корнеобразование у саженцев, повышает устойчивость к болезням коры и древесины, стимулирует ускоренную лигнификацию пораженных участков коры. Высокая ризогенная активность препарата обнаружена на черенках вишни, сливы, груши, смородины, крыжовника, облепихи. «Агрохит» также успешно испытан на тепличных культурах огурцов, томатов и зеленых культурах.

Хитозан, полученный предложенным выше способом, вошел в состав ряда биологически активных добавок к пище – «Хитан», «Полихит» и «Фитохитодез», эффективность которых подтверждена Институтом питания РАН.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хитозан полученный по технологии, разработанной ВНИТИБП – ЗАО «Биопрогресс», обладает высокой биологической активностью, позволяющей использовать его в различных областях медицины и сельского хозяйства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Албулов А.И., Самуйленко А.Я., Нифатьев Н.Э., Фоменко А.С., Фролова М.А., Шинкарев С.М. // Материалы V конференции «Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана», М. – Щелково, 1999, с. 115–117.

2. Ильина А.В., Варламов В.П. // Материалы 7 Международной конференции «Новые достижения в исследовании хитина и хитозана», М.: ВНИРО, 2003, с. 311–315.

3. Куликов С.Н., Алимова Ф.К., Захарова Н.Г., Немцев С.В., Варламов В.П. // Прикладная Биохимия и Микробиология, М, 2006, Т.42, № 2, с. 224–228.

4. Самуйленко А.Я., Шинкарев С.М., Албулов А.И., Фролова М.А., Крапивина Е.В., Кузнецов П.А. // Ж. «Аграрная Россия», М.: 2004, с. 8–12.

5. Червинец В.М., Албулов А.И., Червинец Ю.В. // VII Международная научно-практическая конференция «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов», г. Щелково, 2005, с. 438–444.

6. Xing R., Liu S., Guo Z. Et all. // Bioorg. Med. Chem, Institute of Oceonology, 2005, p. 1573–1577.

УДК 637.1/.3

СОЗДАНИЕ МОЮЩИХ КОМПОЗИЦИЙ, ИНДИФФЕРЕНТНЫХ ПО ОТНОШЕНИЮ К УФ-МЕМБРАНАМ

Е.Б. Харитонова, Ж.И. Кузина, Б.В. Маневич

Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности, Москва, Россия

Совершенствование биотехнологических процессов, направленных на создание новых обогащенных и функциональных продуктов с использованием мембранных технологий создает предпосылки для образования специфических комплексных отложений на поверхностях и в порах мембран, что требует разработки эффективных, экологичных и безопасных средств для регенерации (очистки) мембран [1]. Выбор моющих агентов должен осуществляться не только с учетом физико-химических свойств образующегося поверхностного слоя, отлагающегося на мембране, но и в зависимости от материала мембраны. Одним из важных компонентов любого моющего средства является поверхностно-активное вещество (ПАВ), обеспечивающее смачивающее действие моющего раствора по отношению к отложениям на мембранах и в их порах [2]. В последнее время появились новые виды ПАВ, обладающие высокой биоразлагаемостью, что отвечает требованиям безопасности и качества продукции и экологичности окружающей среды [3]. С целью выбора рационального ПАВ предварительно были проведены исследования по определению их индифферентности по отношению к ультрафильтрационным мембранам, поскольку имеются сведения в отечественной и зарубежной литературе о блокировке некоторыми видами ПАВ пор мембран. Совместимость ПАВ с материалом мембран определяли на лабораторном модуле. Через модуль пропускали 0,02 %-ные растворы ПАВ в течение 60 мин при температуре 21 ± 2^{o} С. Замеряли скорость прохождения воды (водопроницаемость мембраны) через модуль до и после обработки исследуемыми веществами. Разница в показателях указывает на образование микропленки этими веществами на мембране и, как следствие, блокировку пор. Отсутствие разницы показателей свидетельствует о совместимости материала мембран с природой и свойствами растворов ПАВ. В результате экспериментов было установлено, что смесь ПАВ на основе спиртов Гербэ, композиция ПАВ ФГАНУ «ВНИМИ», 2-этилгексил сульфат натрия и алкилглюкозид отвечали поставленным требованиям с позиций их индифферентности в отношении к ультрафильтрационным мембранам. По экологичности не соответствовал алкилбензилсульфонат натрия, так как он относится к трудно разлагаемым агентам, поэтому от применения его в производстве моющих средств экологи рекомендуют отказаться. Отмечено, что ряд исследованных низкопенных неионогенных ПАВ удерживаются мембранами (адсорбируются на мембране), снижая их фильтрующую способность. Некоторые ПАВ, особенно из класса катионных, полностью блокируют поток жидкости.

Важным условием для регенерации мембран является смачивающая и эмульгирующая способность ПАВ [4], за счет которых происходит смачивание и отрыв отложения от поверхности мембраны, проникновение в поры и обеспечение взаимодействия моющего раствора с белково-жировыми отложениями. Исследования поверхностного натяжения ряда ПАВ анионного и неионогенного вида позволили определить из них наиболее рациональные по этому показателю.

В результате экспериментов по определению эмульгирующей способности в отношении смеси молочного и растительного жиров выявлены алкоксилаты на основе спиртов Гэрбе, C_{12}-C_{16} – кокосульфат натрия, C_8-C_{10} – октилглюкозид и поверхностно-активная композиция ФГАНУ «ВНИМИ». Полученные данные представлены в виде рисунка 1.

В процессе фильтрации жидких молочных смесей через мембрану на ее поверхности за счет концентрационной поляризации постепенно образуется граничный слой высокомолекулярных веществ, не проходящих через поры мембран, что снижает производительность фильтрации. И в этом случае для обеспечения стабильной работы ультрафильтрационного аппарата необходима промывка мембран с целью удаления образовавшегося пограничного слоя. При этом, чем полнее будет проведена промывка, тем выше будет достигнута последующая производительность мембранной установки на продукте. При УФ-фильтрации молочного сырья в отлагающемся поверхностном слое преобладающим компонентом является белок. Для осуществления его гидролиза и полного удаления с поверхности и из пор мембраны необходимы либо растворы ферментов, либо высокощелочных реагентов.

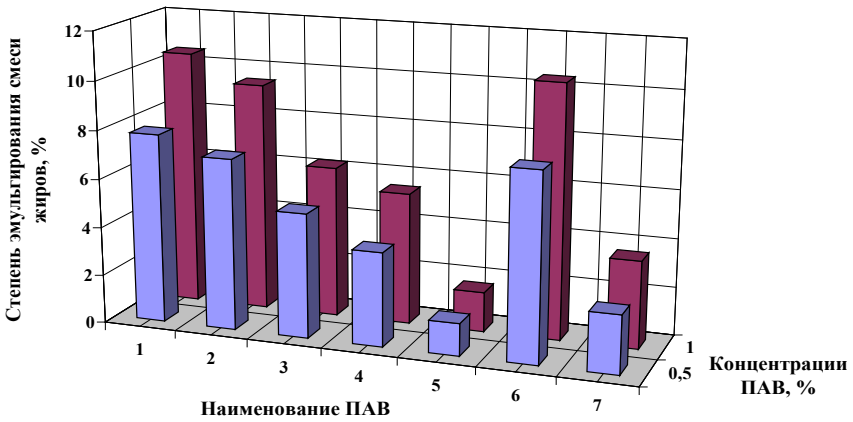


Рис. 1. Зависимость эмульгирующей способности ПАВ от их концентрации при температуре 22 ± 2о С, где: 1 – Поверхностно-активная композиция ФГАНУ «ВНИМИ»; 2 – С12-С16 – кокосульфат натрия; **3** – C_8-C_{10}-октилглюкозид; **4** – Алкоксилат на основе спиртов Гербэ; **5** – C_6 – актилглюкозид; **6** – 2-этилгексил сульфат натрия; **7** – Этоксилат на основе спиртов Гербэ

Производственная апробация работы УФ-установки на сквашенном сгустке при производстве творога позволила сделать вывод об эффективности моющей способности созданных ФГАНУ «ВНИМИ» рецептур щелочной и кислотной композиций на базе рациональной поверхностно-активной смеси компонентов. Результаты апробации эффективности работы УФ-установки на продукте в зависимости от исследуемых моющих средств и режимов их применения представлены на рисунке 2. Следует отметить, что чем выше начальная производительность установки, тем полнее были удалены загрязнения с поверхности и из пор мембран. Однако немаловажное значение имеет степень падения производительности УФ-установки в первые 30–60 минут. Как правило, этот показатель составляет до 30–40 % от первоначальной величины, что отмечается на графиках.

Возможно, что определенную роль играет техника эксплуатации установки. Залповая подача продукта в начале технологического процесса способствует резкому образованию плотного слоя отложения белково-жирового происхождения, сужению прохода жидкости и, как следствие, снижению производительности мембранного аппарата. А затем необходимости повышения давления в системе установки, усиления плотности слоя отложения и трудоемкости процесса очистки мембран.

Полученные результаты показали, что созданные моющие композиции ФГАНУ «ВНИМИ» и режимы их применения практически не уступали по эффективности режимам представленных фирм, что наглядно отражено на рисунке 2.

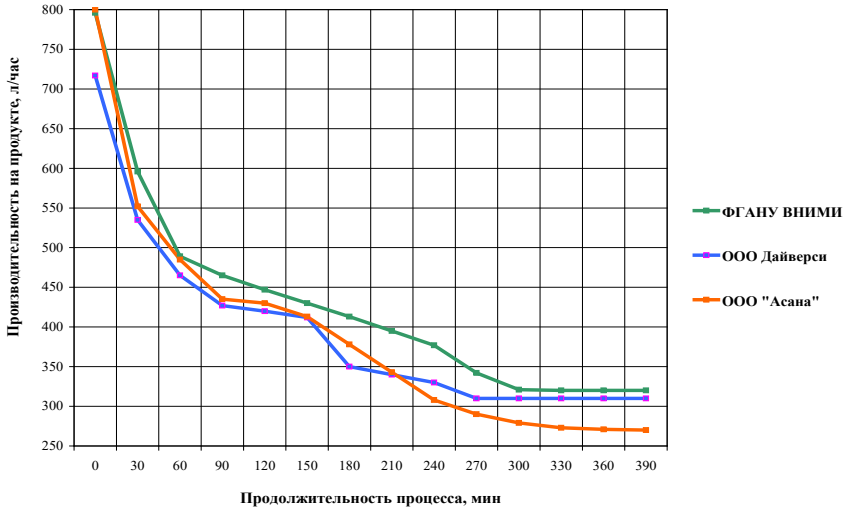


Рис. 2. Сравнительная характеристика производительности УФ-установки, укомплектованной полимерными мембранами, в зависимости от продолжительности её работы на сквашенном сгустке при производстве творога с использованием моющих средств ряда фирм

Результаты производственных апробаций позволяют рекомендовать для применения в производственных условиях отечественные моющие композиции и режимы их применения. Проведенные научные исследования позволили разработать рецептуры щелочного и кислотного моющих композиций для санитарной обработки оборудования, используемого на молочных предприятиях при производстве функциональных продуктов методом ультрафильтрации с использованием металлокерамических и полимерных мембран.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берговин А.М. Мембранная фильтрация в молочной промышленности. // Переработка молока. – 2008. – № 3. – С. 10–11.

2. Ланге К.Р. Поверхностно-активные вещества: синтез, свойства, анализ, применение / К.Р. Ланге; под науч. ред. Л.П. Зайченко. – Спб.: Профессия, 2004. – 240 с.

3. Бочаров В.В. Кинетические характеристики биоразлагаемости ПАВ как основа для отбора их в производство. Бытовая химия, 17, стр. 30–35 (2004).

4. Лутфуллина Г.Г., Зиннатуллина З.А. О возможности регулирования эмульгирующей способности композиций ПАВ. – Вестник технологического университета. – М .: 2015. – Т.18. № 15.

УДК 001.89

ГАРМОНИЗАЦИЯ ПАТЕНТНЫХ ЗАКОНОДАТЕЛЬСТВ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ И РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН В СВЕТЕ ЕДИНОЙ ПАТЕНТНОЙ ПОЛИТИКИ В ГОСУДАРСТВАХ-УЧАСТНИКАХ ЕАЭС

А.С. Исабеков, Л.А. Хасанова, Т.Е. Алгалиев, З.М. Хасанова

Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы, Уфа, Россия

Экономическая взаимозависимость государств Евразийского экономического пространства, развитие региональной и международной торговли с растущим импортом и экспортом товаров и услуг, процессы экономической интеграции и глобализации требуют создания общей системы правовой охраны интеллектуальной собственности, что предполагает гармонизацию национальных патентных законодательств, в связи с чем возникает вопрос единой патентной политики в государствах-участниках Евразийского экономического сообщества (ЕАЭС), членами которого являются, как Российская Федерация, так и Республика Казахстан. Единая патентная политика в рамках ЕАЭС особенно актуальна для инновационных отраслей промышленного производства, таких, например, как биотехнология, где остро стоит вопрос охраны и защиты прав интеллектуальной собственности [1; 2; 5].

В свете данного вопроса особо интересен опыт сотрудничества государств Совета экономической взаимопомощи (СЭВ) в области правовой охраны изобретений, который имел место в советский период. Необходимо отметить, что СЭВ – межправительственная экономическая организация, действовавшая с 1949 по 1991 годы, созданная по решению экономического совещания представителей Болгарии, Венгрии, Польши, Румынии, СССР и Чехословакии. Целью создания СЭВ провозглашалось содействие экономическому развитию стран-участников, повышение уровня индустриализации, уровня жизни, производительности труда и т. д. 18 декабря 1976 г. странами-членами СЭВ в Гаване (Республика Куба) было принято Соглашение о взаимном признании авторских свидетельств и иных охранных документов на изобретения. Соглашение предусматривало упрощенный порядок получения патентной охраны национальных разработок в странах-участницах. Признание действия охранных документов, выданных патентным ведомством одной страны – участницы, на территории других стран-участниц осуществлялось путем подачи ходатайства о таком признании, вынесении и публикации решения об этом [1; 3].

Патентная политика, характерная для плановой экономики, являющаяся комплеиментарной для стран с таким же типом хозяйствования, предполагала, что обладателем исключительных прав на изобретения является государство. В условиях же рыночной экономики исключительные права закрепляются и за частными лицами и организациями, а обладателем патента могут выступать как государство, но в лице какого-либо государственного органа – министерства или ведомства, так и частное лицо или коммерческая организация. Очевидна возможность применения этой системы к иным хозяйственным условиям в рамках рыночной экономики. Если говорить о современном патентном законодательстве Российской Федерации и Республики Казахстан, то законодательная база в области патентного права у указанных государств сходна (по существу основана на советском изобретательском праве). Согласно нормам патентного законодательства Российской Федераций и Республики Казахстан изобретение является патентоспособным и ему предоставляется правовая охрана, если оно отвечает критериям новизны, изобретательского уровня и промышленной применимости [1–4].

В качестве изобретения, согласно законодательству указанных государств, охраняется техническое решение в любой области, относящееся к продукту (в частности, устройству, веществу, штамму микроорганизма, культуре клеток растений или животных) или способу (процессу осуществления действий над материальным объектом с помощью материальных средств), а также применение известных продукта или способа по новому назначению или нового продукта по определенному назначению (Ст. 6 Патентного закона Казахстана).

Нормы патентных законодательств Российской Федерации и Республики Казахстан и, соответственно, условия патентоспособности изобретений, не имеют практически существенных различий, однако они также должны соответствовать нормам Соглашения о единых принципах регулирования интеллектуальной собственности стран-участниц единого экономического пространства (ЕЭП), куда входят помимо Российской Федерации и Республики Казахстан ещё и Киргизская Республика, Республика Армения и Республика Беларусь, в связи с чем предполагается дальнейшая гармонизация норм патентных законодательств указанных государств в сфере охраны и защиты прав интеллектуальной собственности.

Российской Федерацией и Республикой Казахстан согласно документам ЕАЭС о формировании ЕЭП в 2010 г. было принято Соглашение о единых принципах регулирования в сфере охраны и защиты прав интеллектуальной собственности, основные положения которого направлены на унификацию принципов регулирования в области охраны и защиты результатов интеллектуальной деятельности и средств индивидуализации товаров, работ и услуг, которые охраняются национальным законодательством стран-участниц Соглашения (Федеральный закон № 179-ФЗ от 11.07.2011 г. «О ратификации Соглашения о единых принципах регулирования в сфере охраны и защиты прав интеллектуальной собственности», принятый Государственной Думой РФ 28 июня 2011 г. и одобренный Советом Федерации 6 июля 2011). Принятие указанного Соглашения направлено, прежде всего, на отработку общих стандартов охраны интеллектуальной собственности, которые стороны Соглашения обязаны предоставлять физическим и юридическим лицам другой стороны, при этом их основой должны стать базовые международные соглашения в области интеллектуальной собственности [5].

ЛИТЕРАТУРА

1. Благополучная К.В. Единая патентно-правовая охрана изобретений на территории Таможенного Союза России, Беларуси и Казахстана, как средство его инновационного развития. Дис. канд. юрид. наук: 12.00.03 / Благополучная, Камила Владимировна. – М., 2014. – 130 с.

2. Благополучная К.В. Создание Таможенного Союза в рамках Евразийского Экономического Сообщества и введение единой охраны изобретений как условие его инновационного развития / К.В. Благополучная // Изобретательство. – 2013. – Т. 13. – № 6. – С. 23–31.

3. Крысанов А.Б. Охрана товарных знаков и знаков обслуживания в условиях формирования Единого экономического пространства // Интеллектуальная собственность: теория и практика: сб. докл. науч.-практ. конф. «Петербургские коллегиальные чтения – 2011» (Санкт-Петербург, 23–24 июня 2011 г.) / под общ. ред. Ю.И. Буч. – СПб.: ООО «ПиФ.com», 2011. – С. 64–69.

4. Лосев С.С. Основы управления интеллектуальной собственностью: учеб.-метод. пособие / С.С. Лосев. – Мн.: БГЭУ, 2007. – 154 с.

5. Лосев, С.С. Правовая охрана интеллектуальной собственности в едином экономическом пространстве // Интеллектуальная собственность. Авторское право и смежные права. – 2011. – № 1. – С. 59–67.

УДК 602

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ФЕРМЕНТАЦИИ ШТАММА *E.COLI* BL21(DE3) С ПЛАЗМИДОЙ PET32A ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ УРОВНЯ СИНТЕЗА ЦЕЛЕВОГО БЕЛКА

К.В. Кувакин[1,2], Е.В. Демьянова[1], В.И. Лисицкая[1], О.Б. Иванченко[2]

1. ФГУП «Гос. НИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия
2. Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

Пероральная вакцина против холеры находится на первом месте в списке приоритетных вакцин ВОЗ. В настоящее время для профилактики холеры используются пероральные субъединичные вакцины, основанные на инактивированных («убитых») штаммах *V.cholerae*. При применении инактивированных вакцин сохраняется вероятность развития аутоиммунных и токсических осложнений, а для обеспечения полной защиты от заболевания требуется несколько процедур вакцинации с соблюдением необходимого интервала между ними. Таким образом, становится актуальной задача разработки кандидатных вакцин против холеры нового поколения.

Разработка поливалентной вакцины на основе фьюжн-белка, содержащего высокоиммуногенные эпитопы патогенных штаммов холеры: субъединицу холерного токсина B (rBS), белок холерных пилей A (TcpA), лиганд к Fc-рецепторам в стенке желудка (FcL), является перспективным подходом к созданию эффективной вакцины. Производство рекомбинантных вакцин не требует работы с патогенными микроорганизмами, полученный препарат поддается четкой стандартизации и контролю физико-химических параметров. В ответ на введение рекомбинантного белка активируется не только гуморальное, но и клеточное звено приобретенного иммунитета, что обусловливает высокую протективность вакцины. Использование лиганда к Fc обеспечивает проникновение рекомбинантного белка через стенку желудка, что позволяет применять вакцину пероральным способом.

Принципиальным отличием разрабатываемой вакцины против холеры от лицензированных коммерческих вакцин является то, что кандидатная вакцина основана на рекомбинантном белке, созданном с помощью методов генной инженерии и получаемом в клетках *Escherichia coli*, без культивирования патогенных микроорганизмов. Структура химерного фьюжн-белка искусственно сконструирована таким образом, что выбраны высокоиммуногенные эпитопы поверхностных белков штаммов патогена. Такие белки невозможно получить при традиционном подходе, культивируя патогены. Вакцинные препараты, получаемые с помощью такой технологии, обладают большей фармацевтической чистотой и не содержат консервантов (формальдегид, мертиолят).

Целью данной работы является исследование возможности масштабирования процесса получения фьюжн-белка и моделирования условий стандартного процесса выращивания штамма.

Задачей экспериментов являлся поиск клонов с повышенной способностью синтезировать фьюжн-белок и оптимизация условий ферментации штамма-продуцента для повышения уровня синтеза целевого белка.

Все эксперименты были проведены на культуре продуцента фьюжн-белка *E.coli* BL21(DE3) с плазмидой pET32a/Fc-TcpA-native с использованием микроскопа МБИ-15у4.1, спектрофотометра UVmini-1240 Shimadzu, термостатированной качалки Gerhardt и ферментера Bioflo 110 с общим объемом реактора 14 литров (рабочий – 10 литров) фирмы New Brunswick, снабженного системами термостатирования, pH-статирования, автоматического поддержания уровня аэрации и подачи титрантов или добавок.

Для отбора клонов при приготовлении рабочей культуры штамма и наработки посевного материала использовали L-агар и L-бульон. Для поиска клонов с повышенной способностью синтезировать фьюжн-белок из образца культуры штамма выделяли на L-агаре отдельные колонии (15 штук), помещали каждый клон в L-бульон с ампициллином (100 мкг/мл). Далее культуры исследуемых клонов помещали в термостатированную качалку и, по достижении оптической плотности 1.0–1.1 ед. при длине волны 540 нм, вводили индуктор (лактоза) до конечной концентрации 0.68 %. Длительность индукции 5 часов. Продуктивность клонов оценивали с помощью микроскопии в режиме фазового контраста по величине, зрелости и количеству телец включения в клетках культур клонов. По результатам микроскопического исследования были отобраны 3 клона из 15, на основе культур которых была наработана и заморожена при -70^{o} С рабочая культура штамма оптической плотностью 11 ед. при длине волны 540 нм.

Культивирование штамма-продуцента *E. coli* BL21(DE3) / pET32a/Fc-TcpA-native в ферментере Bioflo 110. Для оптимизации условий культивирования штамма применяли метод периодического глубинного культивирования с использованием в качестве индукторов экспрессии гена фьюжн-белка IPTG в конечной концентрации 0,5 мМ, а также лактозу 0.68 %. Культивирование проводили при pH 7.4–6.9 и поддержании аэрации на уровне 50 % от насыщения при температуре 37^{o} С. Подачу индуктора осуществляли в середине логарифмической фазы роста культуры, при ориентировочной оптической плотности 8.0–10.0 ед. при длине волны 540 нм, после чего отбирали пробы для анализа методом электрофореза в ПААГ с ДДС-Na.

Для определения наилучшей схемы индукции целевого белка, соответствующей как максимальному выходу биомассы, так и количеству фьюжн-белка на клетку, были применены следующие варианты ферментации:

1) Индукцию синтеза целевого белка производили введением IPTG.

2) Индукцию синтеза целевого белка производили введением лактозы.

3) Индукцию синтеза целевого белка производили введением лактозы с введением добавки во время индукции.

В 3 варианте культивирования добавка включала в себя кислотный гидролизат казеина, дрожжевой экстракт и глюкозу. Добавку вводили в ферментер через 15 минут после введения лактозы.

Анализ трех представленных схем ферментации позволяет сказать, что третий вариант культивирования по выходу биомассы и соответственно целевого белка является предпочтительным, кроме того дает возможность не использовать IPTG в качестве индуктора.

УДК 579.222

НОВЫЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ РЕКОМБИНАНТНЫЙ ПРОДУЦЕНТ КОРМОВОГО ФЕРМЕНТА ЭНДО–1,3(4)-В-ГЛЮКАНАЗЫ НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕЙ *KOMAGATAELLA KURTZMANII*

Л.Н. Борщевская, Т.Л. Гордеева, А.Н. Калинина, С.П. Синеокий, А.С. Федоров

НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, Москва, Россия

Эндо–1,3(4)--глюканаза относится к одному из самых востребованных в промышленности ферменту и широко применяется в качестве добавки к кормам сельскохозяйственных животных с однокамерным желудком, эндогенно катализируя гидролитическое расщепление внутренних β-1,3- и β-1,4–связей в β-глюканах.

β-глюкан – водорастворимый некрахмальный полисахарид, содержащийся в зерновых компонентах комбикормов (в овсе – 0,67 %, ржи – 0,18 %), действует как анти-питательный агент. В результате действия β-глюканов происходит нарушение процессов пищеварения из-за недоступности питательных веществ для пищеварительных ферментов животного.

Наиболее эффективным способом снижения негативного влияния β-глюкана на ЖКТ является применение ферментных препаратов на основе эндо – 1,3(4) -β-глюканаз. При вводе эндо – 1,3(4) -β-глюканаз в комбикорма для птицы и свиней повышается усвояемость питательных веществ, что приводит к улучшению продуктивности и конверсии корма.

Импорт препаратов на основе ферментов, расщепляющих некрахмалистые полисахариды, составляет 21,39 млн. USD, или 68 % от рынка в стоимостном выражении. В России свыше 80 % ферментных препаратов, необходимых для животноводства, импортируется из-за рубежа. Стоит отметить, что на рынке РФ не представлено ни одного моноферментного препарата β-глюканазы.

Разработка высокоактивных отечественных рекомбинантных штаммов-продуцентов β-глюканаз и масштабируемых технологий ферментации для импортозамещения ферментных кормовых добавок является актуальной задачей.

В настоящее время наиболее перспективным является разработка продуцентов ферментов на основе дрожжей, что представляет большой интерес с научной и технологической точки зрения, поскольку дрожжи более удобны для проведения генно- инженерных работ и быстрее накапливают целевой фермент в сравнении с грибными продуцентами, а также позволяют получить моноферментные препараты. В частности, для этих целей широко используются метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris*. Они обладают мощными системами экспрессии и секреции рекомбинантных белков.

В нашей лаборатории был получен рекомбинантный штамм-продуцент β-глюканазы на основе экспрессионной системы дрожжей *Komagataella kurtzmanii* ВКПМ Y-4464. Штамм содержит 6 копий гена, кодирующего эндо–1,3–1,4-β-глюканазу из *Bacillus pumilus* под контролем индуцибельного промотора *AOX1*. Для получения штамма с несколькими копиями была использована стратегия конструирования многокассетных генетических конструкций, содержащих несколько тандемно расположенных копий кассет для экспрессии генов β-глюканаз. Также была разработана методика отбора штаммов дрожжей с многокопийными вставками генов β-глюканазы в составе хромосомы.

В лабораторном ферментере продуктивность штамма составила 10000 ед./мл культуральной жидкости за 164 часа культивирования.

В ходе работы были разработаны элементы масштабируемой технологии ферментации штамма ВКПМ Y-4464, выделения и очистки ксиланазы с использованием испытательного стенда в объемах ферментаций 10/100 л на базе консорциума, в который входят НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, АО «Биоамид» и ООО ПО «Сиббиофарм».

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта – RFMEFI60717x0179) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.

УДК 001.89

СИСТЕМА ЕДИНОГО ПАТЕНТА В РАМКАХ ЕВРАЗИЙСКОГО ЭКОНОМИЧЕСКОГО СОЮЗА

Т.Е. Алгалиев, Л.А. Хасанова, А.С. Исабеков, З.М. Хасанова

Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы, Уфа, Россия

Разработка инновационных технологий и, в частности, биотехнологий в странах Евразийского экономического союза (ЕАЭС) требует формирования системы единого патента. Основные условия для введения единого патента ЕАЭС – функционирование единого рынка товаров и услуг, развитие единых информационных систем, проведение налоговой, денежно-кредитной, валютно-финансовой, торговой, таможенной и тарифной политики наряду с созданием условий для стабильного развития экономики этих государств в целях повышения конкурентоспособности продукции, производимой на рынке указанных стран и, соответственно, гармонизация норм патентного законодательства стран-участниц ЕАЭС [1].

Предполагается, что система единого патента ЕАЭС будет сосуществовать с национальными патентными системами, а патент иметь статус унитарного в его действии на территории стран-участниц ЕАЭС. Патентная система должна быть доступна для заявителя, как в части затрат на патентование, так и получения охранного документа, и, конечно же, не противоречить действующим на сегодняшний день патентным системам, таким как, например, Евразийская патентная система, основываться на таких документах, как Евразийская патентная конвенция и Парижская конвенция об охране промышленной собственности.

В связи с этим необходимо отметить, что Евразийская патентная система на основании Евразийской патентной конвенции не предусматривает охрану полезных моделей и промышленных образцов. Предлагаемый вариант использования одного из ведомств – стран-участниц ЕАЭС мог бы быть применим именно к этим объектам, причём заявка на единый патент может быть подана в патентное ведомство любой из стран-участниц ЕАЭС [2].

Рассмотрение заявки может осуществлять как патентное ведомство того государства, в которое подана такая заявка, так и любое патентное ведомство из стран-участниц ЕАЭС. Выбор предлагается оставить за заявителем. Патентные законы государств ЕАЭС в целом гармонизированы и в вопросах рассмотрения заявок на получение патентов не должно возникать сложностей. Проведение экспертизы по существу можно возложить на любое патентное ведомство указанных государств или, например, только на патентное ведомство Российской Федерации. Обоснованием этому может служить как факт признания Роспатента в качестве поискового органа, обладающего мощной поисковой базой патентных источников информации, органа международной предварительной экспертизы в рамках Договора о патентной кооперации (РСТ) ВОИС, так и факт признания квалификации его экспертов [3].

Безусловно, в передаче функции по проведению экспертизы по существу только одному из патентных ведомств стран-участниц ЕАЭС существует и минус, например, в случае Роспатента большая его загрузка.

Для решения вопросов о системе единого патента ЕАЭС между патентными ведомствами стран-участниц ЕАЭС возможно заключить соглашение о сотрудничестве в рамках рассмотрения заявок на получение единого патента ЕАЭС. В данном соглашении можно указать, какое из этих ведомств компетентно в проведении экспертизы заявки, а какие только в принятии заявки к рассмотрению, а также какой из патентных органов будет осуществлять все возможные процедуры после выдачи единого патента ЕАЭС [2].

Также можно закрепить функции по принятию заявки на выдачу единого патента ЕАЭС, ее рассмотрение (формальная экспертиза, экспертиза по существу), поддержание патента, регистрация договоров, оспаривание патента и другие процедуры за тем патентным ведомством, куда изначально подавалась заявка на выдачу такого патента [1].

Вопросы оспаривания, признания недействительным патента ЕАЭС могут решаться на национальном уровне – патентным ведомством (или при необходимости судом) той страны, в патентное ведомство которой была подана заявка соответственно резидентом этой страны. В случае признания патента ЕАЭС недействительным полностью или частично, такое решение должно равно действовать на территории всех стран-участниц ЕАЭС [1–3].

ЛИТЕРАТУРА

1. Благополучная К.В. Единая патентно-правовая охрана изобретений на территории Таможенного Союза России, Беларуси и Казахстана, как средство его инновационного развития. Дис.канд. юрид. наук: 12.00.03 / Благополучная, Камила Владимировна. – М., 2014. – 130 с.

2. Евразийская патентная конвенция от 12 августа 1995 г. Ратифицирована Федеральным Собранием (Федеральный закон от 1 июня 1995 г. № 85-ФЗ – Собрание законодательства Российской Федерации, 1995, № 23, ст. 2170).

3. Гражданский Кодекс Российской Федерации. Ч. 4 / Собрание законодательства Российской Федерации. – 2006. – № 52. – Ч. I. – ст. 5496–5497.

УДК 579.222

НОВЫЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ РЕКОМБИНАНТНЫЙ ПРОДУЦЕНТ КОРМОВОГО ФЕРМЕНТА ФИТАЗЫ НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕЙ *PICHIA PASTORIS*

Т.Л. Гордеева[1], Л.Н. Борщевская[1], А.Н. Калинина[1], С.П. Синеокий[1], С.П. Воронин[2], М.Д. Каширская[2]

[1] НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, Москва, Россия
[2] АО «Биоамид, Саратов, Россия

Для улучшения питательных свойств растительных кормов широко применяются ферменты фитазы микробного происхождения, катализирующие гидролиз фитатов с отщеплением неорганического фосфата.

Фитаты (мио-инозитол гексакисфосфаты), в виде которых растения запасают фосфор, практически не усваиваются организмом животных с однокамерным желудком и домашней птицей. Значительная доля неусвоенного фосфора выводится с экскрементами из организма и загрязняет окружающую среду. Кроме того, фитаты являются хелатирующими агентами, снижающими пищевую ценность кормов. Введение фитаз в растительные корма повышает усвоение фосфора, кальция, микроэлементов, белков и аминокислот желудочно-кишечным трактом животных.

В настоящее время фитазы получают микробиологическим путем с использованием рекомбинантных штаммов-продуцентов. В частности, для этих целей широко используются метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris*. Для них разработаны питательные среды и отработан процесс ферментации с использованием культуры высокой плотности. Кроме того, они обладают мощными системами экспрессии и секреции рекомбинантных белков, в том числе, фитаз. На российский рынок препараты фитаз поставляются, в основном, зарубежными компаниями. Разработка высокоактивных отечественных рекомбинантных штаммов-продуцентов кормовых ферментов фитаз и масштабируемых технологий ферментации для импортозамещения ферментных кормовых добавок является актуальной задачей.

В нашей лаборатории на основе дрожжей *P. pastoris* был создан высокоэффективный рекомбинантный многокопийный продуцент фитазы *Escherichia coli* с использованием Cre-lox системы. Для увеличения уровня экспрессии рекомбинантного фермента последовательность нативного гена, кодирующего фитазу *E. coli*, была оптимизирована с учетом частот встречаемости кодонов у эффективно экспрессирующихся генов в дрожжах P. pastoris. Полученная синтетическая последовательность *phyEc-mod* имеет 73,76 % гомологии с последовательностью нативного гена. Синтетический ген *phyEc-mod* был клонирован в интегративный экспрессионный вектор под контролем модифицированного индуцибельного промотора *AOX1*. Секреция фитазы в культуральную жидкость обеспечивалась модифицированным сигнальным пептидом на основе пре-про-последовательности ά-фактора дрожжей *Saccharomyces cervisiae*. Для улучшения фолдинга и секреции рекомбинантного фермента в хромосому дрожжевого штамма был интегрирован ген *HAC1* из *S. cervisiae*, кодирующий активатор транскрипции генов ответа клетки на несвернутый белок (UPR – unfolded protein response). Проведение ПЦР в режиме «реального времени» показало, что в хромосоме полученного штамма интегрировано 11 копий гена *phyEc-mod*.

Был разработан эффективный процесс ферментации штамма в лабораторном ферментере с минеральной средой и подпиткой метанолом, позволяющий получить культуральную жидкость с фитазной активностью не менее 23700 ед./мл за 160 часов культивирования. На базе Индустриального партнера ООО «ПО «Сиббиофарм» отработана и оптимизирована технология ферментации штамма-продуцента фитазы на ферментере объемом 8 м^3. Отработана технология выделения и переработки фитазы, получены сухие формы препарата.

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта – RFMEFI57917x0145) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.

УДК 579.222

НОВЫЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ РЕКОМБИНАНТНЫЙ ПРОДУЦЕНТ КОРМОВОГО ФЕРМЕНТА ЭНДО – 1,4-B-D-КСИЛАНАЗЫ НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕЙ *PICHIA PASTORIS*

А.Н. Калинина, Л.Н. Борщевская, Т.Л. Гордеева, С.П. Синеокий

НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, Москва, Россия

Ксилан – основной представитель трудногидролизуемых некрахмалистых полисахаридов, содержащихся в зерне, основная цепь которого состоит из остатков β-D-ксилозы, соединенных между собой (1,4)–связями. Содержание ксилана в компонентах комбикормов превышает 25 %, что затрудняет пищеварение и усвоение питательных веществ рациона моногастричными животными.

Основную роль в разрушении ксилана играет эндо–1,4-β-D-ксиланаза (EC 3.2.1.8), которая катализирует гидролитическое расщепление 1,4-β-ксилозидных связей в ксилане. Ксиланазы широко применяются на практике для улучшения питательных свойств кормов. Они способствуют нейтрализации антипитательных свойств полисахаридов, находящихся в кормах из зерна злаковых культур, чем обеспечивают повышение усвояемости питательных веществ корма, улучшение микробиологической среды кишечника за счет снижения вязкости перевариваемого субстрата.

В отечественной промышленности до настоящего времени используются, в основном, микробные штаммы-продуценты кормовых ферментов, созданные на основе грибов рода *Trichoderma, Aspergillus* и *Penicillium*.

Такие штаммы синтезируют ограниченный ассортимент ферментов, имеют относительно невысокую продуктивность, продуцируют, помимо ксиланаз, ряд других ферментов, что не позволяет использовать их при производстве моноферментных препаратов. Кроме того, свойства синтезируемых ферментов не всегда соответствуют требованиям технологических процессов, в которых они могут применяться. Также отмечается высокая импортозависимость в сфере кормовых ферментных препаратов на российском рынке (приблизительно 80 %).

Сегодня наиболее перспективным направлением является создание продуцентов ферментов на основе рекомбинантных штаммов метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris*. Дрожжи *P. pastoris* способны вырастать до очень высоких плотностей с использованием несбраживаемых источников углерода – глицерина, метанола, что позволяет получать высокие уровни гетерологичного белка.

Разработка высокоактивных отечественных рекомбинантных дрожжевых штаммов-продуцентов кормовых ферментов и создание на их основе конкурентоспособных ферментных препаратов является актуальной задачей.

В нашей лаборатории был получен рекомбинантный штамм-продуцент ксиланазы на основе экспрессионной системы дрожжей *Pichia pastoris* ВКПМ Y-4461. Штамм содержит 8 копий гена, кодирующего эндо–1,4-β-D-ксиланазу из *Paenibacillus brasilensis* под контролем индуцибельного промотора *AOX1*. Для получения штамма с несколькими копиями целевого гена была использована тактика последовательной интеграции экспрессионной кассеты с последующим выщеплением маркерного гена, а также разработана методика отбора наиболее продуктивных трансформантов.

В лабораторном ферментере продуктивность штамма составила 30000 ед./мл культуральной жидкости за 164 часа культивирования.

В ходе работы были разработаны элементы масштабируемой технологии ферментации штамма ВКПМ Y-4461, выделения и очистки ксиланазы с использованием испытательного стенда в объемах ферментаций 10 / 100 л на базе консорциума, в который входят НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, АО «Биоамид» и ООО ПО «Сиббиофарм».

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта – RFMEFI60717x0180) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.

УДК 547.458.65

ПОЛИСАХАРИДЫ ИЗ КОРНЕКЛУБНЕЙ ТОПИНАМБУРА *(HELIANTHUS TUBEROSUS)*

А.И. Ашуров, А.С. Джонмуродов, З.К. Мухидинов, С.Р. Усманова, К. Партоев*

Институт химии им В.И. Никитина АН Республики Таджикистан,
**Центр инновационного развития и новых технологий АН Республики Таджикистан*

В последнее время всё большее внимание уделяется безотходным многоцелевым культурам, которые широко используются в продовольственной, фармацевтической, экологической областях, кормопроизводстве и одним из таких продуктов является топинамбур (*Helianthus tuberosus*). Хотя он известен как культура нескольких тысячелетий, но только сейчас приобретает популярность как сырье для получения функциональной пищи [1, 2].

В клубнях топинамбура содержится 75–80 % углеводов в форме инулина, а в клубнях картофеля такое же количество крахмала [3].

Возможно, самое полезное свойство инулина с точки зрения фармацевтики – это его свойство проявлять различные молекулярные структуры (полиморфы или изоформы). Инулин, полученный осаждением этанола, представлен β-формой, а водная экстракция при комнатной температуре или ниже даёт α-инулин [4]. Теоретические исследования показывают, что многие формы допустимы [4], также на практике было обнаружено, что как α-, так и β-формы были неустойчивыми [5]. Позже была обнаружена и третья форма инулина (γ), которая не растворима при температуре человеческого тела. Открытие данной формы позволило учёным создать новую вакцину [6]. Новая форма δ-инулина хорошо растворима при температуре менее 75° С и оказалась более эффективным средством для применения в медицинской практике [7].

Целью данной работы явилось повышение эффективности процесса экстракционной переработки растительного сырья для получения инулина, определение оптимальных условий процесса, выбор параметров обработки (время и температура обработки, способ экстракции). Для этой цели, нами, был применён метод флеш-экстракции [8] в сравнении с известным методом экстракции данного полисахарида.

Согласно традиционному методу [9], полисахарид инулин получают смешиванием сухих измельчённых клубней с горячей водой в соотношении 1:6, выдерживают 12 ч при 70 °С, экстракцию проводят при 80 °С. Водное извлечение отделяют. Ещё трижды по 40 мин проводят извлечение водой в соотношении 1:4 с последующим объединением извлечений. Очистку разбавленного водой сока 1:1, водных извлечений из выжимок или из сухих клубней проводят карбонатом кальция в течение 60 мин при 85° или 80 °С соответственно для сока и выжимок или сухих клубней. Фильтруют, упаривают фильтраты. Проводят кристаллизацию сырого инулина при 4 °С в холодильнике в течение 5 суток из водных извлечений после добавления спирта 1: 1 или из разбавленного сока.

Инулин был экстрагирован из корнеклубней топинамбура сорта «Сарват» (выведенного учёными и специалистами Центра инновационного развития и новых технологий АН Республики Таджикистан), влажностью 76 %, традиционным методом (ТМ) – экстракцией водой при температуре 75° С в течение 60 мин и флеш-методом (ФМ) в автоклаве при 95° и 105° С в течение 7 мин. Далее из раствора гидролизата осаждением этиловым спиртом выделяли высокомолекулярный полисахарид (пектин), а из оставшегося раствора охлаждением при температуре ниже 10° С получали инулин.

Данные выхода продуктов процесса экстракции приведены в табл. 1.

Большую часть продуктов экстракции составили водорастворимые вещества, выход которых достиг почти 75 % при традиционном методе и до 97 % от всей массы корнеплода топинамбура экстракцией ФМ. Как и следовало ожидать, наибольший выход инулина получен ФМ экстракцией при повышенных температурах 95° и 105° С и давлении 1.5 Атм, который составил 19.21 % и 16.2 % соответственно. Количество пектина в данном сорте топинамбура также было выше при экстракции ФМ. Увеличение температуры привело к снижению выхода водорастворимого инулина и увеличению экстракции пектина. Остальную часть составили водорастворимые сахара, фенольные и минеральные вещества, белки и другие соединения, которые являются предметом дальнейшего изучения.

Таблица 1 Выход продуктов экстракции из топинамбура сорта «Сарват» традиционным и флеш-методами.

Образец	Метод экстракции	Выход продуктов, %			
		водорастворимые вещества			остаток клеточной стенки
		пектин	инулин	сахара и другие вещества	
И 80–1Ат	ТМ	8. 20	8.50	58.7	24.6
И 95–1.5Ат	ФМ	12. 47	19.21	64.9	3.42
И105–1.5Ат	ФМ	13. 40	16.20	66.7	3.68

Качественный и количественный анализ микроэлементов в порошковом образце инулина, проведённый методом рентгеновской флуоресценции, показал, что в исследуемом образце инулина содержание оксидов калия (K_2O), фосфора (P_2O_5), магния (MgO) и цинка (ZnO) являются наибольшими по сравнению со средними значениями указанных минералов, приведёнными в литературе [3, 9], в то время как установленное содержание других минералов были наименьшими. Исследуемый инулин, полученный из топинамбура сорта «Сарват», не содержал в своём составе радиоактивные элементы стронция (SrO) и рубидия (Rb_2O), но содержит такие микроэлементы, как железо (Fe_2O_3) и сера (SO_3). Органическая часть по выходу летучих веществ (CO_2) составила 4.18 %.

Анализ ИК-Фурье спектров образцов инулина показали типичные полосы для этого полисахарида в областях: 3342–3281 $см^{-1}$ из-за валентных колебаний ОН, интенсивности полос поглощения, характерные для карбонильной группы в области 1640 $см^{-1}$ и 1393 $см^{-1}$, интенсивная полоса при 1032 $см^{-1}$ с характерным плечом при 1134 относящаяся к С-О-С вибрации пиранозного цикла. Полоса при 934 $см^{-1}$ отнесена к остатку глюкозы (-D-Glcp) в углеводной цепи, а сочетание этой полосы и пика при 1026 $см^{-1}$ указывает на наличие ОН-групп глюкозы в инулине. Последняя, в сочетании с полосами поглощения при 876 и 818 $см^{-1}$ подтвердила наличие 2-кетофуранозы в образце инулина, полученного ФМ. Полосы поглощений с максимумами при 934, 876, 818 $см^{-1}$ типичны для β (2–1) – связей остатков фруктофуранозы, которые почти отсутствовали у инулина, полученного ТМ.

Полосы, обнаруженные в области 1545 $см^{-1}$ для инулина экстрагированного водой (ТМ) относятся к ароматическим соединениям (возможно, фенольным соединениям). Интенсивность полос поглощения ароматических соединений для образца, полученного ТМ, была выше, чем для двух первых образцов соответственно, что свидетельствует об их доминировании в данном образце. ИК-спектры образцов инулина полученных ТМ и ФМ экстракции отличились, в основном, из-за присутствия пектиновых фракций. Экстракты, полученные ФМ показали, более сильную полосу поглощения в диапазоне 1222–1404 $см^{-1}$. Это можно объяснить высоким содержанием этерифицированных карбоксильных и гидроксильных групп пектина. Отличия в ИК-спектрах указывает на наличие разнообразия в формировании полисахаридов топинамбура в зависимости от среды произрастания и условий экстракции. Установление тонкой структуры этого полисахарида из клубней топинамбура является предметом дальнейшего изучения.

Таким образом, нами установлено, что сырой инулин, полученный ТМ и ФМ с последовательным осаждением спиртом или после однократной кристаллизации, содержит примеси, такие как пектин, остатки белков и аминокислот, органические кислоты, фенольные соединения и продукты их окисления, является источником углеводов и может использоваться для замены сахара и жиров. Показано, что инулиновый экстракт также богат макроэлементами и микроэлементам K, Mg, Ca, P, Fe и Zn.

Работа выполнена в рамках проекта Т-2148 Международного научно-технического центра при финансовой поддержке Госдепартамента США.

ЛИТЕРАТУРА

Roberfroid M.B. Inulin – type fructans: functional food ingredients. – J. Nutr., 2007, v. 137, № 11, pp. 2493–2502.

Coussement P., Inulin and Oligofructose as Dietr Fibre: Analytical, Nutritional and Legal Aspects, in Cho S., et al. (eds), Complex Carbohydrates in Food. – Marcel Dekker, Inc: New York, 1999, pp 203–212.

Kays S.J, Nottingham S. Biology and chemistry of Jeruslaem artichoke: *Helianthus tuberosus L.* – CRC press: Boca Raton, FL. 2007, 496 p.

Barclay T., Ginic-Markovic M., Petrovsky N. Inulin – a versatile polysaccharide with multiple pharmaceutical and food chemical uses. – J. Excipients and Food Chem. 2010, v. 1, № 3, pp. 27–50.

Kurakake, M.; Ogawa, K.; Sugie, M.; Takemura, A.; Sugiura, K. And KomakI, T Two Types of β – Fructofuranosidases from *Aspergillus Oryzae Kb*. – Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2008, vol. 56, no. 2, pp. 591–596.

Cooper P.D., McComb C., Steele E.J., The Adjuvanticity of Algammulin, a New Vaccine Adjuvant. – Vaccine. 1991, № 9, pp. 408–415.

Cooper P.D., Petrovsky N. New Polymorphic Form of Inulin and Uses Thereof. WO Patent 2006/024100 A1, 2006.

Мухидинов З.К., Тешаев Х.И., Джонмуродов А.С., Лиу Л.Ш. Малый патент TJ 563, опуб. 2013 бюл. НПИ Центр № 86.

Голубев В.Р. Волкова Н.В., Кушалаков Х.М. Топинамбур. Состав, свойства, способы переработки, области применения. – М., 1995, с. 60 – 68.

УДК 663/66

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОБНОГО ХИТОЗАНА

Е.А. Мотина, С.Ф. Яковлева, В.О. Минакова, К.В. Чекудаев, Н.А. Матвиенко

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

В настоящее время благодаря широкому спектру полезных свойств, к природному полисахариду хитозану наблюдается нарастающий интерес. Неоспоримым достоинством данного полисахарида является его безвредность для организма человека и окружающей среды, хитозан экологически чист и в природных условиях полностью распадается на безвредные элементы.

Применение его в разных областях промышленности разнообразно: хитозан используется в атомной промышленности – для локализации радиоактивности и концентрации радиоактивных отходов, в фотографической промышленности для производства специальных сортов бумаги, в сельском хозяйстве при производстве удобрений, помимо этого хитозан применяют в медицине в качестве шовных материалов, рано- и ожогозаживляющих повязок, в составе различных мазей и различных лечебных препаратов, в косметологии данный полисахарид применяют при производстве кремов (хитозан обладает регенерирующими свойствами), при производстве шампуней и других видов средств по уходу за кожей человека, при очистке воды хитозан используют в качестве сорбентом.

В связи с этим актуальным являются исследования, направленные на поиск новых отечественных микробных источников хитина и хитозана, а также на получение композитов данных биополимеров с другими соединениями, которые позволят расширить сферу применения.

Хитозан – деацетилированное производное хитина. Хитин является вторым, наиболее распространенным природным полимером после целлюлозы. Хитин является высококристаллическим полимером, в нем существуют внутри- и межмулекулярные связи между гидроксильными группами, а также между аминоацительными и гидроксильными группами.

Хитин нерастворим в воде, щелочах, разбавленных кислотах, спиртах, других органических растворителях, и растворим в концентрированных соляной, серной и муравьиной кислотах, а также в некоторых солевых растворах при нагревании, причем при растворении он заметно деполимеризуется. Он способен образовывать комплексы с органическими веществами: холестерином, белками, пептидами, а также обладает высокой сорбционной способностью к тяжелым металлам, радионуклидам. Хитин не разлагается под действием ферментов млекопитающих, но гидролизуется некоторыми ферментами насекомых, грибов и бактерий, отвечающими за распад хитина в природе.

Главным источником для получения хитина являлись грибы рода Aspergillus niger. Посевной материал представлял собой конидии производственного штамма, обладающие высокими всхожестью и продуктивностью и не содержащие посторонней микрофлоры.

Основную ферментацию проводили в ферментаторах вместимостью 50 или 100 м^3. Для культивирования использовали стерильную мелассную питательную среду температурой 32–33 °С. В процессе глубинной ферментации большое внимание уделяли аэрации, так как грибы нуждаются в постоянном поступлении кислорода. В ферментаторе вместимостью 100 м^3 в течение первых суток увеличивали подачу воздуха с 100–150 до 220 м^3/ч и поддерживали на данном уровне до окончания ферментации. Температуру среды в процессе поддерживали в пределах 31–32 °С.

О завершении процесса судили по изменению величины титруемой кислотности культуральной жидкости. Если титруемая кислотность практически не изменялась в течение 4–8 ч, то ферментацию заканчивают. При этом культуральную жидкость перекачивали в сборник, а мицелий отправляли на последующие стадии обработки.

Установлено, что оптимальной температурой для накопления биомассы гриба Aspergillus niger являлось значение 30–32° С. Изучая зависимость накопления биомассы от времени культивирования и pH, можно сделать вывод, что наибольшей пик накопления биомассы наблюдался через 28–30 часов культивирования при начальном уровне pH равном 5,0–5,3.

УДК 638.4:633.865

ПОЛУЧЕНИЕ МЕЛАНИНА И ИССЛЕДОВАНИЕ ЕГО БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Е.А. Прутенская, Э.М. Сульман, М.Г. Сульман, М.Д. Мельничук

Тверской государственный технический университет, г. Тверь, Россия

В современных исследованиях приоритетным считается поиск и получение природных биологически активных соединений, которые являются отличными эффекторами для лечения различных заболеваний и не осуществляют сбой работы клеточного метаболизма, а также обладают специфичностью действия. В России ученые вновь обратили свой взгляд на низкомолекулярные полифенольные соединения. Были продолжены исследования меланинов С.П. Лях в области медицины и фармакологи [1]. Было показано, что меланины участвуют в клеточной регуляции, способствуют заживлению язв, снижают негативные воздействия стресса [2–4].

Наличие у меланиновых веществ различных реакционных группировок, сопряженной системы двойных связейспособствует проявлению у них полифункциональных свойств, что позволяет защищать клетки от канцерогенных и мутагенных факторов [5,6]. Меланин является хорошим антиоксидантом. Он частично усваивается микроорганизмами кишечника, способствует нормализации микрофлоры желудочно-кишечного тракта. В связи с этим, меланиновые вещества можно использовать как энтеросорбенты, которые способны выводить токсины, при острых отравлениях [5].

Меланин рекомендуют при профилактике и лечении болезней людей, а также в пищевой, парфюмерной промышленности. Простейшим является вариант использования меланина в качестве добавок к солнцезащитным кремам. Присутствие меланина в пищевых и кормовых продуктах способствует их длительному хранению [2]. Поэтому получение меланина из различного сырья и определение его биологической активности является актуальным.

В настоящее время источником меланиновых вещества могут быть различные организмы от микроорганизмов до высших организмов, например насекомых.

Насекомые-источник меланиновых веществ.

В связи с поиском альтернативного материала для выделения меланиновых веществ многие ученые предлагают использовать насекомых в качестве быстрого воспроизводимого сырья. Их можно выращивать в промышленных масштабах не только в климатических камерах, но и в пластиковых контейнерах. При этом многие насекомые являются источником белка, который используют для кормления крупного рогатого скота, аквакультур,

Ученые из России и Казахстана [2] изучают перспективность культивирования мухи Hermetia illucens для получения меланиновых веществ, хитина и кормовых добавок. Было обнаружено, что максимальное количество меланина образуется на последнем этапе развития куколки, непосредственно перед окукливанием насекомых. Выявлено, что у имаго и куколки меланин проявляет широкий спектр противомикробной активности и способствует защите насекомых от бактериальных и грибковых инфекций. Экспериментальным путем были подобрали оптимальные сырьевые субстраты для выращивания личинок. Была разработана технология переработки их биомассы в полноценные кормовые и пищевые ингредиенты. Из 1 кг кормового субстрата можно получить 2,5–3,0 граммов меланина и до 9,0 граммов хитина. Получение меланина включает экстракцию сухой биомассы 3–5М раствором гидроксида калия, осаждение концентрированной соляной кислотой, центрифугирование, гидролиз соляной кислотой, центрифугирование, промывание дистиллированной соляной кислотой и сушку над безводным хлоридом кальция [2].

Известно получение меланина из подмора пчёл и возможностьего использования при экологически неблагоприятных воздействиях. Разработанный способ получения меланина из подмора пчёл является заключительной стадией технологии получения хитозан-меланинового комплекса из подмора пчёл [3]. Меланин получали из гидролизата после дезацетилирования подмора пчёл, который проводили двумя способами: «горячим» и «холодным». При «горячем» дезацетилировании выход меланина из исходного сырья в 1,7 раза больше, чем при «холодном». Исследования авторов показывают, что хитозан-меланиновый комплекс в животноводстве, в качестве кормовой добавки, более эффективен, чем чистый меланин, в следствии синергетического эффекта компонентов.

На кафедре БТиХ ТвГТУ совместно с компанией ООО «Жива» был разработан способ получения меланина из продуктов жизнедеятельности большой пчелиной моли [7]. Для выращивания огнёвки используются отходы пчеловодства. Получение меланина состоит из следующих стадий: обработка органическим растворителем, экстракция щелочным раствором, центрифугирование, осаждение соляной кислотой, сушка. Количество меланина составляло от 6 до 12 % от массы сырья. Выход меланина зависит от типа используемого органического растворителя. В качестве побочного продукта был получен воск, который соответствует требованиям, предъявляемые к пчелиному воску.

Растения – источник меланина.

Меланиновые вещества в растительном сырье содержатся в небольшом количестве. Их содержание колеблется от 1 до 15 % от массы сырья. В качестве сырья используют лузгу подсолнечника, виноградные косточкии т. д. Например, существует способ, который предусматривает предварительную обработку лузги гречихи целлюлолитическим ферментом целлюбранин ГЗХ в течение 48 часов, экстракцию, осаждение меланина кислотой, разделение фаз фильтрацией. Выход меланина из лузги гречихи составляет 8–10 % [8]. Однако применение в технологии дорогостоящего фермента делает данный способ экономически не эффективным и требует дополнительной стадии очистки от белкового компонента.

В настоящее время разработаны способы получения меланина из редких видов сырья. Так, например, компания «Олигофарм» в качестве сырья для получения меланина использует элитные сорта чая. Китайскими учеными также был описан метод получения меланина из листьев черного чая, который включает экстракцию меланина из листьев проточной водой, центрифугирование, растворение осадка в воде, доведение pH раствора до 12 1М гидроксидом натрия, центрифугирование и получение супернатанта, содержащего меланин и дальнейшее хранение полученного раствора в темноте при температуре 4ºС [9]. Скорбина Е.А. получала меланин из кожуры бананов [10].

Польскими учеными предложен способ получения меланина из косточек Citrullus lanatus (арбуз), который включает в себя экстрагирование щелочью, центрифугирование, удаление осадка, осаждение

меланиновых веществ из супернатанта 1М хлороводородной кислотой, центрифугирование, гидролиз осадка 6М хороводородной кислотой, центрифугирование, промывание дистиллированной водой, промывание хлороформом, этилацетатом и этанолом 3 раза, сушки и хранение чистого меланина при температуре -20ºС [11]. Однако, объемы данного сырья небольшие и получать меланин в промышленном масштабе не возможно.

Китайскими учеными был предложен метод получения меланиновых фракций из стенок плодов *Castanea mollissima* (каштана). Такой способ содержит в себе несколько стадий: экстрагирование раствором гидроксида натрия в течение 36 часов при температуре 40ºС, центрифугирование, удаление свободных белков из супернатанта по методу Севага, подкисленние раствора до pH2, центрифугирование, растворение полученного осадка в воде, повторное подкисление, центрифугирование до обесцвечивания супернатанта, отделение осадка с помощью центрифугирования, промывание полученного осадка этилацетатом и ацетоном, сушку при температуре 60ºС [12].

Китайскими учеными был предложен способ выделения меланина из отходов пищевой промышленности, из пальмового волокна, включающий экстракцию его этанолом, кислотный гидролиз и осаждение [13].

Комплексные технологии переработки растительного сырья являются актуальными в современном мире, так как позволяют получать не только биологически активные вещества, но и решают экологическую сторону проблемы утилизации отходов.

Технология переработки лузги подсолнечника, разработанная сотрудниками ТвГТУ, является практически экологически безопасной (за исключением образования щелочных и кислотных сточных вод). Основными этапами технологии являются: измельчение лузги подсолнечника, экстракция меланиновых веществ щелочным раствором в ультразвуковом поле, отделение шрота, осаждение целевого продукта, центрифугирование, лиофильная сушка. Вторичное сырье (шрот) смешивают с торфом и формируют пеллеты методом горячего прессования. В результате исследований были подобраны оптимальные условия экстракции меланинов с использование ультразвука, соотношения торфа и шрота при производстве пеллет [14].

При горячем прессовании происходит интенсификация химических, массообменных процессов, а также увеличение реакционной способности и пластификации лигнина лузги подсолнечника, в результате увеличивается прочность конечного продукта.

Таким образом, разработанный нами комплексный способ переработки лузги подсолнечника позволяет производить биотопливо с теплотворной способностью 20.5 МДж/кг и меланин, практически не содержащий белок и жиры. Выход БАВ составлял до 8 % от абсолютно сухого вещества сырья. Методом РФЭС было определено, что азота в меланине содержится 1,2 %, в отличие от препаратов, полученных без обработки ультразвуком, до 3 % [15]. Полученный меланин использовали в качестве стимулятора роста семян льна. Прирост биомассы по сравнению с контролем увеличивался на 10 %. Меланин также подавлял развитие микрофлоры обсемененного посадочного материала.

Микроорганизмы – продуценты меланина.

Бактериальные меланины также широко распространены, и они обнаружены у многих видов бактерий. Их культуры имеют черные или темно-коричневые цвета. Тем не менее, важно отметить, что не все темные пигменты в бактериальных культурах являются меланинами.

Бактериальные меланины впервые хорошо изучены и охарактеризованы на примере культуральной жидкости *Streptomyces*, так как эти виды активно исследовались для поиска антибиотиков. Образование меланина у этих бактерий послужило в качестве подходящего метода для классификации стрептомицетов. Эти виды использовались для исследования фермента тирозиназы, его структуры, механизма действия и регулирования его экспрессии. У *S. antibioticus* или *S. lividans*, пигмент меланин является побочным продуктом, который затрудняет выделение наиболее важных веществ из этих видов – антибиотиков.

Marinomonasmediterranea и *Bacillus thuringiensis* также содержат активные тиразиназные комплексы и культуральные жидкости становятся сильно пигментированы в присутствии L-тирозина. Все бактериальные меланины содержат азот, и их структура похожа на эумеланин. Меланин из *B. thuringiensis* был подробно изучен, на предмет меланизации бактериальной клетки как механизма защиты от действия пестицидов. Этот вид меланина оказался более легко растворим, в связи с чем было предложено его использование для альтернативных биотехнических применений.

Существует и бактериальный алломеланин из катехиновых предшественников. Таким образом, образование алломеланина который формируется у вида *Rhizobium* представляет собой механизм детоксикации фенольных соединений, которые накапливаются в стареющих узелках корней растений. Некоторые виды бактерий, такие как *Azotobacter*, могут также образовывать меланин из катехинов, чтобы обеспечивать высокий уровень дыхания, необходимый для защиты нитрогеназной системы при фиксации азота. Некоторые бактерии способны осуществлять пентакетидный путь биосинтеза, который ведет к образованию дигидроксинафталенмеланина, хотя бактериальные поликетидсинтазы имеют различные особенности, отличающие их от грибковых и растительных ферментов и, возможно, могут включать другие небольшие ароматические метаболиты к меланину. В связи с этим в последних случаях, существует ряд почвенных микроорганизмов (бактерий и грибков), которые образуют темные полимеры названые гуминовые кислоты, которые являются фенольными полимерами кислотного типа, подобные алломеланину, а также лигнин. Все эти полимеры имеют весьма сходные спектры и физико-химические свойства и очень устойчивы к разложению и обладают длительным сроком благотворного воздействия на почвы.

Другие виды, такие как *S. marcescens* образуют коричневый пигмент путем окисления и полимеризации промежуточных продуктов катаболических путей. У этих видов, предшественником меланина является 3,4–дигидроксифенилацетат. Когда ферменты этого катаболического пути индуцируются и 3,4–дигидроксифенилацетат–2,3–диоксигеназа остается низко активной; накопление дифенольных промежуточных продуктов приводит к формированию пигмента в качестве ликвидации избытка фенола. В настоящее время, получаемый полимер считается алломеланином, хотя первоначальные статьи ставили под сомненье образование меланина, так как синтезируемый продукт образовывался без участия полифенолоксидазы. Аналогичные данные были получены с изучением некоторых видов *Pseudomonas* за счет уменьшения 4-гидроксифенилпируватдиоксигеназной активности.

При выборе биологического агента и постановке его на производство прежде всего следует соблюдать принцип технологичности штаммов. Это значит, что микробная клетка, популяция или сообщество особей должны сохранять свои основные физиолого-биохимические свойства в процессе длительного ведения ферментации. Промышленные продуценты также должны обладать устойчивостью к мутационным воздействиям, фагам, заражению посторонней микрофлорой (контаминации); характеризоваться безвредностью для людей и окружающей среды, не иметь при выращивании побочных токсичных продуктов обмена и отходов, иметь высокие выходы продукта и приемлемые технико-экономические показатели.

Белорусскими исследователями был изобретен способ получения меланина с помощью штамма гриба *Aspergillus niger* БМП-97/2 (Белоруссия 5057). Однако, как утверждают авторы, штамм имеет ряд недостатков: длительный процесс получения посевного спорового материала (28 суток), длительная ферментация культуры (20 суток), анаэробное условия культивирования при повышенных температурах (37° С) [16].

Микробиологическим способом можно получить меланин из дрожжей. Авторы патента (РФ 2278163) сообщают, что из штамма дрожжей *Nadsoniella nigra* Б-3, который при глубинном выращивании на питательной среде определенного состава через 96 часов от начала культивирования накапливает до 25 г./л биомассы дрожжей. Меланин выделяют экстракцией раствором щелочи и / или этилового спирта с последующим осаждением пигмента соляной кислотой. Предлагаемый авторами способ является время затратным и предусматривает использование легковоспламеняющихся веществ. Кроме того, выращивание арктических дрожжей необходимо вести при конкретных определенных условиях, что создает трудности при аппаратурном оформлении метода [17].

В патенте (RU 2186105) говорится о том, что возможно сократить время синтеза меланина путем проведения культивирование штамма дрожжей *Saccharomyces neoformans var. nigricans* ГСП – ТБ 17 Д на углесодержащих средах. Процесс проводят при 27–35° С и pH культуральной жидкости 4.5–5.5 в условиях аэрации и перемешивании. Полученную биомассу отделяют от культуральной жидкости с последующим выделением целевого продукта [18].

Бактерия *Bacillus thuringiensis* является продуцентом меланина. Оптимальная температура при культивировании 30–32 °С. Оптимум значений pH колеблется в диапазоне от 7.3 до 7.8. При изменении температуры и кислотности среды, даже на небольшие значения, наблюдается заметное снижение выхода целевого продукта.

В Тверском государственном техническом университете были проведены исследования процесса синтеза меланина штаммом Bacillus subtilis ВКПМ В-10040. Произведен выбор среды и оптимизированы условия культивирования, влияющие на выход меланиновых веществ. Выявлено, что меланиновые вещества образуются в присутствии кислорода, при температуре культивирования микроорганизмов 30 ºС. В образовании меланина участвует изомер L-тирозин, оптимальной концентрацией L-тирозина для максимального выхода меланина служит концентрация 9 г/л. Максимальный выход меланина происходит на 3 сутки роста культуры и составляет 2г/л. Были проведены физико-химические методы исследования меланина, полученного с помощью штамма Bacillussubtilis ВКПМ В-10040. При спектрофотометрическом анализе наблюдалось поглощение света в ультрафиолете и видимом диапазоне длин волн, являющейся характеристикой меланинов. По результатам рентгенофотоэлектронной спектроскопии и ЯМР установлено, что выделенный микробный меланин относится к эумеланинам.

Таким образом, меланин можно получать различными способами и из различных природных источников. При этом свойства полученного продукта зависят от ферментативной активности объекта, синтезирующего меланин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лях, С.П. Астромеланин / С.П. Лях, М.Л. Булгак, А.Г. Исаев // М. – 2007. – 167 с.

2. Некрасов Р.В. Меланиновая белково-энергетическая добавка из личинок Hermetia illucens в питании телят / Р.В. Некрасов, А.А. Зеленченкова, М.Г. Чабаев, Н.А. Ушакова // Современная биология. -2018. – Т.53. – № 2. – С. 374–384.

3. Погарская Н.В. Технология получения хитозан-меланинового комплекса из подмора пчел и его применение в ветеринарии и медицине. – Ставрополь: АГРУС. – 2013. – 120 с.

4. Сухомлин А.А. Влияние меланина на активность NO-эргической системы в слюнных железах в условиях гипергастринемии // А.А. Сухомлин, К.С. Непорада, Т.В. Береговая // Мир медицины и биологии. – 2014. – 1(43). – 149–152 с.

5. Борщевская М.И., Васильева С.М. Развитие представлений о биохимии и фармакологии меланиновых пигментов // Вопросы медицинской химии. – 1999. – 45, № 1. – С. 47–53.

6. Тугай Т.И. Влияние пролонгированного действия ионизирующего излучения на активность полифенолоксидазы и тирозиназы и на синтез меланина у Hormoconis resinae / Т.И. Тунай и др. // ЯДЕРНА ФІЗИКА ТА ЕНЕРГЕТИКА – № 2 (18). – 2006.-с. 82–87.

7. Заявка на патент № 2019108130/04(015692) Способ комплексной переработки продуктов жизнедеятельности Galleria mellonella, заявл. 21.03.2019

8. Пат. 2215761 РФ, МПК С09 В 61/00. Способ получения пигмента-красителя из растительного сырья/ Б.Н. Огарков, Л.В. Самусенок, заявл. 10.06.2002, опубл. 10.11.2003.

9. Zou, Y. Optimization of extraction conditions of melanin from black tea leaves using response surface methodology / Y. Zou*, Y. Wu, M. Tian // BioTechnology: An Indian Journal. – 2015. – № 7. – С. 269–273

10. Скорбина Е.А. Разработка технологии получения и исследование биологической активности меланинсодержащих препаратов: канд. дисс. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук. – Ставрополь, 2005. – 137 с.

11. Łopusiewicz, Ł. Antioxidant, antibacterial properties and the light barrier assessment of raw and purified melanins isolated from Citrullus lanatus (watermelon) seeds / Ł. Łopusiewicz // Herba Polonica. – 2018. – № 2. – С. 25–36

12. Zeng-Yu, Yao Comparison of Antioxidant Activities of Melanin Fractions from Chestnut Shell [Электронныйресурс] / Yao Zeng-Yu, Qi Jian-Hua – Molecule – 2016. – Режимдоступа: https://www.mdpi.com/1420–3049/21/4/487/htm#B21-molecules-21–00487

13. Xiuyun, X. Isolation and characterization of melanin from palm fiber [Электронныйресурс] / X. Xiuyun, J. Zhang, L. Cheng, L. Xingxing – Journal of Natural Fibers– 2018. – Режимдоступа: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15440478.2018.1434850

14. Патент 2017142514/05.12.2017Способ получения меланиновых веществ из лузги подсолнечника // Патент Росии № 2665166, 2018, Бюл. № 25 / Е.А. Прутенская, М.Г. Сульман, А.С. Васильев, Б.Б. Тихонов, М.Д. Мельничук, В.П. Молчанов

15. Грачева Н.В. Физико-химические свойства меланинов лузги подсолнечника/ Н.В. Грачева, В.Ф. Желтобрюхов, В.Ф. Каблов // Сборник материалов второй Всероссийской научно-практической Интернет-конференции с международным участием «Структура и физико-химические свойства целлюлоз и нанокомпозитов на их основе». – 2016.-с. 19–22.

16. Пат. 5057 BU, МПК C12N 1/14. Штамм гриба Aspergillusniger для производства меланина / В.М. Царенков. – № 19990980/99, заявл. 1999.11.01, опубл. 2003.03.30.

17. Пат. 2278163 РФ, МПК C12P 17/10, C12N 1/16. Способ получения меланина / А.Ч. Бабаевна. – № 2004127970/13, заявл. 22.09.2004, опубл. 10.03.06, Бюл. № 17

18. Пат. 2186105 РФ, МПК C12N 1/14, C12P 13/00, C12N 1/14, C12R 1/85. Способ микробиологического получения меланина / З.Н. Робышева. – № 2000124690/13, заявл. 02.10.2000, опубл. 27.07.2002 Бюл. № 21

УДК 581.143

ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ *ASTRAGALUS LEHMANNIANUS*, ПРОДУЦЕНТА ЦИКЛОАРТАНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ

Р.П. Закирова, М.А. Агзамова, Э.А. Эшбакова

Институт химии растительных веществ им. акад. С.Ю. Юнусова АН РУз, г. Ташкент, Республика Узбекистан

Высшие растения являются источником биологически активных соединений, которые широко используются в фармакологии, парфюмерии и пищевой промышленности. Бесконтрольное использование растительного сырья привело к стремительному сокращению их естественных запасов. Многие растения, представляющие практический интерес относятся к эндемичным или редким видам.

Род *Astragalus* L. семейства Fabaceae – крупнейший род цветковых растений, насчитывающий более 2500 видов мировой флоры. На территории Республики Узбекистан произрастает 254 вида этого растения [1]. Растения этого рода являются источниками циклоартановых соединений. Вещества обладают широким спектром физиологической активности [2, 3].

Astragalus lehmannianus Bunge (сем. Leguminosae) – многолетнее травянистое растение, произрастает на закрепленных песках на территории Каракалпакии на северо-западе Республики Узбекистан. Из надземной части растения изолировали циклоартановые соединения, названные циклолехманозидом С и циклолехманозидом А [4, 5].

В качестве источника биологически активных веществ перспективным является метод культивирования растительных клеток в условиях *in vitro*. Метод позволяет изучать физиологические и биохимические процессы, характерные для данного вида и органа растения, исследовать специфичность их гормональной регуляции.

Целью настоящей работы было разработать условия каллусообразования растения *Astragalus lehmannianus* и изучение его химического состава.

Растительный материал был собран в Каракалпакии вблизи г. Нукус в июле 2016 г.

Семена *A. lehmannianus* обрабатывали 70 % этанолом 3–5 сек., затем помещали в раствор 0,1 % диоцида на 15–20 минут, после чего промывали стерильной дистиллированной водой 4–5 раз, после чего высаживали их на питательную среду Мурасиге и Скуга с добавлением сахарозы 30 г./л, мезо-инозита 100 мг/л, тиамина HCl – 0.4 мг/л. агар-агара 0,75 %, без внесения регуляторов роста [6].

Семядоли и гипокотиль проростков разделяли на небольшие фрагменты и помещали на питательную среду. С целью индукции и поддержания каллусогенеза экспланты культивировали на питательной среде с добавлением ауксинов – α-нафтилуксусная кислота (НУК) и 2,4–дихлорфноксиуксусная кислота (2,4–Д) в концентрации 0,5 мг/л и цитокининов 6–бензиламинопурина (БАП) и 6-фурфуриламинопурина (кинетин) в 0,2 мг/л дозе.

Было выявлено, что формирование каллусов наблюдалось на всех вариантах, но более активно проходило на средах, содержащих 2,4–Д. В сочетании с кинетином частота каллусообразования для семядолей составляла 33,3 %, с БАП – 24,9 %, для гипокотилей, соответственно 26,6 % и 21,2 % (табл. 1).

Таблица 1. Влияние регуляторов роста на частоту каллусообразования *Astragalus lehmannianus*

Исходная часть проростка	Тип и концентрация фитогормонов, мг/л				Частота каллусообразования, %
	2,4–Д	НУК	Кинетин	БАП	
Семядоли	0,5	-	0,2	-	30,3
	0,5	-	-	0,2	24,9
	-	0,5	0,2	-	2,5
	-	0,5	-	0,2	1,7
Гипокотиль	0,5	-	0,2	-	26,6
	0,5	-	-	0,2	21,2
	-	0,5	0,2	-	2,2
	-	0,5	-	0,2	1,9

Приём материалов статей по адресу: actbio@mail.ru

На средах с НУК этот процесс проходил значительно слабее. Процент каллусообразования для семядольных эксплантов при добавлении кинетина составляло 2,5 %, при внесение БАП – 1,7 %, для гипокотилей, соответственно 2,2 % и 1,9 %. Клеточные культуры, полученные из двух типов эксплантов, практически не отличалась по морфологическим характеристикам: медленный рост каллуса, плотная структура, светло-зеленый цвет. При дальнейшем пассировании на свежие среды каллусы сохраняли невысокую скорость роста и плотную структуру, а к концу 4 недели приобретали красноватый цвет, говорящий о продуцировании клетками полифенольных соединений. Такой же процесс, но более интенсивно наблюдался при культивировании культуры тканей эндемичного растения *Astragalus babatagi*. Каллусы выделяли в питательную среду продукты фенольного окисления, что приводило к их гибели [7].

В настоящее время проводится сравнительный химический анализ генеративного растения и каллусных тканей *A. lehmannianus* методом ВЭЖХ. Первичные данные по качественному составу вторичных соединений показали, что биосинтез основных тритерпеновых соединений в условиях in vitro сохраняется.

ЛИТЕРАТУРА

Камелин Р.В. *Astragalus* L. – Астрагал. Определитель растений Средней Азии. Ташкент: Изд-во «Фан» – УзССР. 1981. Т. 6. 211 с.

Царук А.В., Искендеров Д.А., Агзамова М.А., Хушбактова З.А., Сыров В.Н., Исаев М.И. Выделение и изучение влияния циклоартановых гликозидов циклоорбикозида G и циклосиверсиозида А на метаболические процессы в миокарде крыс. Химико-фармацевтический журнал. Москва. 2010.V44. № 1. С. 12–15.

Хушматов Ш.С., Баратов К.А., Агзамова М.А., Иногамов У.К., Исаев И.М. The Cardiotonic Effects of Cycloartane Glycoside – Astragaloside VII. European Journal of Medicine. 2016. Series B.V.5. Is.1. P.18–25.

Жанибеков А.А., Наубеев Т.Х., Утениязов К.К., Бобакулов Х.М., Абдуллаев Н.Д. Тритерпеновые гликозиды *Astragalus* и их генины. Строение циклолехманозида С из *Astragalus lehmannianus*. Химия природных соединий. 2013. № 3, С405–406.

Жанибеков А.А., Наубеев Т.Х., Утениязов К.К., Бобакулов Х.М., Абдуллаев Н.Д. Строение циклехманозида А из *Astragalus lehmannianus*. Тезисы докладов Международного Симпозиума по химии природных соединений, 21–22 Ноябрь 2013, Ташкент-Бухара, Узбекистан.

Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 1962, 15(13): 473–497.

Закирова Р.П., Агзамова М.А., Исав И.М. Вестник Северо-Восточного федерального университета им. М.К. Аммосова. 2018, № 2 (68), с. 26–34.

УДК 63.636

ВЛИЯНИЕ ДОБАВКИ НА ОСНОВЕ АВТОЛИЗАТА САХАРОМИЦЕТОВ В СОСТАВЕ РЕЦЕПТУР ПРОДУКЦИОННЫХ КОРМОВ НА РОСТ ТИЛЯПИИ

А.С. Пырсиков, А.А. Соловьёв

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия

В современных условиях аквакультура приобретает особое значение как скороспелая и высокоэффективная отрасль животноводства. Отдельной задачей стоит организация выращивания рыбы на водоёмах охладителях электростанций и других промышленных предприятий. Известно, что на тёплых водах можно выращивать теплолюбивую рыбу [1]. Однако технологию такого рыборазведения необходимо дорабатывать по многим параметрам, включая подбор объектов разведения [3]. В этом отношении определённый интерес представляет тиляпия, известная своей неприхотливостью и сравнительно высокими товарными качествами [2].

Одной из важных проблем при решении этих задач является полноценное кормление тиляпий, выращивая их в не свойственных для них индустриальных условиях. При разработке рецептур комбикормов для тиляпии, как и для многих других ценных объектов аквакультуры, особое внимание в последнее время уделяется качественному составу комбикорма. Наряду с этим не достаточно хорошо разработана технология кормления, что часто приводит к нарушению переваримости кормов, а порой к патологическим явлениям. Перед рыбоводами стоит задача повышения усвоения корма рыбой, увеличение скорости роста рыб, а это возможно лишь с использованием качественных и полноценных комбикормов [4].

В условиях постоянного повышения цен на импортные комбикорма и недостаточную эффективность отечественных кормов использование биологически активных веществ при кормлении позволяет улучшать пищеварение и повышать усвоение кормов. Тем более, биологически активные вещества, содержащиеся в ферментационном белковом сырье, используются в качестве основы для мероприятий направленных на профилактику различных заболеваний и повышение резистентности организма животных, что аналогично имеет повышенный интерес в условиях интенсификации отрасли животноводства.

В качестве объекта исследования в работе использовали тиляпию – *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). Работа состояла из двух этапов, в первом начальная масса рыб составляла 2 г, во втором – 50 г. Молодь тиляпии по вариантам опытов выращивали в установках с замкнутым водообеспечением (УЗВ) при одинаковой плотности посадки, в первом опыте – 90 суток, а во втором – 60 суток. Условия выращивания поддерживались на одинаковом уровне, в течении всего эксперимента. Из молоди тиляпии, как первом, так и во втором этапах опыта, были сформированы 4 группы, одинаковые по количеству особей и их индивидуальной массе. Кормление рыб осуществляли вручную 2 раза в день в светлое время суток. В первом опыте тиляпиям скармливали низкопротеиновый комбикорм рецепта К-111, а во втором – высокопротеиновый комбикорм рецепта АК-1ФП. Первая группа была контрольной, во второй, третьей и четвёртой группах к основному рациону вносили 1–3 % добавки автолизата сахаромицетов, от основного количества рациона. Исследуемая добавка приготовлена методом автолиза по индивидуально разработанной технологии, в своём составе не содержит химических и токсичных компонентов, приводит к нормализации состава межклеточной жидкости, клеток всех органов животного, в её состав входят комплекс витаминов, углеводов, макро – и микроэлементы, которые являются кофакторами ферментов, а также незаменимые аминокислоты. Во время эксперимента через каждые 10 дней с момента запуска тиляпии в бассейны проводились бонитировки и контрольные взвешивания.

В конце эксперимента для оценки эффективности влияния автолизата на рост рыб проведены детальные измерения экстерьерно – интерьерных показателей, оценена эффективность влияния добавки на рацион и скорость роста тиляпий.

По результатам первого опыта наблюдения за поведением тиляпии показали, что добавка в составе используемых кормов оказывает определенное влияние на поведение и рост рыб. При одном и том же количестве внесённого рыбе корма наиболее интенсивно он потреблялся в вариантах опыта, в которых содержался автолизат. В опытных вариантах рыбы были более активными, они приобрели более яркую светлую окраску по сравнению со сверстниками из контрольного варианта. Наряду с этим установлено, что при введение в основной рацион тиляпии добавки скорость их роста увеличилась (табл. 1).

Таблица 1 – Результаты опыта при кормлении тиляпии комбикормом рецепта К-111 с автолизатом сахаромицетов

Показатели:	Вариант опыта:			
	Вариант 1 (контроль)	Вариант 2 (1 % автолизата)	Вариант 3 (3 % автолизата)	Вариант 4 (5 % автолизата)
Начальная масса рыб, г	1,93 ± 0,11	1,93 ± 0,08	1,92 ± 0,08	1,93± 0,07
Конечная масса рыб, г	14,54 ± 0,65	16,54 ± 0,48*	19,33 ± 0,56*	19,37 ± 0,68*
Общий прирост массы рыб, г	630,46	730,38	870,44	872,04
Индивидуальный прирост массы рыб, г	12,61	14,61	17,41	17,44
Среднесуточный прирост, г/сут.	0,14	0,16	0,19	0,19
Относительная скорость роста, %	153,12	158,20	163,85	163,75
Затраты корма, кг/кг	2,33	2,06	2,04	1,98
Затраты протеина, г/кг	535,9	473,8	469,2	455,4
Примечание: * – различия достоверны при $p < 0,05$				

Во втором этапе опыта с комбикормом марки АК-1ФП, были получены следующие рыбоводные результаты (табл. 2).

Таблица 2 – Результаты опыта при кормлении тиляпии комбикормом рецепта АК-1ФП с автолизатом сахаромицетов

Показатели:	Вариант опыта:			
	Вариант 1 (контроль)	Вариант 2 (1 % автолизата)	Вариант 3 (3 % автолизата)	Вариант 4 (5 % автолизата)
Начальная индивидуальная масса рыб, г	48,60 ± 3,63	48,75 ± 3,94	48, 21 ± 4,47	47,93 ± 4,04
Конечная индивидуальная масса рыб, г	143,43 ± 4,69	145,31 ± 4.43	160, 85 ± 3,91*	146,06 ± 5,75
Общий прирост массы рыб, г	2844,9	2896,8	3379,4	2943,9
Индивидуальный прирост массы рыб, г	94,83	96,56	112,64	98,13
Среднесуточный прирост, г/сут.	1,58	1,60	1,87	1,63
Относительная скорость роста, %	98,76	99,51	107,75	101,17
Затраты корма, кг/кг	1,53	1,51	1,28	1,46
Затраты протеина, г/кг	688,5	679,5	576	657
Примечание: * – различия достоверны при $p < 0,05$				

Одним из самых важных рыбоводческих показателей является показатель затрат корма. Так показатель затрат корма, продемонстрировал значительно лучшие результаты в третьем варианте и составил 1,28 кг корма на кг прироста, что лучше по сравнению с контрольным вариантом на 16,3 %, затраты корма во втором варианте меньше первого на 1,3 %. В четвёртом варианте конечный результат затрат корма на 4,6 % ниже контроля, что показывает практически такой же результат, как в первом и втором вариантах, но значительно увеличивает объём добавки.

Реализованные исследования включают решение таких актуальных проблем, как разработка новых рецептур комбикормов, содержащих в своем составе высокоэффективные биологически активные вещества.

Результаты исследований могут быть использованы для усовершенствования рецептур при производстве отечественных комбикормов, используемых при выращивании тиляпии в УЗВ.

ЛИТЕРАТУРА

Плиева Т.Х., Тетдоев В.В. Новый объект отечественного рыбоводства – тиляпия. Вестник РГАЗУ, 2009. С. 81–83.

Привезенцев Ю.А. Тиляпии (систематика, биология, хозяйственное использование). – М.: Столичная типография, 2008. – 79 с.

Жигин А.В. Замкнутые системы в аквакультуре. – М.: 2011. – С. 14–72.

Щербина М.А., Гамыкин Е.А. Кормление рыб в пресноводной аквакультуре. – М.: Издательство ВНИРО, 2006. С. 360–367.

УДК 290532

ДЕЙСТВИЕ УФ-ЛУЧЕЙ НА ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПРОДУЦЕНТА *ЛЕВАНАА. VINELANDII* ШТАММА Д-08 ПО МОРФОЛОГО-КУЛЬТУРАЛЬНЫМ ПРИЗНАКАМ И АКТИВНОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ ПОЛИСАХАРИДА

Н.А. Ракова, Н.В. Новокупцев

МГУ им. Н.П. Огарёва» факультет биотехнологии и биологии, Саранск, Россия

За последние годы широкое применение находят микробные полисахариды. Из них особая роль принадлежит полисахариду левану. Он представляет собой водорастворимый углеводный полимер, способный образовывать вязкие опалесцирующие растворы как в воде, так и масле из-за его β – (2,6) связей [1]. Запутанные ветви в структуре левана способствуют когезионной прочности, а большое количество гидроксильных групп помогает формировать адгезионные связи с различными субстратами [2]. Сухие клеи левана могут быть легко удалены водой. При добавлении пластификаторов леван также способен образовать гибкую, полупрозрачную и водостойкую пленку [4]. Не цитотоксичен. Не вызывает раздражение и аллергические реакции.

В настоящее время обнаружено, что данный полимер способны синтезировать многие микроорганизмы, из них наиболее известны: *Azotobactervinelandii, Bacillussubtilis, Aerobacterlevanicum, Paenibacilluspolymyxa, Zymomonasmobilis*.

A. vinelandii впервые был описан в 1903 году Липманом. Бактерии рода *Azotobacter* относятся к 4 группе по классификации Берджи – грамотрицательные аэробные палочки и кокки. *БактериuA. vinelandii* штамма *Д-08* при глубинном культивировании на сахарозосодержащих средах образуют значительные количества полисахарида левана, который представлен как в виде капсул, окружающих бактериальные клетки, так и в виде слизи, распространяющейся в питательной среде [1].

Актуальной задачей является повышение продуктивности бактерий *A. vinelandiiД-08*, в связи с расширением сфер использования микробного левана. Как правило, штаммы микроорганизмов, выделенные из природных источников, не способны к синтезу сверхвысоких количеств углеводов.

Исходя из этого, целью работы было получение новых *штаммовA. vinelandiic* повышенным синтезом полисахарида левана под воздействием физического мутагена, в частности ультрафиолета.

В представленной работе мы провели индуцированный мутагенез ультрафиолетом и оценивали эффект ультрафиолетового излучения по выходу полисахарида левана.

Мы готовили суспензию клеток *A. vinelandiiД-08* переносом колонии бактерий в пробирки со стерильной водой и тщательно перемешивали. По 4 мл суспензии разливали в стерильные чашки Петри и помещали в камеру УФ-облучения CL – 1000 с дозой облучения 100 мкДж/см^2, время экспозиции: 10, 30 и 60 с.

Далее контрольные и облученные клетки *A. vinelandiiв* объеме 0,1 мл высевали на чашки Петри с агаризованной средой следующего состава, (г/л): K_2 HPO_4 – 0,8; KH_2 PO_4 – 0,2; $CaSO_4{\times}7H_2$ O – 0,2; $MgSO_4{\times}7$ H_2 O – 0,2; Na_2 MnO_4 – 0,05; $FeCl_3$ – 0,05; дрожжевой экстракт – 0,5; сахароза – 20,0; агар – агар – 20,0. Инкубировали в термостате при 28 °С трое суток. Подсчитывали выросшие колоний и пересевали в биологические пробирки со скошенной агаризованной средой.

Для получения инокулята бактерий *A. vinelandiiД-08* готовили питательную среду того же состава, только без агара. pH в пределах 6,8–7,2. Стерильной средой смывали *A. vinelandiico* скошенного питательного агара и культивировали в течении суток в термостатируемом шейкере при 250 об/мин.

Дальнейшее культивирование исходного и мутантного штамма бактерий проводили на сахарозной среде в аналогичных условиях. На третьи сутки в полученной культуральной жидкости определяли pH, содержание левана и биомассу *A. vinelandii Д-08*.

Водородный показатель измеряли потенциометрическим методом, количество биомассы – гравиметрическим методом, а количество полисахарида левана методом осаждения.

В контрольном варианте на третьи сутки мы наблюдали сплошной агаризованный рост *A. vinelandii Д-08*, местами переходящий в единичные колонии. При обработке 60 с роста культуры обнаружено не было. При обработке бактерий 10 и 30 с получили единичные колонии, выживаемость клеток составила 28 и 16 % соответственно.

Клетки молодых культур (вплоть до 2-х суток культивирования) имеют форму палочек с закругленными концами, чаще расположены попарно [3]. После обработки появляются шаровидные формы, увеличивается формирование цист.

При проведении эксперимента произошел резкий сдвиг pH в кислую сторону, относительно исходного значения. Это свидетельствует об интенсивном процессе выделения кислоты, накопления продуктов метаболизма бактерий. Расхождения pH между контрольными облученным штаммом несущественны.

Увеличение времени экспозиции облучения бактерий ультрафиолетом благоприятно повлияло на выход полисахарида. Максимальный выход левананаблюдается в мутантных вариантахбактерий *A. vinelandii Д*-08 со временем экспозиции 30 с. и составил 18, 87 ± 0,46 г./л, при этом содержание биомассы 5,26 ± 0,18 г./л. В контрольном варианте обнаружено 15,58 ± 0,67 г./л левана и 3,56 ± 0,24 г./л биомассы.

Таким образом, при обработке культуры бактерий *A. vinelandiiД*-08 получены мутантные варианты, отличающиеся от исходной культуры повышенным синтезом микробного полисахарида левана.

ЛИТЕРАТУРА

1 Лияськина Е.В. Биотехнология бактериальных полисахаридов: учебное пособие / Е.В. Лияськина, В.В. Ревин, В.М. Грошев и др. – Саранск: Мордовский гос. Ун-т, 2010. – 120 с.

2Ревин В.В. Биокомпозиционные материалы на основе ультрадисперсных частиц древесины и левана, полученного путем микробного биосинтеза *Azotobactervinelandii Д-08* / В.В. Ревин, В.В. Шутова, Н.В. Новокупцев // Фундаментальные Исследования. – 2016. – № 1. – С. 53–57.

3Díaz-Barrera A. Production of alginate by Azotobacter vinelandii grown at two bioreactor scales under oxygen-limited conditions / A. Díaz-Barrera, J. Gutierrez, F. Martínez [et al.] // Bioprocess Biosyst. Eng. – 2014. – V. 37, № 2. – P. 1128–1133.

4 Kang N.K. Levan: Applications and perspectives. Microbial production of biopolymers and polymer precursors / N.K. Kang, M.Y. Seo, E.S. Seo [et al.] // Caister Academic. – 2009. – V. 40. – P. 25–30.

УДК 576.85:663.1

СОСТАВ БИОМАМАССЫ ОБЛИГАТНОГО МЕТИЛОТРОФА METHYLOBACILLUSMETHANOLIVORANS

Н.В. Доронина, Е.Н. Капаруллина

Пущинский научный центр биологических исследований РАН, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Пущино, Россия

Изучали состав биомассы метилотрофа *Methylobacillus methanolivorans* (VKM B-3037^T = JCM 31401^T = CCUG 68999^T), использующего метанол в качестве источника углерода и энергии. Определены удельная скорость роста (μ_{max}, 0.5 $ч^{-1}$), экономический коэффициент (Y, 0.46), элементный состав, содержание белка (70.9 %) и лизина (5.6 %), жирнокислотный состав ($C_{16:0}$ – 42.5 % и $C_{16:1}$ – 26.7 % от общего содержания жирных кислот), суммарное количество нуклеиновых кислот (13.2 %), перевариваемость протеолитическими ферментами *in vitro* (97.1 %). Полученные результаты позволяют заключить, что по этим показателям исследуемый метилотроф перспективен как продуцент кормового белка.

ВВЕДЕНИЕ

Микробиологический синтез белка одноклеточных является эффективным путем восполнения дефицита белковых веществ. Он не зависит от природных условий и позволяет превращать различные виды непищевого сырья в белковые вещества и другие ценные продукты. Большой интерес для производства белка одноклеточных представляют метилотрофные бактерии, использующие метанол-сырец в качестве источника углерода и энергии.

Цель данной работы – изучение ростовых характеристик, состава биомассы и ее перевариваемости у облигатного метилотрофа при росте на метаноле.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования *Mb. methanolivorans* (VKM B-3037^T = JCM 31401^T = CCUG 68999^T) выделен нами ранее из активного ила [1]. Культивирование штамма проводили в колбах на среде «К» с 0.5 % метанола на качалке (150 об/мин) при температуре 29 °С либо в ферментере Анкум-2М объемом 1 л при 30 °С, pO2 (35–45 %), pH (7.0–7.2). Удельную скорость роста μ штамма и экономический коэффициент Y использования метанола рассчитывали по формулам [2]. Концентрацию клеток определяли спектрофотометрически при 570 нм на Specol221 (Германия) с последующим пересчетом на вес сухой биомассы по калибровочной кривой, а также весовым методом после фильтрования определенного объема бактериальной суспензии через мембранные фильтры Сынпор (Чехия, d = 0.3 мкм). До и после фильтрации фильтры промывали дистиллированной водой и высушивали при 105 °С до постоянного веса. Для определения элементного и аминокислотного состава клетки культуры из экспоненциальной фазы роста центрифугировали (Beckman J2–21, 10000g, 10 мин.), отмывали бидистиллированной водой. Полученную биомассу лиофильно высушивали и определяли суммарное количество нуклеиновых кислот [3]. Содержание углерода, водорода и азота – на газовом анализаторе CHN1 Rovo (Чехия), фосфора – методом Дениже [4], микроэлементы на атомно-абсорбционном анализаторе AAC-518 (Hitachi, Япония) [5]. Для определения аминокислотного состава клетки гидролизовали, подкисляли и гидролизаты пропускали через автоматический анализатор аминокислот 3AA-881 (Чехия). Жирнокислотный состав клеток штамма и перевариваемость его клеток определяли описанными ранее методами [1, 6]. Растворенный и общий азот клеток определяли по Кьельдалю [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследуемый метилотроф реализует рибулозомонофосфатный путь С1-метаболизма [1]. При росте на метаноле *Mb. methanolivorans* VKM B-3037^T имеет высокую скорость роста (μmax, 0.5 ч$^{-1}$) и экономический коэффициент (Y, 0.46), а при непрерывном культивировании скорость разбавления питательной среды D, 0.25 ч$^{-1}$. В табл. 1 представлен элементный состав биомассы исследуемого штамма.

Таблица 1. Элементный состав *Mb. methanolivorans* VKM B-3037^T, % от веса сухой биомассы

C	H	N	P	Ca	Mg	K	Na	Fe	Mn	Zn	Cu	Зола
46.1	6.4	11.4	2.6	0	0.3	0.5	0.4	0.2	0.01	0.01	0.01	6.5

Важным показателем биологической ценности микробной биомассы является аминокислотный состав и содержание белка. Биомасса исследуемого штамма характеризуется достаточно высоким содержанием белка и незаменимых аминокислот (табл. 2).

Таблица 2. Аминокислотный состав и содержание белка у *Mb. methanolivorans* VKM B-3037^T

Аминокислота	% от веса сухой биомассы
Лизин*	5.6
Гистидин	1.4
Аргинин	4.6
Аспарагиновая	7.6
Треонин	3.7
Серин	2.7
Глутаминовая	8.9
Пролин	2.7
Глицин	4.5
Аланин	6.1
Валин	4.9
Метионин	1.9
Изолейцин	3.9
Лейцин	6.9
Тирозин	2.3
Фенилаланин	3.2
Сумма (белок)	70.9
* – незаменимые аминокислоты выдлены жирным шрифтом	

По составу и количеству аминокислот она сопоставима с рыбной и соевой мукой [8], что свидетельствует о ее питательной ценности. В аминокислотном составе доминировали лизин, лейцин (незаменимые), а также аланин, аспарагиновая и глутаминовая аминокислоты. Содержание нуклеиновых кислот у изучаемого метилотрофа составило 13.2 %. В составе жирных кислот (ЖК) *Mb. methanolivorans* преобладают $C_{16:0}$ и $C_{16:1}$ (табл. 3).

Таблица 3. Жирнокислотный состав биомассы *Mb. methanolivorans* VKM B-3037^T

Кислота	**$C_{16:0}$**	**$C_{16:1}$**	**$C_{17:0}$**	**$C_{18:0}$**	**$C_{18:1}$**	**$C_{19:0cyc}$**
% от общего содержания ЖК	45.7	26.7	1.6	1.3	6.7	0.4

Следовательно, биомасса изучаемого метилотрофа содержит высокий уровень жирных кислот, характерных для обычных пищевых продуктов. Определение степени перевариваемости изучаемого штамма в 97.1 % показало, что клетки *Mb. methanolivorans* VKM B-3037^T хорошо расщепляются под действием протеолитических ферментов. Таким образом, результаты проведенных исследований показывают, что метилотроф *Mb. methanolivorans* VKM B-3037^T перспективен по ряду показателей для культивирования и получения кормового белка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kaparullina E.N., Trotsenko Y.A., Doronina N.V. *Methylobacillus methanolivorans* sp. nov., a novel non-pigmented obligately methylotrophic bacterium // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V.67. P. 425–431.
2. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир. 1978. С. 17.
3. Спирин А.С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот // Биохим. 1958. Т.23. № 5. С. 656–662.
4. Баславская С.С., Трубецкова О.М. Практикум по физиологии растений. М.: МГУ. 1964. С. 230.
5. Славин У. Атомно-абсорбционная спектроскопия. Л.: Химия. 1971. С. 150.
6. Альбицкая О.Н., Зайцева Г.Н., Рогожин С.В. и др. Характеристика белкового продукта из биомассы *Spirulina platensis* // Прикл. Биохим. Микробиол. 1979. Т.15. № 5. С. 751.
7. Методы биохимического исследования растений/ Под.ред. Ермаковой А.И.Л.: Колос. 1972. С. 267.
8. Klass D.L., Iandolo J.J., Knabel S.J. Key process factors in the conversion of methane to protein //Chem. Engng Prog. Symp. Ser. 1969. V. 93. P. 65–72.

УДК 66.047

УВЕЛИЧЕНИЕ ПРОДУКЦИИ L-ТРЕОНИНА ШТАММАМИ *ESCHERICHIA COLI* ПУТЁМ ЭКСПРЕССИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ ЦИТРАМАЛАТСИНТАЗЫ

Т.В. Выборная, Д.М. Бубнов, С.С. Филиппова, С.П. Синеокий

НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, Москва, 117545

Целью представленной работы было конструирование штамма *Eschirichia coli*, отличающегося высокой продуктивностью L-треонина (треонина). Важнейшей задачей при конструировании штаммов продуцентов является инактивация путей деградации целевого продукта. На сегодняшний день известны три пути деградации треонина в клетках *E. coli*, осуществляемые группами ферментов: треониндегидрогеназами, треонинальдолазами и треониндеаминазами. Главную роль в деградации треонина играет треониндегидрогеназа, кодируемая геном *tdh*. Показано, что инактивация гена оказывает положительный эффект на продукцию треонина [1], [2]. Предположительно существует еще один ген, кодирующий НАД-зависимую треониндегидрогеназу, *yiaY* [3]. В литературе встречаются противоречивые данные о фенотипе штаммов с делецией по гену *yiaY* [3, 4]. Инактивация гена *ltaE*, кодирующего треонинальдолазу, также приводит к увеличению продукции треонина [5]. Активностью треонинальдолазы обладает фермент серингидроксиметилтрасфераза, кодируемый геном *glyA* [6]. Однако инактивировать *glyA* в штамме продуценте нецелесообразно, так как в отсутствии GlyA штамм становится ауксотрофом по глицину [7]. В клетках *E. coli* синтезируются две треониндеаминазы, кодируемыми генами треониндеаминазы, *ilvA* и *tdcB*. Делеция гена *tdcB* способствует повышению продукции треонина так же, как и инактивация других генов пути деградации треонина [8].

С целью повышения уровня продукции треонина мы предложили инактивировать все возможные пути деградации аминокислоты, а именно конструировать штамм, несущий делеции *Δtdh, ΔyiaY, ΔltaE, ΔtdcB, ΔilvA*. Штамм, несущий указанные делеции, не способен катаболизировать треонин, однако он также не способен синтезировать изолейцин. Для восстановления прототрофности по изолейцину без потери конверсии треонина было предложено экспрессировать в штамме продуценте гетерологичный ген *cimA* из *Leptospira interrogans*, кодирующий цитрамалатсинтазу [9]. CimA осуществляет реакцию превращения пирувата в цитрамалат. Несмотря на то, что в клетках *E. coli* данный фермент не синтезируется, цитрамалат может быть превращен в альфа-кетобутират ферментами изопропилмалатизомеразой и изопропилмалатдегидрогеназой, кодируемыми генами биосинтеза пути лейцина, *leuCD u leuB*, соответственно. Далее из альфа-кетобутирата синтезируется изолейцин. Таким образом, посредством экспрессии гетерологичного гена *cimA L. interrogans* в клетках *E. coli*, несущих делецию Δ*ilvA*, изолейцин синтезируется по альтернативному пути, не из треонина, а из пирувата.

Конструирование высокопродуктивного штамма проводили на основе ранее разработанного в ГосНИИгенетика штамма *E. coli* B-632 [10]. После введения в геном делеции гена *ilvA* результирующий штамм B926 накапливал треонин на 25 % выше по сравнению с родительским в условиях пробирочной ферментации 14,4 и 11,5 г/л, соответственно. Экспрессию гена *cimA* в хромосоме проводили как под регуляцией конститутивного, так и регулируемого промоторов. С целью подбора оптимального уровня экспрессии гена *cimA* была разработана система для индуцируемой экспрессии генов на основе промотора $P_{LtetO-1}$. Данная система является универсальной и не требует специальной подготовки штамма.

Регуляция экспрессии целевого гена происходит посредством добавления в среду индуктора, ангидротетрациклина(АТс). По результатам ряда ферментаций проведен подбор концентрации индуктора, при которой достигается максимальная продукция треонина, а именно свыше 100 г./л при концентрации АТс 25 нг/мл в ферментере. В данных условиях штамм обнаруживает максимальную конверсию глюкозы в треонин, равную 45 %. Показано, что при увеличении уровня сверхэкспрессия гена *cimA* приводит к увеличению уровня компенсации ауксотрофности и переключению метаболизма с синтеза треонина на синтез биомассы.

В представленной работе продемонстрирована возможность использования альтернативного пути синтеза изолейцина в штаммах *E. coli* продуцентах треонина. Дальнейшее развитие работы предполагает скрининг ферментов цитрамалатсинтаз из различных источников и направленную модификацию ферментов с целью уменьшения сродства к пирувату, а также подбор конститутивных промоторов с оптимальным уровнем экспрессии, обеспечивающих, максимальное накопление треонина в ферментационной среде.

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта – RFMEFI61017x0011) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биндер Т.П, Брэдшоу Д.С., Ванг М.Д. Лио Х.Д. Свишер С.Л., Хэнк П.Д. Штамм микроорганизма Escherichia coli – продуцент L-треонина, способ получения продуцирующего L-треонин штамма E.coli и способ получения L-треонина (варианты). Патент РФ RU2212448

2. Lee K.H., Park J.H., Kim T.Y., et al. Systems metabolic engineering of Escherichia coli for L-threonine production. Molecular systems biology. 2007, 3 (1), 1349.

3. Ma F., Wang T., Ma X., et al. Identification and characterization of protein encoded by orf382 as L-threonine dehydrogenase. J Microbiol Biotechnol. 2014, 24. 748–755.

4. Baba T., Ara T., Hasegawa M., et al. Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. Molecular systems biology. 2006, 2 (1).

5. Рыбак К.В., Сливинская Е.А, Саврасова Е.А, Казиева Е.Д., Ахвердян В.З. Способ получения L-треонина с использованием бактерии, принадлежащей к роду Escherichia, в которой инактивирован ген ltaE. Патент РФ RU2304166, C12N1/21, C12P13/08, C12R1/19 2007.

6. Schirch L.V., Gross T. Serine transhydroxymethylase identification as the threonine and allothreonine aldolases. Journal of Biological Chemistry. 1968, 243 (21), 5651–5655.

7. Pizer L.I. Glycine synthesis and metabolism in Escherichia coli. Journal of bacteriology. 1965, 89 (4), 1145–1150.

8. Пак, Д.У., Ли, Б.Ч., Ким, Д.Ч., Ли, Д.Х., Чо, Д.У., Пак, У.Х. Способ получения L-треонина. Патент РФ RU2288265

9. Xu H., Zhang Y., Guo X., et al. Isoleucine biosynthesis in Leptospira interrogans serotype lai strain 56601 proceeds via a threonine-independent pathway. Journal of bacteriology. 2004, 186 (16), 5400–5409.

10. Т.В. Выборная, Т.В. Юзбашев, А.С. Федоров и др. Использование альтернативного пути синтеза изолейцина в штаммах *Escherichia coli* продуцентах треонина. Биотехнология. 2019, 35(4)

УДК 579.222

УВЕЛИЧЕНИЕ ВЫХОДА L-ТРЕОНИНА В ПРОЦЕССЕ БИОСИНТЕЗА ШТАММАМИ *ESCHERICHIA COLI* ПУТЁМ РЕГУЛИРОВАНИЯ АКТИВНОСТИ 4-ГИДРОКСИ-ТЕТРАГИДРОДИПИКОЛИНАТСИНТАЗЫ

С.С. Филиппова, Д.М. Бубнов, Т.В. Выборная, С.П. Синеокий

НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, Москва, Россия

L-треонин является ценной пищевой добавкой в животноводстве и птицеводстве. Мировое производство L-треонина основано на микробиологическом методе синтеза. Главным компонентом, от которого зависит эффективность производства L-треонина, является штамм-продуцент, на основе него разрабатывается технология микробной ферментации. Безусловными лидерами по продуктивности оказались штаммы *Escherichia coli* благодаря своей всесторонней изученности и широкому спектру молекулярных инструментов, доступных для введения направленных модификаций.

Для создания промышленного штамма-продуцента L-треонина требуется методами генной инженерии осуществить глубокую реконструкцию метаболических путей. Помимо модификации метаболических путей актуальной проблемой является накопление биомассы культуры продуцента. Очевидно, что синтез биомассы и целевого продукта являются конкурирующими процессами, которые потребляют поступающие питательные соединения. С другой стороны, от массы клеток зависит скорость синтеза, то есть продуктивность штамма. Поэтому, в промышленной ферментации уровень биомассы должен быть ограничен на минимальном уровне, достаточном для обеспечения необходимой скорости синтеза. Таким образом достигается наивысшая конверсия используемого источника углерода и энергии в конечный продукт.

Среди методов снижения накопления биомассы можно выделить создание лимитирующих условий по соединениям необходимым для роста культуры штамма, например по аминокислотам. Однако этот подход обладает существенным недостатком – продуктивность культуры зависит от состава питательной среды, в которую часто вносят компоненты, полученные из растительного, животного сырья или дрожжевой биомассы. Поэтому целесообразно использовать мутации, снижающие активность ферментов, участвующих в синтезе таких соединений которые необходимы для роста бактериальных клеток, но не встречаются в животных и растительных тканях.

Основываясь на этих рассуждениях, мы выбрали в качестве мишени ген *dapA*, который кодирует фермент 4-гидрокси-тетрагидродипиколинатсинтазу, осуществляющий первую стадию синтеза диаминопимелиновой кислоты. Диаминопимелат является непротеиногенной аминокислотой, входящей в состав пептидного мостика между слоями пептидогликана, компонента клеточной стенки бактерий, а также прекурсором лизина. Таким образом, лимитирование роста культуры по диаминопимелату приводит не только к дефекту синтеза клеточной стенки, но и к недостатку лизина. Поэтому дополнительным эффектом мутаций в гене *dapA* является активация «строгого ответа», который, как известно, приводит к усилению синтеза всех аминокислот.

Путем направленного мутагенеза гена *dapA* нам удалось отобрать клоны, способные расти без диаминопимелата, но нуждающиеся в нем для роста с максимальной скоростью. Такие клетки несут мутантные аллели гена *dapA*, кодирующего фермент со сниженной активностью. Проведя скрининг двухсот клонов, нам удалось отобрать шесть, которые обладали повышенным синтезом L-треонина при сохранении исходной скорости и пониженным уровнем накопления биомассы. Наиболее продуктивные клоны накапливали на 7–29,5 % больше L-треонина по сравнению с родительским штаммом. Таким образом, нам удалось найти новую мишень, введение мутаций в которую позволяет увеличить продукцию L-треонина и, возможно, других аминокислот.

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта – RFMEFI61017x0011) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.

УДК 579, 579.6

СВОЙСТВА УРОБАКТЕРИЙ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИХ ИНДУЦИРОВАННОЕ ОСАЖДЕНИЕ КАЛЬЦИЯ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ИХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ

Н.Б. Градова*, Чеканова Д.А*., М.Г. Семёнова[1]

** Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия*
[1]-Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля, РАН, Москва, Россия

Одним из инновационных направлений в развитии биотехнологии является разработка технологии использования биоминерализующих свойств микроорганизмов и, в частности, практическое использование уробактерий, способных к внеклеточному индуцированному осаждения кальция для улучшения качества строительных материалов и их восстановления. На основании изученных биохимических закономерностей способности уробактерий к повышению pH среды и осаждению присутствующего в окружающей среде кальция, в виде $CaCO_3$ в качестве основных критериев при отборе активных штаммов уробактерий исследователями используются показатели активности их роста на подобранных питательных средах, активности фермента уреазы, определяемой по повышению pH среды и способности к кальцинированию по визуальному определению образования твёрдой плёнки на колониях уробактерий при их культивировании на твёрдых средах. В наших исследованиях при использовании данных критериев из разных экологических и техногенных систем выделены активные штаммы уробактерий разных видов рода Bacillus. При этом показано, что не всегда состав питательной среды, обеспечивающий активность роста штамма, определяет и наибольшую активность фермента уреазы; показатель активности уреазы штаммов не всегда сопоставим с активностью индуцированного кальцинирования, что может быть связано с различным уровнем дзета потенциала отрицательно заряженных клеточных стенок разных штаммов уробактерий. Измерение дзета потенциала при использовании метода электрофоретического рассеяния света (ИСО13099:2–2012) разных штаммов уробактерий показало, что наиболее активные штаммы характеризуются низкозарядной поверхностью клеточной стенки менее 30мВ (показателя, принятого в качестве уровня определения высокого и низкого значения), 22–23 мВ. Отрицательно заряженные клетки уробактерий могут служить в качестве центров кристаллизации для осаждения $CaCO_3$, постепенно они заключаются в капсулу, что приводит к гибели клеток или переход в споровое состояние. Исходя из литературных данных и результатов собственных исследований для характеристики биотехнологического потенциала культур уробактерий, отобранных для практического использования, следует учитывать: систематическое определение; оптимальное значение pH среды и температуры культивирования; подбор состава среды, сбалансированно обеспечивающего и активность роста и ферментативную активность штамма; определение дзета потенциала клеточной стенки штамма; визуальное определение кальцинирования колоний. Не менее важное значение имеет определение отсутствия патогенных свойств культуры, учитывая имеющиеся патогенные уробактерии, вызывающие заболевание желудка человека и образование камней в почках.

УДК 328

DEVELOPMENT OF FUNCTIONAL FOODS FOR NUTRITION & HEALTH

Vandana Sanjeev Panda, Prin. K. M. Kundnani

College of Pharmacy Cuffe Parade

Functional foods are modified foods that can be considered to be those whole, fortified, enriched or enhanced foods that provide health benefits beyond the provision of essential nutrients (e.g., vitamins and minerals), when they are consumed at efficacious levels. Functional foods can be from plant sources or animal sources. A functional food is generally a food (not a capsule, tablet, or powder) derived from natural ingredients which can be consumed as part of the daily diet. It has a particular function when eaten, serving to enhance biological defense mechanisms, prevent specific diseases, aid in recovery from specific diseases, control physical and mental disorders and slow the aging process.

Our Pharmacology laboratory at KMK College of Pharmacy, University of Mumbai has been involved in formulation of functional foods for many health benefits. A few of the functional foods include spinach extract for anti-obesity, horse gram curry powder for hepatoprotective,, anti-hyperlipiemic and cardioprotective activities, antiobesitybittergourd extract for anti-diabetic activity, gooseberry spice for alleviation of insulin resistance and healing of diabetic wounds and a protein mix for sarcopenia. These were studied in detail for their mechanism of action and identification and quantification of their active phytoconstituents was done. A scientific validation of the functional foods was carried out by means of biochemical, hemodynamic, histopathological and gene expression studies. The functional foods display good potential for alleviating disorder/disease and may be used regularly in diet for their benefits. However, further data on their stability, efficacy, drug interactions and adverse effects is warranted.

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

УДК 66.047

РАЗРАБОТКА ОСНОВНЫХ ПРОФЕССТОНАЛЬНЫХ ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ ПРОГРАММ НА ОСНОВЕ ПРИМЕРНЫХ ОСНОВНЫХ ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ ПРОГРАММ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО СТАНДАРТА ПО НАПРАВЛЕНИЮ «БИОТЕХНОЛОГИЯ»

Р.Р. Биглов

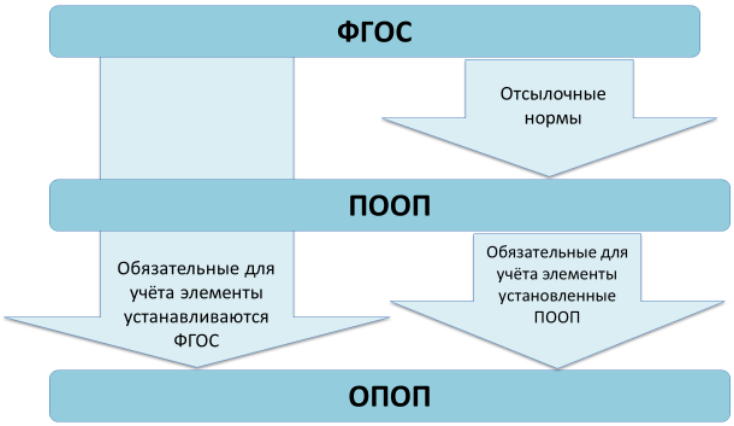
МИРЭА – Российский технологический университет, Институт тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Основная профессиональная образовательная программа высшего образования (ОПОП) представляет собой систему документов, разрабатываемую и утверждаемую образовательной организацией на основе федерального государственного образовательного стандарта высшего образования (ФГОС) и примерной основной образовательной программы (ПООП).

ОПОП должна регламентировать цели, ожидаемые результаты, содержание, условия и технологии реализации образовательного процесса, оценку качества подготовки выпускника по данному направлению подготовки и включает в себя: учебный план, рабочие программы учебных курсов, предметов, дисциплин (модулей) и другие материалы, обеспечивающие качество подготовки обучающихся, а также программы учебной и производственной практики, календарный учебный график и методические материалы, обеспечивающие реализацию соответствующей образовательной технологии.

ПООП для ОПОП является комплексным методическим документом, рекомендованным организациям, осуществляющим образовательную деятельность по соответствующему направлению подготовки (специальности) и уровню высшего образования.

ПООП должна быть размещена на специальном реестре, являющимся государственным ресурсом.



Взаимодействие ОПОП с регулирующими документами представлена на схеме:

При разработке ОПОП образовательная организация устанавливает направленность (профиль) программы, которая соответствует направлению подготовки в целом или конкретизирует содержание программы в рамках направления подготовки путём ориентации её на:

– область (области) профессиональной деятельности и сферу (сферы) профессиональной деятельности выпускников;

– тип (типы) задач и задачи профессиональной деятельности выпускников;

– при необходимости – на объекты профессиональной деятельности выпускников или область (области) знания.

В образовательной программе выделяются обязательная часть и часть, формируемая образовательной организацией.

К обязательной части ОПОП относятся дисциплины (модули) и практики, обеспечивающие формирование универсальных и общепрофессиональных компетенций, а также профессиональных компетенций, установленных ПООП в качестве обязательных.

Такими профессиональными компетенциями для обучающихся по программе бакалавриата «Биотехнология» предлагается установить в ПООП следующие (на примере профиля «Фармацевтическая биотехнология»):

Задача ПД	Объект или область знания	Код и наименование компетенции	Код и наименование индикатора достижения компетенции	Основание (ПС, анализ опыта)
I. Направленность (профиль) – фармацевтическая биотехнология				
А. Тип задач профессиональной деятельности – научно-исследовательский				
Выделение, идентификация и анализ продуктов биосинтеза и биотрансформации, получение новых штаммов-продуцентов биологических препаратов;	Микроорганизмы, клеточные культуры животных и растений, вирусы, биологически активные и химические соединения, полученные с их помощью; Оборудование и приборы для работы с биологическими объектами и биологически активными соединениями	**ПК-1-ОИА.** Способен участвовать в получении промышленных продуцентов значимых продуктов биотехнологии методами генетического конструирования и оптимизировать методы направленного биосинтеза биомассы, рекомбинантных белков, антибиотиков, вакцин, ферментов, органических кислот, этанола, аминокислот и пр.	**ИД-1/ПК-1-ОИА**. Подбирает условия и проводит идентификацию, выделение и культивирование штаммов-продуцентов биомассы, ферментов, антибиотиков, вакцин, органических кислот, этанола, аминокислот и пр. **ИД-2/ПК-1-ОИА.** Применяет методы генетической и белковой инженерии для получения продуцентов с заданными свойствами; **ИД-3/ПК-1-ОИА.** Определяет возможные пути биосинтеза ключевых интермедиатов и целевых продуктов для выбора оптимальных условий биотехнологического процесса.	«Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года» решение Правительственной комиссии по высоким технологиям и инновациям от 1 апреля 2011 г. (протокол № 2, раздел I, пункт 1); 15.010 «Микробиолог»; 02.010 «Специалист по промышленной фармации в области исследований лекарственных средств»
Разработка технологии получения, выделения и очистки биотехнологических продуктов	Микроорганизмы, клеточные культуры животных и растений, вирусы, ферменты, биологически активные химические вещества; Приборы и оборудование для исследования свойств используемых микроорганизмов, клеточных культур и получаемых с их помощью веществ в лабораторных и промышленных условиях; Установки и оборудование для проведения биотехнологических процессов;	**ПК-2-ОИА.** Готов участвовать в разработке основ технологий производства биотехнологической продукции	**ИД-1/ПК-2-ОИА.** Составляет рациональную схему получения, выделения и очистки биотехнологических продуктов с использованием микробиологического синтеза, биокатализа, методов генной инженерии; **ИД-2/ПК-2-ОИА.** Оптимизирует условия проведения отдельных стадий получения, выделения и очистки биотехнологических продуктов с целью повышения эффективности производства; **ИД-3/ПК-2-ОИА.** Оценивает технические средства и технологии с учетом экологических последствий их применения; **ИД-4/ПК-2-ОИА.** Участвует в разработке технической документации (типового лабораторного, опытного и технологического регламента), регламентирующую	02.010 «Специалист по промышленной фармации в области исследований лекарственных средств»; 26.009 «Специалист-технолог по производству моющих и чистящих средств биотехнологическим методом»

Задача ПД	Объект или область знания	Код и наименование компетенции	Код и наименование индикатора достижения компетенции	Основание (ПС, анализ опыта)
			производство биотехнологического продукта; **ИД-5/ПК-2-ОIА**. Собирает данные для научно-технических отчетов, научных докладов и публикаций и участвует в их написании.	
В. ***Тип задач профессиональной деятельности – организационно-управленческий***				
Управление отдельными стадиями действующих биотехнологических производств	Микроорганизмы, клеточные культуры животных и растений, вирусы, ферменты, биологически активные химические вещества; Установки и оборудование для проведения биотехнологических процессов; Средства контроля качества сырья, полуфабрикатов и готовой продукции;	**ПК-1-ОIВ.** Способен организовывать работу исполнителей, находить и принимать управленческие решения в области организации и нормирования труда	**ИД-1/ПК-1-ОIВ.** Разрабатывает оперативные планы работы первичных производственных подразделений; **ИД-2/ПК-1-ОIВ.** Организует работу персонала первичного производственного подразделения на основании научно обоснованных норм труда; **ИД-3/ПК-1-ОIВ.** Организует и выполняет мероприятия по предупреждению производственного травматизма, профессиональных заболеваний и экологических нарушений; **ИД-4/ПК-1-ОIВ.** Определяет научно-обоснованные нормы трудовых затрат на проведение работ по производству продукции, а также проводит оценку трудового вклада сотрудников в производственные результаты.	02.016 «Специалист по промышленной фармации в области производства лекарственных средств»; 02.013 «Специалист по промышленной фармации в области контроля качества лекарственных средств»; 26.009 «Специалист-технолог по производству моющих и чистящих средств биотехнологическим методом»; 02.014 «Специалист по промышленной фармации в области обеспечения качества лекарственных средств»
Обеспечение качества биотехнологической продукции	Документация системы менеджмента качества биотехнологической продукции; Установки и оборудование для проведения биотехнологических процессов; Средства контроля качества сырья, полуфабрикатов и готовой продукции;	**ПК2-ОIВ.** Готов к реализации системы менеджмента качества биотехнологической продукции в соответствии с требованиями российских и международных стандартов качества	**ИД-1/ПК-2-ОIВ.** Разрабатывает, ведет учет, вносит изменения и использует в профессиональной деятельности регламентирующую и регистрирующую документацию системы менеджмента качества биотехнологической продукции **ИД-2/ПК-2-ОIВ.** Использует методы оценки рисков для качества биотехнологической продукции; **ИД-3/ПК-2-ОIВ.** Проверяет состояние системы качества с позиций рисков для качества биотехнологической продукции; **ИД-4/ПК-2-ОIВ.** Участвует в проведении внутреннего аудита системы качества на биотехнологическом производстве; **ИД-5/ПК-2-ОIВ**. Готовит предложения по улучшению системы качества на биотехнологическом производстве.	02.014 «Специалист по промышленной фармации в области обеспечения качества лекарственных средств». 26.013. «Специалист по контролю качества биотехнологического производства препаратов для растениеводства»; 02.013 «Специалист по промышленной фармации в области контроля качества лекарственных средств»;
С. Тип задач профессиональной деятельности – технологический				
Технологическая подготовка производства и ведение технологического процесса производства	Микроорганизмы, клеточные культуры животных и растений, вирусы, ферменты, биологически активные химические вещества;	**ПК-1-ОIС.** Способен осуществлять технологический процесс в соответствии с регламентом и использовать технические средства для измерения	**ИД-1/ПК-1-ОIС.** Участвует в подготовке и эксплуатации технологического оборудования на участках производства: организации	02.016 «Специалист по промышленной фармации в области производства лекарственных средств»;

Задача ПД	Объект или область знания	Код и наименование компетенции	Код и наименование индикатора достижения компетенции	Основание (ПС, анализ опыта)
биотехнологических продуктов.	Приборы и оборудование для исследования свойств используемых микроорганизмов, клеточных культур и получаемых с их помощью веществ в лабораторных и промышленных условиях; Установки и оборудование для проведения биотехнологических процессов;	основных параметров биотехнологических процессов, свойств сырья и продукции	рабочих мест, их техническом оснащении; **ИД-2/ПК-1-ОIС.** Проводит контроль качества сырья, промежуточных и готовых продуктов биотехнологического процесса на соответствие технологическим требованиям; **ИД-3/ПК-1-ОIС**. Проводит технологические операции на различных этапах получения биотехнологической продукции; **ИД-4/ПК-1-ОIС.** Контролирует соблюдение технологической дисциплины, принимает корректирующие меры в случае выявление отклонения параметров от технологических требований.	26.009 «Специалист-технолог по производству моющих и чистящих средств биотехнологическим методом»;
Контроль качества биотехнологической продукции	Микроорганизмы, клеточные культуры животных и растений, вирусы, ферменты, биологически активные химические вещества; Приборы и оборудование для исследования свойств используемых микроорганизмов, клеточных культур и получаемых с их помощью веществ в лабораторных и промышленных условиях; Средства контроля качества сырья, полуфабрикатов и готовой продукции;	**ПК-2-ОIС.** Способен контролировать качество биотехнологической продукции на всех этапах производственного процесса	**ИД-1/ПК-2-ОIС.** Проводит контроль сырья и материалов, промежуточной и готовой продукции в биотехнологическом производстве с использованием утвержденных методик; **ИД-2/ПК-2-ОIС.** Ведет документооборот и формирует отчетную документацию по контролю качества на биотехнологическом производстве; **ИД-3/ПК-2-ОIС.** Проводит контроль условий хранения сырья, материалов, полуфабрикатов и готовой продукции; **ИД-4/ПК-2-ОIС.** Проводит контроль технического состояния оборудования, средств измерений и сроков проведения их поверки; **ИД-5/ПК-2-ОIС.** Проводит контроль наличия и качества технической документации; **ИД-6/ПК-2-ОIС.** Разрабатывает предложения по повышению качества продукции.	26.013. «Специалист по контролю качества биотехнологического производства препаратов для растениеводства»; 02.013 «Специалист по промышленной фармации в области контроля качества лекарственных средств»;
D. Тип задач профессиональной деятельности – проектный				
Проектирование отдельных стадий и оборудования биотехнологических производств	Приборы и оборудование для исследования свойств используемых микроорганизмов, клеточных культур и получаемых с их помощью веществ в лабораторных и промышленных условиях; Установки и оборудование для проведения биотехнологических процессов; Основные виды современного графического ПО	**ПК-1-OID.** Способен участвовать в разработке технологических проектов с использованием стандартных средств автоматизации проектирования	**ИД-1/ПК-1-OID**. Собирает исходные данные для проектирования биотехнологических процессов и установок; **ИД-2/ПК-1-OID.** Использует графические компьютерные системы для проектирования отдельных стадий технологического процесса; **ИД-3/ПК-1-OID.** Применяет графические программные средства для разработки проектной и рабочей технической документации.	26.009 «Специалист-технолог по производству моющих и чистящих средств биотехнологическим методом»;
E. Тип задач профессиональной деятельности – педагогический				

Задача ПД	Объект или область знания	Код и наименование компетенции	Код и наименование индикатора достижения компетенции	Основание (ПС, анализ опыта)
Подготовка и проведение обучения студентов образовательных учреждений среднего и высшего образования и среднетехнического персонала предприятий по дисциплинам биотехнологического профиля	Демонстрационные материалы, мультимедийное оборудование, программное обеспечение	**ПК-1-ОIЕ.** Готов к проведению учебных занятий с использованием современных образовательных технологий.	**ИД-1/ПК-1-ОIЕ.** Осуществляет подготовку и проводит учебные занятия, в том числе семинары, практические занятия и лабораторные практикумы по профильным дисциплинам; **ИД-2/ПК-1-ОIЕ.** Разрабатывает учебные и учебно-методические материалы, в том числе в электронном виде; **ИД-3/ПК-1-ОIЕ.** Принимает участие в руководстве научно-исследовательской работой обучающихся; **ИД-4/ПК-1-ОIЕ.** Проводит обучение среднетехнического персонала на производстве; **ИД-5/ПК-1-ОIЕ.** Осваивает и использует современные образовательные технологии.	01.004 «Педагог профессионального обучения, профессионального образования и дополнительного профессионального образования»

Объем обязательной части, без учёта объёма государственной итоговой аттестации, должен составлять не менее 60 процентов общего объёма программы для бакалавриата и нем менее 25 процентов общего объёма программы для магистратуры.

Рекомендуемую часть образовательная организация может разрабатывать самостоятельно или использовать содержащуюся (как рекомендуемую) в ПООП.

При самостоятельной разработке образовательная организация должна использовать профессиональные стандарты выделяя одну или несколько обобщённых трудовых функций (ОТФ), соответствующих профессиональной деятельности выпускников, на основе установленных профессиональным стандартом для ОТФ уровня квалификации и требований раздела «Требования к образованию и обучению».

ЛИТЕРАТУРА

1. Федеральный закон «Об образовании в Российской Федерации» от 29.12.2012 № 273-ФЗ (с изменениями) // Электронный ресурс «Портал Федеральных государственных образовательных стандартов высшего образования» http://fgosvo.ru/support/37/4/1? sword=%D0 % B7 % D0 % B0 % D0 % BA % D0 % BE % D0 % BD+

2. Макет ПООП для области образования «Инженерное дело, технологии и технические науки» (бакалавриат, магистратура, специалитет) (утверждён 23.05.2017 г.) // Электронный ресурс «Портал Федеральных государственных образовательных стандартов высшего образования» http://fgosvo.ru/support/139/139/45

3. Биглов Р.Р. Об актуализации образовательных программа бакалавриата биотехнологии в связи с введением профессиональных стандартов // Материалы 4 международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика», 20–24 сентября 2016, Ялта. 2016. С. 7

4. Биглов Р.Р. Об актуализации образовательных программ магистратуры биотехнологии в связи с введением профессиональных стандартов // Актуальная биотехнология. 2016 № 2 (17). С. 49–51.

УДК 331.108

РАЗВИТИЕ ПЕРСОНАЛА ПРЕДПРИЯТИЙ АГРОПРОМЫШЛЕННОГО КОМПЛЕКСА

Л.И. Назина, Н.Л. Клейменова, О.А. Орловцева

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Развитие персонала является важнейшим условием успешного функционирования любой организации. Это особенно справедливо в современных условиях, когда ускорение научно-технического прогресса значительно убыстряет процесс устаревания профессиональных знаний и навыков. Профессиональное развитие представляет собой процесс подготовки сотрудника к выполнению новых производственных функций, занятию новых должностей [1].

Статья 196 ТК РФ определяет права и обязанности работодателя по подготовке и переподготовке кадров. Необходимость профессиональной подготовки и переподготовки кадров для собственных нужд определяет работодатель.

Работодатель проводит профессиональную подготовку, переподготовку, повышение квалификации работников, обучение их вторым профессиям в организации, а при необходимости – в образовательных учреждениях начального, высшего профессионального и дополнительного образования на условиях и в порядке, которые определяются коллективным договором, соглашениями, трудовым договором.

Формы профессиональной подготовки, переподготовки повышения квалификации работников, перечень необходимых профессий и специальностей определяются работодателем с учетом мнения представительного органа работников. В случаях, предусмотренных федеральными законами, иными нормативными правовыми актами, работодатель обязан проводить повышение квалификации работников, если это является условием выполнения работниками определенных видов деятельности.

Работникам, проходящим профессиональную подготовку, работодатель должен создать необходимые условия для совмещения работы с обучением, предоставлять гарантии, установленные Трудовым кодексом РФ, иными нормативными правовыми актами, коллективным договором, соглашениями, трудовым договором.

Трудовой кодекс РФ предусматривает право работников на профессиональную подготовку, переподготовку и повышение квалификации, включая обучение новым профессиям и специальностям. Указанное право реализуется путем заключения дополнительного договора между работником и работодателем (ст. 197 ТК РФ).

Организация затрачивает на профессиональное развитие значительные средства. Эти затраты являются капиталовложением организации в развитие своих сотрудников, от которых она ожидает отдачи в виде повышения производительности, увеличения вклада каждого сотрудника в достижении поставленных целей [2]. Помимо непосредственного влияния на финансовые результаты, капиталовложения в профессиональное развитие способствуют созданию благоприятного климата в организации, повышают мотивацию сотрудников и их преданности организации.

Профессиональное развитие оказывает положительное влияние и на самих сотрудников. Повышая квалификацию и приобретая навыки и знания, они становятся более конкурентоспособными на рынке труда и получают дополнительные возможности для профессионального роста как внутри своей организации, так и вне ее. Это особенно важно в современных условиях быстрого устаревания профессиональных знаний. Профессиональное обучение так же способствует общему интеллектуальному развитию человека, расширяет его эрудицию и круг общения, укрепляет уверенность в себе.

Возможность получения профессионального обучения высоко ценится работниками. Выигрывает от внутриорганизационного профессионального развития и общество в целом, получая более квалифицированных членов и более высокую производительность общественного труда без дополнительных затрат.

Ключевым моментом в управлении профессиональным развитием является определение потребностей организации в этой области. По существу речь идет о выявлении несоответствия между профессиональными знаниями и навыками, которыми должен обладать персонал организации для реализации ее целей, и такими знаниями и навыками, которыми обладает в действительности. Определение потребностей в профессиональном развитии отдельного сотрудника требует совместных усилий отдела кадров, самого сотрудника и его руководителя [3].

Традиционными методами определения и регистрации потребностей в профессиональном развитии являются аттестация и подготовка индивидуального плана развития. Важнейшим средством профессионального развития персонала является профессиональное обучение – процесс непосредственной передачи новых профессиональных навыков и знаний сотрудникам организации. Профессиональное обучение и развитие служат одной цели – подготовке персонала организации к успешному выполнению стоящих перед ним задач.

Обучение персонала является функцией отдела кадров или специалистов – менеджеров по обучению. К ним предъявляется определенные квалификационные требования и специальная профессиональная подготовка. Эти специалисты относятся к управленческому персоналу и их деятельность регламентируется соответствующими документами: Положением о подразделении (Учебный отдел) и должностными инструкциями.

Развитие персонала представляет собой процесс подготовки сотрудника к выполнению новых для него производственных функций, занятию новых должностей, решению новых задач, т. е. развитию новых компетенций. Мероприятиями по профессиональному развитию персонала являются семинары по маркетингу для сотрудников отдела человеческих ресурсов, посещение школы бизнеса коммерческим агентом, изучение английского языка инженером-механиком, работа только что принятого в организацию начальника планового отдела сборщиком на заводском конвейере и т. д.

Организации создают специальные методы и системы управления профессиональным развитием – управление профессиональным обучением, подготовкой резерва руководителей, развитием карьеры. В крупных многонациональных корпорациях существуют отделы профессионального развития, возглавляемые руководителем в ранге директора или вице-президента, что подчеркивает их большое значение для организации. О важности профессионального развития для современных организаций свидетельствует и то, что цели в этой области включаются в личные планы (от выполнения которых зависит размер вознаграждения) высших руководителей многих корпораций: президентов, региональных вице-президентов, директоров национальных компаний

Профессиональное развитие оказывает положительное влияние и на самих сотрудников. Повышая квалификацию и приобретая новые навыки и знания, они становятся более конкурентоспособными на рынке труда и получают дополнительные возможности для профессионального роста как внутри своей организации, так и вне ее. Это особенно важно в современных условиях быстрого устаревания профессиональных знаний. Профессиональное обучение также способствует общему интеллектуальному развитию человека, расширяет его эрудицию и круг общения, укрепляет уверенность в себе. Не случайно возможность получения профессионального обучения в собственной компании высоко ценится работниками и оказывает большое влияние на принятие ими решения о поступлении на работу в ту или иную организацию. Выигрывает от внутриорганизационного профессионального развития и общество в целом, получая более квалифицированных членов и более высокую производительность общественного труда без дополнительных затрат [4].

Важнейшим средством профессионального развития персонала является профессиональное обучение – процесс непосредственной передачи новых профессиональных навыков или знаний сотрудникам организации. Примером профессионального обучения могут служить курсы по изучению новой компьютерной программы для секретарей-референтов, программа по обучению агентов по продажам, финансовый курс для высшего управленческого аппарата компании. Формально профессиональное развитие шире, чем профессиональное обучение, и часто включает в себя последнее, однако в реальной жизни различие между ними может быть чисто условным и не столь важным, поскольку и профессиональное обучение, и развитие служат одной цели – подготовке персонала организации к успешному выполнению стоящих перед ним задач. Иногда утверждают, что профессиональное обучение ориентируется, прежде всего, на задачи сегодняшнего дня, а развитие на будущие потребности организации. Однако с ускорением изменений во внешней для организаций среде и в самих организациях это различие становится все более условным.

В современных организациях профессиональное обучение представляет собой комплексный непрерывный процесс, включающий в себя несколько этапов. Управление этим процессом профессионального обучения начинается с определения потребностей, которые формируются на основе потребностей развития персонала организации, а также необходимости выполнения сотрудниками организации своих текущих производственных обязанностей.

Выполнение должностных обязанностей требует от сотрудников организации знания рабочих процедур и технологических методов обработки выпускаемой продукции и оказываемых услуг, умения работать на установленном оборудовании и т. п. Потребности, связанные с выполнением производственных обязанностей, определяются на основе заявок руководителей подразделений и самих работников, путем проведения опросов руководителей и специалистов (отдел профессиональной подготовки рассылает анкету с просьбой указать в ней потребности в профессиональном обучении), анализа результатов работы организации, тестирования сотрудников.

Профессиональное обучение может проводиться на рабочем месте, отличаться своей практической направленностью, непосредственной связью с производственными функциями сотрудников, что предоставляет значительные возможности для повторения и закрепления вновь изученного [5, 6]. В этом смысле данный вид обучения является оптимальным для выработка навыков, требуемых для выполнения текущих производственных задач.

Организация профессионального обучения возлагается на специальные подразделения, как правило, учебные отделы, возглавляемые менеджерами по обучению персонала. Эти специалисты имеют конкретные функциональные обязанности и относятся к управленческому персоналу.

Регламентация труда управленческого персонала основывается на применении двух различных, но взаимосвязанных методов совершенствования систем управления: разработки регламентирующей документации (качественные регламенты) и нормирования труда (количественные регламенты).

Регламентирующая документация широко применяется в управленческой деятельности организаций. Однако методическая база разработки регламентов управления практически отсутствует. Наиболее важными и обобщающими документами, регламентирующими распределение функций, прав, обязанностей и ответственности подразделений и должностных лиц управленческого персонала, являются должностные инструкции и положения об отделах.

Характеристика каждой должности имеет три раздела. В разделе «Должностные обязанности» перечислены функции, которые могут быть полностью или частично поручены для выполнения работнику, занимающему данную должность. Раздел «Должен знать» содержит основные требования, предъявляемые к работнику в отношении специальных знаний, законодательных актов, положений, инструкций и других руководящих и нормативных документов, а также методов и средств, которые служащий должен уметь применять при выполнении должностных обязанностей. В разделе «Требования к квалификации» определены уровень и профиль специальной подготовки работника, необходимые для выполнения возложенных на него обязанностей, и требования к стажу работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Волгин Н.А. Управление персоналом в условиях рыночной экономики. М.: Банки и биржи, ЮНИТИ, 2001. 187 с.
2. Галенко В.П., Страхова О.А., Файбушевич С.И. Управление персоналом и эффективность предприятий. – Спб.: Питер, 2003 г. – 429 с.
3. Герчиков И.Н. Менеджмент. – М.: Банки и биржи, 2002. – 480 с.
4. Менеджмент организации. – под редакцией З.П. Румянцевой и Н.А. Саломатина. М.: Инфа-М, 2005. 250 с.
5. Попов Г.В., Назина Л.И., Лихачева Л.Б., Елизарьев С.В. Разработка модульной системы обучения в организации / Вестник ВГУИТ. 2012. № 4 (54). С. 137–141.
6. Попов Г.В., Елизарьев С.В., Назина Л.И., Лихачева Л.Б. Определение требований к профессиональной компетентности рабочих как основа разработки профессиональных стандартов / Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. 2012. № 3 (53). С. 175–179.

УДК 378.14

ОСОБЕННОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ АККРЕДИТАЦИОННОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ ВЫСШИХ УЧЕБНЫХ ЗАВЕДЕНИЙ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

М.Г. Сульман, Э.М. Сульман, Г.Н. Демиденко, Ю.Ю. Косивцов

Тверской государственный технический университет, Тверь, Россия

Государственная аккредитация образовательной деятельности в Российской Федерации осуществляется уполномоченной структурой Федеральной службы по надзору в сфере образования и науки (Рособрнадзор) – Национальным аккредитационным агентством в сфере образования (Росаккредагентство) по основным образовательным программам (ООП), реализуемым в соответствии с федеральными государственными образовательными стандартами (ФГОС), а также по основным образовательным программам, реализуемым в соответствии с образовательными стандартами. Согласно Федеральному закону № 273 «Об образовании в Российской Федерации» государственная аккредитация образовательной деятельности проводится по всем реализуемым вузом основным образовательным программам один раз в 6 лет. Предметом аккредитационной экспертизы является определение соответствия содержания и качества подготовки обучающихся, по заявленным для государственной аккредитации ООП. Государственная аккредитация образовательной деятельности проводится по результатам аккредитационной экспертизы экспертной группой, в состав которой входят руководитель и уполномоченные эксперты, имеющие необходимую квалификацию в области заявленных вузом для государственной аккредитации ООП.

Наиболее распространенной формой проведения аккредитационной экспертизы высших учебных заведений в настоящее время остается экспертиза с выездом в образовательную организацию. Общий порядок проведения процедуры государственной аккредитации образовательных программ вуза включает:

1) подготовку вуза и его филиалов (при их наличии) к проведению государственной аккредитации образовательных программ;

2) подачу в Росаккредагентство заявления на государственную аккредитацию с прилагаемыми документами и размещение их на сайте вуза;

3) формирование Росаккредагентством экспертной группы;

4) предварительный анализ документов и материалов экспертами;

5) проведение аккредитационной экспертизы с выездом в вуз и его филиалы (при их наличии);

6) формирование экспертами отчетных документов на каждую образовательную программу и представление их руководителю экспертной группы;

7) предоставление руководителем экспертной группы пакета документов и материалов по итогам аккредитации в Росаккредагентство;

8) принятие решения о выдаче вузу аттестата аккредитации или об отказе в аккредитации.

Однако применяются и другие виды аккредитационной экспертизы, часть из которых могут реализовываться одновременно с вышерассмотренной формой:

1) без выезда в образовательную организацию (ОО) или филиал – экспертная группа проводит аккредитационную экспертизу в Росаккредагентстве;

2) без выезда в образовательную организацию или филиал в электронном виде – работа с документами и материалами ОО, необходимыми для проведения аккредитационной экспертизы, ведется экспертами в информационной системе государственной аккредитации (ИС ГА), в личном кабинете;

3) в отношении одной ООП вуза – в состав экспертной комиссии включается один эксперт и руководитель;

4) с выездом в образовательную организацию или филиал – в отношении ООП, реализуемых по образовательным стандартам, установленным образовательной организацией самостоятельно. Данная форма реализуется для ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» и «Санкт-Петербургский государственный университет», образовательных организаций высшего образования, в отношении которых установлена категория «федеральный университет» или «национальный исследовательский университет», а также федеральных государственных образовательных организаций высшего образования, перечень которых утверждается указом Президента Российской Федерации;

5) с выездом в образовательную организацию или филиал – в отношении ООП, реализуемых с применением электронного обучения, дистанционных образовательных технологий. При проведении аккредитационной экспертизы экспертной группе предоставляется доступ в электронную информационно-образовательную среду ОО, эксперт должен оценить возможности освоения обучающимися ООП в полном объеме независимо от их места нахождения;

6) с выездом в образовательную организацию или филиал – в отношении ООП, реализуемых с применением сетевой формы, проверяются:

- ООП, совместно разработанные и утвержденные организациями-партнерами, на соответствие договору о сетевой форме реализации ООП;

- наличие письменных согласий обучающихся на обучение по сетевой форме;

- обеспеченность ООП совокупностью ресурсов материально-технического и учебно-методического обеспечения, предоставляемого организациями, участвующими в реализации программы с использованием сетевой формы.

Необходимо отметить, что проверка экспертом выполнения требований к качеству подготовки обучающихся при реализации ООП в сетевой форме проводится с учетом предоставления условий и ресурсов всех организаций, участвующих в реализации данной ООП.

7) с выездом в образовательную организацию или филиал – в отношении ООП, реализуемых с использованием лабораторий, созданных научными организациями, кафедр или иных структурных подразделений в иных организациях. Вуз обязан предоставить экспертной группе сведения, подтверждающие наличие условий, обеспечивающих соответствующую подготовку обучающихся с использованием указанных в заявлении на проведение государственной аккредитации лабораторий, кафедр и структурных подразделений.

8) с выездом в образовательную организацию или филиал – в отношении ООП, реализуемых частной образовательной организацией, учредителем которой является религиозная организация, и реализуемых духовной образовательной организацией. Подтверждение образовательного ценза педагогических работников духовной ОО осуществляется с учетом сведений о квалификации педагогических работников, имеющих богословские степени и богословские звания. В целях обеспечения учета особенностей образовательной деятельности частной ОО, учредителем которой является религиозная организация, при проведении аккредитационной экспертизы в состав экспертной группы включаются эксперты из числа работников религиозных организаций, соответствующие квалификационным требованиям к экспертам, и представители экспертных организаций, являющихся религиозными организациями.

9) с выездом в образовательную организацию или филиал – в отношении ООП, реализуемых при наличии обучающихся инвалидов и лиц с ограниченными возможностями здоровья. Образовательная организация обязана предоставить экспертной группе сведения о данной категории обучающихся. Эксперт проводит анализ личных дел обучающихся по ООП, заявленной на государственную аккредитацию, на наличие медицинских документов, подтверждающих ограничения здоровья или инвалидность, а также письменных заявлений от студентов на обучение по адаптированной программе. При обучении в вузе студентов с ограничением здоровья или инвалидностью эксперт проверяет утвержденную адаптированную образовательную программу, а для инвалидов – дополнительно индивидуальную программу реабилитации инвалида. Если по ООП, заявленной на государственную аккредитацию, имеются обучающиеся с ограничением здоровья или инвалидностью по зрению, по слуху, с нарушениями опорно-двигательного аппарата, эксперт проверяет наличие специальных условий для получения образования такими лицами в соответствии с требованиями ФГОС, например, утвержденный порядок освоения дисциплин (модулей) по физической культуре и спорту с учетом состояния здоровья инвалидов и лиц с ограниченными возможностями здоровья, условия для проведения таких занятий, выбор мест прохождения практики и т. п.

Основаниями для отказа в государственной аккредитации образовательной деятельности по заявленным к государственной аккредитации ООП, являются:

1) выявление недостоверной информации в документах, представленных вузом;

2) наличие отрицательного заключения, составленного по результатам аккредитационной экспертизы.

УДК 66.047

ОСОБЕННОСТИ ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ ПРОГРАММ ПОДГОТОВКИ КАДРОВ ПО ПИЩЕВЫМ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМ НАПРАВЛЕНИЯМ В СООТВЕТСТВИИ С ФГОС 3++

О.Я. Мезенова

КГТУ, г. Калининград, Россия

Федеральный закон "Об образовании в Российской Федерации" № 273-ФЗ. Статья 11. Федеральные государственные образовательные стандарты и федеральные государственные требования. Образовательные стандарты.

Обязательны: ФГОС, ПООП, ОПОП (Федеральный закон от 29 декабря 2012 г. № 273-ФЗ).

1. Федеральные государственные образовательные стандарты и федеральные государственные требования обеспечивают:

1) единство образовательного пространства Российской Федерации;

2) преемственность основных образовательных программ;

3) вариативность содержания образовательных программ соответствующего уровня образования, возможность формирования образовательных программ различных уровня сложности и направленности с учетом образовательных потребностей и способностей обучающихся;

4) государственные гарантии уровня и качества образования на основе единства обязательных требований к условиям реализации основных образовательных программ и результатам их освоения.

2. Федеральные государственные образовательные стандарты, за исключением федерального государственного образовательного стандарта дошкольного образования, образовательные стандарты являются основой объективной оценки соответствия установленным требованиям образовательной деятельности и подготовки обучающихся, освоивших образовательные программы соответствующего уровня и соответствующей направленности, независимо от формы получения образования и формы обучения.

3. Федеральные государственные образовательные стандарты включают в себя требования к:

1) структуре основных образовательных программ (в том числе соотношению обязательной части основной образовательной программы и части, формируемой участниками образовательных отношений) и их объему;

2) условиям реализации основных образовательных программ, в том числе кадровым, финансовым, материально-техническим и иным условиям;

3) результатам освоения основных образовательных программ.

4. Федеральными государственными образовательными стандартами устанавливаются сроки получения общего образования и профессионального образования с учетом различных форм обучения, образовательных технологий и особенностей отдельных категорий обучающихся.

5. Федеральные государственные образовательные стандарты общего образования разрабатываются по уровням образования, федеральные государственные образовательные стандарты профессионального образования могут разрабатываться также по профессиям, специальностям и направлениям подготовки по соответствующим уровням профессионального образования.

6. В целях обеспечения реализации права на образование обучающихся с ограниченными возможностями здоровья устанавливаются федеральные государственные образовательные стандарты образования указанных лиц или включаются в федеральные государственные образовательные стандарты специальные требования.

7. При формировании федеральных государственных образовательных стандартов профессионального образования учитываются положения соответствующих профессиональных стандартов.

Федеральный государственный образовательный стандарт (ФГОС) – это совокупность обязательных требований к образованию определенного уровня и (или) к профессии, специальности и направлению подготовки. ФГОС устанавливает требования к:

×структуре основных образовательных программ (в том числе соотношению обязательной части основной образовательной программы и части, формируемой участниками образовательных отношений) и их объему;

×условиям реализации основных образовательных программ, в том числе кадровым, финансовым, материально-техническим и иным условиям;

×результатам освоения основных образовательных программ.

Примерная основная образовательная программа – обязательная учебно-методическая документация, которая включает:

×примерный учебный план

×примерный календарный учебный график

×примерные рабочие программы учебных предметов, курсов, дисциплин (модулей), иных компонентов

Определяет рекомендуемые

×объем

×содержание образования определенного уровня и (или) определенной направленности,

×планируемые результаты освоения образовательной программы,

×примерные условия образовательной деятельности, включая примерные расчеты нормативных затрат оказания государственных услуг по реализации образовательной программы.

Образовательная программа – это комплекс основных характеристик образования, который регламентирует:

×объем

×содержание

×планируемые результаты;

Организационно-педагогические условия
Формы аттестации
×Учебный план
×Календарный учебный график
×Рабочие программы учебных предметов, курсов, дисциплин (модулей), иных компонентов
×Оценочные и методические материалы

В отличие от ФГОС 3 в актуализированном ФГОС 3++ области и сферы профессиональной деятельности (в соответствии с реестром Минтруда России), типы профессиональных задач, перечень специализаций (при наличии) – раскрываются в ПООП. Требования к результатам освоения программы во ФГОС 3++ прописываются только через УК и ОПК. Устанавливается отсылочная норма к установлению ПК в ПООП и ОПОП. При этом ПК дифференцируются на:

× Обязательные – в ПООП
×Рекомендуемые (при наличии)

Особенностью ФГОС 3++ является также ссылка на сопряженные с ФГОС ВО профессиональные стандарты.

Варианты включения ПК в ОПОП:

Организация:

×включает в программу все обязательные профессиональные компетенции (при наличии);

×вправе включить в программу одну или несколько рекомендуемых профессиональных компетенций (при наличии);

×включает (при необходимости) определяемые самостоятельно одну или несколько профессиональных компетенций, исходя из направленности (профиля) программы

Особенностью ФГОС 3++ является раздел IV «Требования к условиям реализации», а именно: 1 – Разделены требования к электронной электронно-образовательной среде в целом и при реализации программы с применением дистанционных образовательных технологий. 2 – Норматив книгообеспеченности для печатных изданий: не менее 0,25 экземпляра каждого из изданий, указанных в рабочих программах дисциплин (модулей), программах практик, на одного обучающегося из числа лиц, одновременно осваивающих соответствующуюдисциплину (модуль), проходящих соответствующую практику – без разделения на основную и дополнительную. 3 – Требования к кадровому обеспечению: учитываются педагогические работники Организации, участвующие в реализации программы, и лица, привлекаемые к реализации программы на иных условиях.

Яркой особенностью актуализированных стандартов является появление в приложении к ФГОС 3++ переченя основных и сопряженных профессиональных стандартов.

Обязательная часть ПООП, которая определяется ФГОС 3++: ПООП является обязательной для учета Организацией в части установления:

– перечня компетенций, обеспечиваемых дисциплинами (модулями) и практиками обязательной части программы;

– индикаторов их достижения, обеспечиваемых дисциплинами (модулями) и практиками обязательной части программы.

АктуализированныйФГОС 3++ дают большие свободы вузам, чем предшествующие стандарты.

Современные ОП базируются на ФГОС 3++, а также ПООП, ОПОП и ПС.

ФГОС3++ регламентируют структуру образовательной программы и имеют следующие особенности:

Исключение терминов «базовая» и «вариативная» части образовательной программы – приведение терминологии в соответствие с ФЗ-273

Принципиально новый подход к выделению обязательной части: обязательность результатов освоения программы (ОПК, обязательные ПК (при наличии))

Установление минимального объема обязательной части в долях от общего объема образовательной программы

Формирование УК через содержание всей образовательной программы и образовательные технологии

Установление нижних границ блоков образовательной программы («Дисциплины (модули)», «Практика»)

ФГОС3++ прописывает некоторые особенности в части «практики». Это: порядок установления типов практики-выбор из ФГОС (обязательно, как правило, минимум, один); выбор из ПООП (при необходимости); установление самостоятельно (при необходимости); преддипломная практика – на усмотрение ФУМО (если выполнение ВКР включено в ГИА). При этом исключены способы проведения практики (во ФГОС ВО прописана необходимость реализации всех способов проведения практики,). В ФГОС 3++ способы проведения практики регламентируются на уровне локального нормативного акта организации и предусматривают возможность обучающемуся выбирать способ прохождения практики (при наличии заявлений).

Классификация компетенций в утвержденных ФГОС ВО 3++ имеет особенность в виде введения категорий компетенций. Это: сквозные характеристики ключевых аспектов деятельности выпускника, отражающие в ФГОС ВО разного уровня высшего образования и обеспечивающие преемственность соответствующих компетенций. Группы компетенций: УК – универсальные компетенции (вместо ОК – общекультурных компетенций); общепрофессиональные компетенции (ОПК); профессиональные компетенции (ПК).

Особенностью компетентностного подхода к результатам освоения компетенций является введение индикаторов компетенций. Это обобщенные характеристики, уточняющие и раскрывающие формулировку компетенции в виде конкретных действий, выполняемых выпускником, освоившим данную компетенцию. Индикаторы достижения компетенций должны быть измеряемы с помощью средств, доступных в образовательном процессе.

Основные условия актуализации ФГОС ВО – учет требований профессиональных стандартов.

ФГОС 3 ++ включает : описание областей и сфер ПД, Типы задач ПД, УК и ОПК, Перечень сопряженных ПС

ПООП включает: Перечень ОТФ и ТФ, сопряженных с ФГОС; Открытый перечень направленностей (профилей) подготовки; Задачи ПД; Индикаторы достижения УК, ОПК; Обязательные ПК (при наличии) и индикаторы их достижения; Рекомендуемые ПК

ОПОП(основная профессиональная образовательная программ) включает: Заданная направленность (профиль); Отобранный перечень ПС, ОТФ и ТФ; Отобранные задачи ПД; Индикаторы УК, ОПК; Обязательные и рекомендуемые ПК (по решению Организации) и их индикаторы; Дополнительные ПК

Разработаны Методические рекомендации по актуализации ФГОС ВО, ПООП, ОПОП с учетом требований профессиональных стандартов (Согласовано НСПК, протокол от 29 марта 2017 г. № 18), которые предусматривают:

– Единые подходы для образовательных организаций и профессионального сообщества (СПК, работодатели)

– Определение основной терминологии

– Базовый принцип: одновременная разработка ФГОС ВО и ПООП

– Использование вспомогательных таблиц на основе ГОС2, ФГОС ВПО, ФГОС ВО для более полного учета задач профессиональной деятельности выпускников (при необходимости).

При выборе ОО направленности (профиля) образовательной программы ОО должна учитывать:

область (области) и (или) сфера (сферы) профессиональной деятельности выпускников

тип (типы) задач и задачи профессиональной деятельности выпускников

при необходимости – объекты профессиональной деятельности выпускников или область (области) знания

возможность установления соответствия направленности (профиля) программы специальности в целом – программы широкого профиля

рекомендации по формированию направленностей (профилей) – в ПООП

Отбор профессиональных стандартов (ПС) для ПООП осуществляется по следующим источникам: Приложение к ФГОС ВО; специализированный сайт Минтруда http://profstandart.rosmintrud.ru. При этом для организаций ВО: могут быть учтены не все ПС. При разработке ПООП необходимо отразить (прокомментировать) место каждого ПС в деятельности выпускника. Отбор для ПООП конкретных обобщённых трудовых функций должен быть избирательным (одной или нескольких, полностью или частично), при этом из ОТФ могут быть отобраны отдельные трудовые функции или трудовые действия. Основанием для отбора ОТФ являются уровень квалификации и требования раздела «Требования к образованию и обучению».

ФГОС3++ регламентирует следующие механизмы оценки качества образовательной деятельности и подготовки обучающихся:

× Регулярная внутренняя оценка качества образовательной деятельности и подготовки обучающихся

- привлечение работодателей и (или) их объединений, иных привлечение работодателей и (или) их объединений, иных юридических и (или) физических лиц, включая педагогических работников

- возможность оценивания обучающимися обучающимися условий, содержания, организации и качества образовательного содержания, организации и качества образовательного процесса в целом и отдельных дисциплин (модулей) (модулей) практик

× Внешняя оценка качества образовательной деятельности

 государственная аккредитация (ФГОС ВО с учетом ПООП

 профессионально – общественная аккредитация

Профессионально-общественная аккредитация основных профессиональных образовательных программ, основных программ профессионального обучения и (или) дополнительных профессиональных программ представляет собой признание качества и уровня подготовки выпускников… требованиям профессиональных стандартов, требованиям рынка труда к специалистам, рабочим и служащим соответствующего профиля.

В проектах ФГОС 3++ по пищевым и биотехнологическим направлениям прописаны следующие области профессиональной деятельности и (или) сферы профессиональной деятельности, в которых выпускники, освоившие программу бакалавриата, могут осуществлять профессиональную деятельность сферы деятельности выпускников:

ФГОС 19.03.01 и 19.04.01 – Биотехнология: 01 Образование и наука (в сфере профессионального обучения, профессионального образования и дополнительного профессионального образования, в сфере научных исследований), 02 Здравоохранение, 13 Сельское хозяйство, 14 Лесное хозяйство, охота, 15 Рыбоводство и рыболовство, 18 Добыча, переработка угля, руд и других полезных ископаемых, 19 Добыча, переработка, транспортировка нефти и газа, 22 Пищевая промышленность, включая производство напитков и табака, 26 Химическое, химико-технологическое производство, 40 Сквозные виды профессиональной деятельности в промышленности, а также сфера научных исследований.

ФГОС 19.03.02 и 19.04.02 – Продукты питания из растительного сырья: 01 Образование и наука (в сфере реализации образовательных программ профессионального обучения, среднего профессионального образования, дополнительного профессионального образования); в сфере научных исследований по пищевой технологии и биотехнологии, промышленной экологии и пищевой инженерии продуктов из растительного сырья); 22 Пищевая промышленность, включая производство напитков и табака (в сфере применения технологий комплексной переработки растительного сырья для производства полуфабрикатов и готовой продукции различного назначения); 40 Сквозные виды профессиональной деятельности (в сфере обеспечения экологической безопасности производства, качества и безопасности продуктов питания из растительного сырья).

ФГОС 19.03.03 и 19.04.03 – Продукты питания животного происхождения: 01Образование и наука (в сфере научных исследований технологий продуктов животного происхождения различного назначения, а также в сфере реализации образовательных программ профессионального обучения, среднего профессионального образования, дополнительного профессионального образования), 15 Рыбоводство и рыболовство (в сфере технологий комплексной переработки водных биологических ресурсов), 22 Пищевая промышленность, включая производство напитков и табака (в сфере технологий комплексной переработки мясного и молочного сырья).

ФГОС 19.03.04 и 19.04.03 04 – Технология продукции и организация общественного питания: 01 Образование и наука (в сфере реализации образовательных программ профессионального обучения, среднего профессионального образования, дополнительного профессионального образования; в сфере научных исследований); 22 Пищевая промышленность, включая производство напитков и табака (в сфере промышленного производства кулинарной продукции); 33 Сервис, оказание услуг населению (общественное питание и пр.).

ФГОС 19.03.05 и 19.04.03 05 – Высокотехнологичные производства пищевых продуктовфункционального и специализированного назначения: 01 Образование и наука (в сфере научных исследований технологий продуктов питания функционального и специализированного назначения и в сфере преподавания по программам профессионального и высшего обучения, среднего профессионального образования, дополнительной профессиональной подготовки), 15 Рыбоводство и рыболовство (в сфере разработки технологических решений и продукции, технической документации, программ производственного контроля, выполнение технологии переработки рыбы и морепродуктов, контроля производства и управления качеством продукции из рыбы и морепродуктов, разработки программ производственного контроля, организации и проведении исследований объектов технологического процесса, переработки рыбы и морепродуктов), 22 Пищевая промышленность, включая производство напитков и табака (в сфере разработки технологических решений и продукции, технической документации, программ производственного контроля, выполнение технологии переработки продукции из сырья животного, растительного происхождения, контроля производства и управления качеством продукции из сырья животного и растительного происхождения, разработки программ производственного контроля, организации и проведении исследований объектов технологического процесса, переработки сырья из сырья животного и растительного происхождения).

Подготовку кадров по пищевым и биотехнологическим направлениям прводят практически в каждом регионе РФ. Методическую базу для этого готовит ФУМО по УГСН 19.00.00 «Промышленная экология и биотехнологии» (перечислить УМК и координационные вузы).

Во всех перечисленных проектах актуализированных ФГОС научно-методическими советами ФУМО по УГСН 19.00.00 «Промышленная экология и биотехнологии» (перечислить УМК и координационные вузы) разработаны УК, ОПК и индикаторы к ним, типы практик, условия реализации ОП, требования к кадровым и финансовым условиям реализации ОП, перечень профессиональных стандартов. УМК в настоящее время готовят проекты ПООПы находятся в разработке.

В соответствии с поручениями Президента РФ в настоящее время проводится корректировка всех ФГОС с учетом приоритетов научно-технологического развития РФ, в том числе в области информатики, вычислительной техники и информационной безопасности. Через корректировку УК и ОПК необходимо предусмотреть включение требований по освоению базовых знаний в области охраны окружающей среды и устойчивого развития, финансовой грамотности, экономической культуры, дефектологические знания в социальной и профессиональной сферах.

ЛИТЕРАТУРА

Биопотенциал вторичного рыбного сырья / О.Я. Мезенова, А Хелинг, Т. Мерзель // Известия вузов. Пищевая технология. – 2018. – № 1. – С. 11–18.

УДК 378.046.4

ОПЫТ РАЗРАБОТКИ ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ ПРОГРАММ В ОБЛАСТИ БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ

Ю.Г. Базарнова, Е.Б. Аронова

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

Одним из факторов развития инновационной экономики Российской Федерации в целом является улучшение кадрового обеспечения производственных технологий. Качество производимой продукции и уровень научных исследований определяются, прежде всего, квалификацией кадров. Поэтому перед системой профессионального образования стоят задачи устранения квалификационных дефицитов и устойчивого воспроизводства кадров.

В настоящее время значительное внимание уделяется вопросам контроля качества и безопасности пищевой продукции и ветеринарно-санитарной экспертизы пищевого сырья и готовой продукции [1].

Критерии безопасности пищевого сырья, кормов и готовой пищевой продукции для государств-членов ЕАЭС изложены в статье 56 Договора о Евразийском экономическом союзе [2] и в концепции согласованной агропромышленной политики государств-членов Таможенного союза и Единого экономического пространства, одобренной Решением Высшего Евразийского экономического совета [3].

На сегодняшний день контроль физико-химических показателей и показателей безопасности пищевых продуктов включает проверку их соответствия требованиям нормативной документации на предмет содержания тяжелых металлов, радионуклидов, пестицидов, других химических загрязняющих веществ, патогенных организмов, гельминтов, простейших и биологических токсинов, которые представляют опасность для здоровья человека [4].

В соответствии с договором между Фондом инфраструктурных образовательных программ группы РОСНАНО и Санкт-Петербургским политехническим университетом Петра Великого разработан международный образовательный ресурс для подготовки специалистов в области безопасности и ветеринарно-санитарной экспертизы продовольственного сырья.

Международный образовательный ресурс представляет собой совокупность учебных модулей и учебно-методических материалов, учитывающих специфику стран-членов ЕАЭС, и предназначен для обучения и повышения квалификации специалистов.

Все профессиональные модули международного образовательного ресурса ориентированы на следующие группы специалистов:

× руководители (начальники) лабораторий;

× ветеринарные врачи, инженеры-микробиологи, специалисты лабораторий диагностических исследований;

× инженеры-химики, специалисты лабораторий контроля качества сырья и готовой пищевой продукции;

× специалисты по радиационному контролю.

Профессиональные компетенции, заявленные к формированию при освоении образовательного ресурса:

ПК 1. Проводить лабораторные исследования сырья и готовой пищевой продукции классическими микробиологическими и экспресс-методами.

ПК 2. Проводить лабораторные исследования по контролю качества пищевой продукции с использованием RFID-технологий.

ПК 3. Проводить лабораторные исследования сырья и готовой пищевой продукции инструментальными методами в условиях аналитической лаборатории.

ПК 4. Проводить лабораторные исследования с целью выявления генетически модифицированных организмов и пестицидов в продукции растительного происхождения.

ПК 5. Проводить радиационный контроль и мониторинг пищевой продукции и объектов окружающей среды инструментальными методами с использованием дозиметрического и спектрометрического оборудования.

Одним из достоинств образовательного ресурса является модульный принцип построения, который позволяет формировать индивидуальные образовательные траектории обучающихся.

Разработанный образовательный ресурс включает общепрофессиональный цикл «Нормативная база деятельности испытательных лабораторий в соответствии со стандартами ЕАЭС. Обеспечение соответствия критериев аккредитации, автоматизация деятельности лабораторий» и 5 профессиональных учебных модулей, состоящих из междисциплинарных курсов, которые являются самостоятельными структурными единицами ресурса и предназначены для формирования индивидуальной образовательной траектории слушателей.

Формат обучения предполагает как дистанционную форму проведения занятий, так и аудиторные занятия. Разработаны лабораторные практикумы, которые нацелены на освоение навыков работы с современным аналитическим оборудованием от российских производителей, что способствует внедрению инновационных технологий контроля качества и безопасности сырья и готовой пищевой продукции, обеспечивает повышение скорости и точности анализов, позволяет проводить мониторинг качества продукции в полном соответствии с регламентами.

Для наполнения дистанционных модулей (электронного учебного курса – ЭУК) разработан контент в формате SCORM2004 на базе программного обеспечения CourseLab версия 3.1. для использования в Системе дистанционного обучения WebTutor. Все элементы ЭУК представлены в виде страниц в формате HTML. Для более полного освоения учебных материалов ЭУК использованы различные виды подачи информации: текстовая, графическая, включая схемы и таблицы, озвучивание текста.

Пилотная реализация международного образовательного ресурса осуществлялась в феврале 2019 года на базе Витебского технологического университета (Республика Беларусь), обучение прошли более 100 слушателей из Беларуси, России и Казахстана.

В рамках пилотной реализации образовательных программ проведены мастер-классы и лабораторные практикумы по исследованию микробиологической контаминации рабочей поверхности методом АТФ-люминометрии; обнаружение остаточного количества 90 видов антибиотиков и токсинов в пробах молока с использованием инновационной системы «EXTENSO»; ускоренный микробиологический анализ сырья, полуфабрикатов, готовых продуктов и объектов окружающей среды с использованием тест-пластин Petrifilm® , содержащих готовые питательные среды.

В процессе апробации разработанного образовательного ресурса проведено анкетирование слушателей, преподавателей и работодателей. Результаты анкетирования представляют существенный интерес для разработчиков образовательного ресурса, поскольку позволяют внести коррективы в учебные модули. Анализ результатов анкетирования преподавателей, принимавших участие в пилотной реализации проекта, позволил скорректировать учебные планы и учебно-методические материалы.

На рисунках 1–3 представлены результаты анкетирования слушателей.

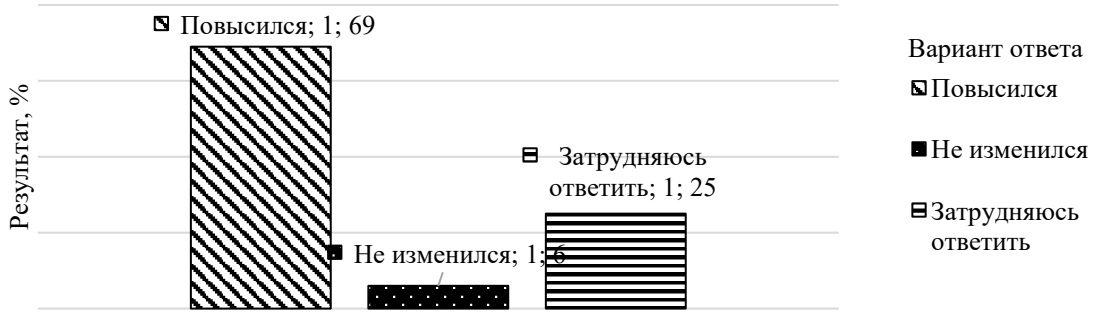


Рисунок 1 – Результаты оценки слушателями уровня повышения профессиональных компетенций

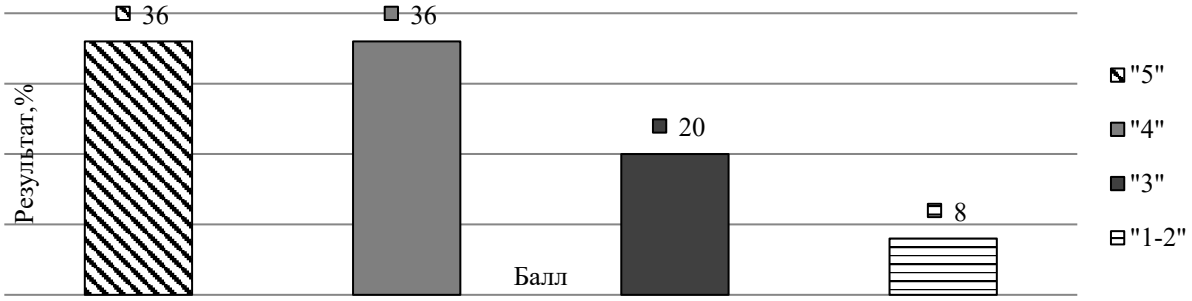


Рисунок 2 – Удовлетворенность слушателей качеством учебных материалов

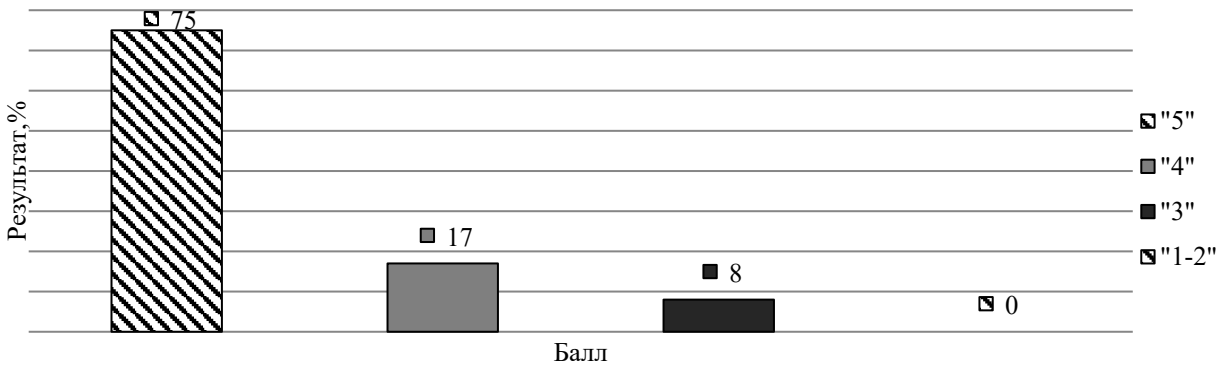


Рисунок 3 – Результаты оценки слушателями качества преподавания

Около 70 % слушателей отметили, что уровень их профессиональных компетенций в области контроля качества пищевой продукции повысился, 60 % слушателей оказались удовлетворены итогами аттестации, более 70 % – полностью удовлетворены качеством учебных материалов. Отдельно хочется отметить, что слушатели высоко оценили работу преподавателей, участвовавших в проведении занятий. Более 90 % обучающихся полностью удовлетворены качеством преподавания.

Международный образовательный ресурс опубликован на образовательном портале ФИОП. Учебные модули образовательного ресурса планируется использовать при разработке нескольких массовых открытых онлайн-курсов для размещения в электронном информационно-образовательном портале «Открытый Политех», а также для реализации основной образовательной программы магистратуры на базе Высшей школы биотехнологии и пищевых производств Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого.

ЛИТЕРАТУРА

1. Решение Комиссии Таможенного союза от 18.06.2010 № 317 «О применении ветеринарно-санитарных мер в таможенном союзе». https://rulaws.ru/acts/Reshenie-Komissii-Tamozhennogo-soyuza-ot-18.06.2010-N-317.

2. Договор о ЕАС от 29 мая 2014 года, статья 56. https://www.alta.ru/tamdoc / 14bn0044.

3. Концепция согласованной (скоординированной) агропромышленной политики государств-членов Таможенного союза и Единого экономического пространства. Решение Высшего Евразийского экономического совета от 29 мая 2013 года № 35. http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/70290800.

4. ТР ТС 021/2011 Технический регламент Таможенного союза "О безопасности пищевой продукции". http://docs.cntd.ru/document/902320560.

УДК 378

ОПЫТ ОРГАНИЗАЦИИ НИР ПРИ ПОДГОТОВКЕ БАКАЛАВРОВ ПО НАПРАВЛЕНИЮ «БИОТЕХНОЛОГИЯ»

Л.П. Лазурина

Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

В настоящее время научно-технический прогресс характеризуется изменениям в биологии, которая вышла на молекулярный и субклеточный уровни. Активное развитие ряда наук биологического профиля и широкое применение в практической сфере обусловлено в первую очередь социально-экономическими потребностями общества.

Ряд актуальных проблем не могут быть решены традиционными методами, например, дефицит чистой воды и пищевых веществ, сложная экономическая обстановка, нехватка сырьевых и энергетических ресурсов, а также необходимость развития новых средств диагностики и лечения заболеваний и т. д. Многие из этих проблем порождены научно-техническим процессом общества и их решение невозможно без использования его новейших достижений.

Биотехнологии отводится большая роль в решении этих глобальных проблем в рамках которых осуществляется целенаправленное применение биологических систем и процессов в многообразных сферах человеческой деятельности. Биотехнология находится в ряду приоритетных направлений научно-технического прогресса и является ярчайшим примером высоких технологий, связанных с перспективами развития многих производств.

В настоящее время биотехнология бурно развивается и ее уровень в целом определяется научно-техническим потенциалом страны, поэтому любой современный специалист и особенно биотехнолог должен иметь представление об основных направлениях, перспективах развития и возможностях использования новейших достижений биотехнологии для того, чтобы гибко перестраиваться в профессиональной деятельности к потребностям рынка.

Образовательный процесс ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России опирается на материально-техническую базу, интеллектуальный потенциал НИИ экологической медицины, ориентируется на внедрение биотехнологий в среду химико-фармацевтической промышленности, учитывая потребности рынка труда, научно-исследовательские и материально-технические ресурсы Курской области.

При подготовке бакалавров для биотехнологических производств основная задача – дать студентам алгоритм обучения, обеспечивающий знания принципов, методов, способов, средств, составляющих основы научной и интеллектуальной деятельности на стадиях формирования творческих решений: от реализации лабораторно-экспериментальных исследований до их технологического и инженерного воплощения.

Бакалавры, работающие в химико-фармацевтической промышленности должны обладать не только глубокими теоретическими знаниями, но и владеть методикой и основами научного поиска, уметь с помощью эксперимента находить ответ на сложные вопросы производства, анализировать, структурировать и эффективно использовать информацию для максимальной самореализации в жизни общества. Кроме того, на образование оказывает влияние изменение в системе общественных отношений, требующих от него мобильности, адекватного ответа на реалии исторического этапа и соответствия потребностям экономики.

Поэтому одна из основных задач высшей школы заключается в подготовке бакалавров, обладающих соответствующими компетенциями и способными непрерывно совершенствовать и углублять свои знания, повышать профессиональный уровень, принимать активные участие во внедрении научно-технических достижений в производство, разработке новых продуктов. Преподаватели выпускающей кафедры считают, что научно-исследовательская работа (НИР) студентов призвана решить следующие задачи:

– научить студентов методам научного познания и углубленному творческому изучению учебного материала;

– научить студентов самостоятельному принятию решений научных и технических задач;

– на примерах обучить студентов решениям актуальных проблем предприятий.

В связи с этим для эффективного проведения НИР и обеспечения качества подготовки бакалавров необходима чёткая организация её во время обучения, целостный педагогический процесс и научно обоснованный характер. Цель этой работы – формирование готовности бакалавров к профессиональной деятельности. Готовность – это фундаментальное условие выполнения любой деятельности, определяющие активно – деятельное состояние личности, отражающее содержание стоящей перед ним задачи и условия предстоящего его выполнения. Началом готовности к деятельности является постановка цели на основе потребностей и мотива, затем разработка плана и схемы действий и завершающая стадия – появление предметных действий, применение определенных средств и способов деятельности и сопоставление результатов с поставленными целями деятельности. Готовность бывает ситуационная и длительная. Ситуационная определяется относительной устойчивостью и на неё влияет много факторов, а длительная – формируется в результате специально организованной деятельности, она действует постоянно и является важнейшей предпосылкой успешной профессиональной деятельности бакалавра. Таким образом, длительная готовность бакалавров к научно-исследовательской деятельности может быть сформирована при грамотно организационной НИР студентов в вузе.

Анализ многолетней работы показал, что успешные студенты, привлекаемые к НИР имеют хорошие результаты. Со 2-го курса студенты начинают участвовать с докладами на конференциях (до 40 % от общего числа), на 4-м курсе уже все студенты участвовали с докладами на конференциях и имеют по две и более опубликованные статьи.

Таким образом, за время обучения студентами выполняется достаточно большой объём НИР, удается получить данные для проектирования технологического процесса, выступить на конференциях, подготовить и опубликовать научно-исследовательские статьи и тезисы и т. д., что способствует развитию навыков научного творчества, формированию профессиональной направленности, что имеют крайне важное значение для бакалавров по направлению подготовки «Биотехнология».

ЛИТЕРАТУРА

Струк, Е.Н. Высшее образование в эпоху инноваций// Фундаментальные исследования, 2005, № 7. С. 61–62.

Лаврентьев, Г.В. Инновационные обучающие технологии в профессиональной подготовке специалистов / Г.В. Лаврентьев, Н.Б. Лаврентьева. – Барнаул: Издательство Алтайского гос. университета. – 2002. – 155 с.

Лазурина, Л.П. К вопросу обеспечения качества образования на биотехнологическом факультете / Л.П. Лазурина, В.А. Лазаренко, П.В. Калуцкий // Биотехнология и биомедицинская инженерия: сборник материалов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Курск, 2016. – С. 16–18.

УДК 615.453.3

К ВОПРОСУ РАЗРАБОТКИ ТЕХНОЛОГИИ ГЕЛЕСОДЕРЖАЩИХ КОМПОЗИЦИЙ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО НАЗАНАЧЕНИЯ

К.В. Завидовская, М.М. Самохвалов

Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

Разработка продуктов питания функционального назначения в последнее время весьма актуальна и, с одной стороны, связана с необходимостью профилактики и лечения некоторых заболеваний, а с другой – с расширением ассортимента выпускаемой продукции, что требует разработки технологии новых видов продукции для отраслей пищевой промышленности и общественного питания.

Применение биологически активных веществ для продуктов питания функционального назначения является актуальной задачей, решение которой основывается на медицинских, гигиенических и других подходах с помощью которых можно не только разрабатывать безопасные для человека продукты, но и защищать его генетические структуры от негативных воздействий окружающей среды.

Поскольку пищевые продукты должны быть безопасными, обладать достаточно высокой пищевой ценностью, иметь привлекательный товарный вид, то для разработки продуктов функционального назначения необходимо проведение научных исследований по установлению роли микронутриентов или их комплексных соединений в патогенезе и лечении заболеваний, выведении из организма чужеродных веществ и т. д.

Цель работы заключалась в разработке состава и технологии получения пищевых композиций на основе природных гелеобразователей.

Современная стратегия производства пищевых продуктов включает изыскание новых ресурсов незаменимых пищевых компонентов, нетрадиционного сырья, новых прогрессивных технологий, позволяющих придавать необходимые свойства, повышать пищевую и биологическую ценность продуктов, увеличивать сроки хранения.

Разработка новых форм пищевых функциональных продуктов с заданными свойствами проводилась в соответствии с принципами пищевой комбинаторики: исключение из состава продукта непереносимого компонента; введение в состав продукта недостающего пищевого вещества; либо замена введением аналогичного компонента с полезными свойствами.

Эти принципы были положены в основу разрабатываемых нами гелеобразных композиций функционального и лечебно-профилактического назначения. При разработке рецептур гелесодержащих пищевых продуктов учитывали: необходимость обогащающей добавки (т. е. биологически активные вещества, микронутриенты); выбор обогащаемого пищевого продукта, т. е. основу пищевой композиции (гелеобразные вещества, проростки пшеницы и гречихи и т. д.). Техническое решение задачи заключалось в улучшении органолептических и физико-химических свойств пищевых композиций, придании им лечебно-профилактической направленности и конкурентоспособности. Эффективность, разработанных гелесодержащих композиций профилактического и лечебно-профилактического назначения подтверждена медико-биологическими испытаниями.

ЛИТЕРАТУРА

Разработка технологии пролонгированной лекарственной формы – медулы, содержащей кислоту янтарную Шубина Г.Н., Лазурина Л.П.В сборнике: Университетская наука: взгляд в будущее Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 81-летию Курского государственного медицинского университета и 50-летию фармацевтического факультета. В 3-х томах. Под ред. В.А. Лазаренко, П.В. Ткаченко, П.В. Калуцкого, О.О. Куриловой. 2016. С. 136–139.

Изучение противомикробной активности полимерных форм, содержащих комплексные соединения меди и железа Самофалов А., Тихонова Я., Артюшкова Е., Секерина И., Завидовская К., Лазурина Л. Современные проблемы науки и образования. 2013. № 1. С. 352.

Влияние новых комплексных соединений железа в составе полимерных форм на моделированное воспаление Тихонова Я., Самофалов А., Артюшкова Е., Калуцкий П., Лазурина Л. Современные проблемы науки и образования. 2012. № 6. С. 550.



Уважаемы коллеги!
Дорогие друзья!

Мы выражаем большую и искреннюю благодарность всем участникам VII 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»

Мероприятие проведено в рамках проекта РФФИ № 19-08-20153\19

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

журнала *«Актуальная биотехнология»*

Приглашает к публикации студентов, аспирантов и научных работников по следующим тематикам:

- **Фундаментальные аспекты современной биотехнологии**
- **Биотехнология в пищевых, химических производствах и сельском хозяйстве**
- **Биоинженерия и биоинформатика, бионанотехнологии**
- **Оборудование и автоматизация биотехнологических производств**
- **Информационные технологии и математическое моделирование**
- **Экология и ресурсосбережение**
- **Экономика и управление**
- **Высшая школа в подготовке кадров**

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(Крупныйиндекс)	7
Sub-subscript/Superscript (Мелкийиндекс)	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.